



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

ÚS DE LA PROTEÏNA DE DIETES DE SUBSTITUCIÓ EN LA TRUITA
IRISADA (*Oncorhynchus mykiss*) I L'ORADA (*Sparus aurata*).
ESTUDI AMB ISÒTOPS ESTABLES

Tesi Doctoral

Marta Beltran Arcas



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Centre de Referència i
Desenvolupament en
Aqüicultura de la Generalitat
de Catalunya.**

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

ÚS DE LA PROTEÏNA DE DIETES DE SUBSTITUCIÓ EN LA TRUITA

IRISADA (*Oncorhynchus mykiss*) I L'ORADA (*Sparus aurata*).

ESTUDI AMB ISÒTOPS ESTABLES

Memòria presentada per

Marta Beltran Arcas

Per optar al grau de

Doctora en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Josefina Blasco Mínguez del Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia. Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa de Fisiologia (bienni 2000-2001).

Josefina Blasco

Marta Beltran

Barcelona, Maig 2006

INTRODUCCIÓ	1
Metabolisme proteic en peixos	6
Recanvi proteic	7
Oxidació d'aminoàcids	9
Gluconeogènesi a partir d'aminoàcids	10
Lipogènesi a partir d'aminoàcids	11
Excreció de nitrogen	12
Requeriments proteics i d'aminoàcids dels peixos	13
Qualitat nutricional de les proteïnes	14
Perfil d'aminoàcids essencials	14
Relació aminoàcids essencials / aminoàcids no essencials	15
Proteïna i energia metabolitzable	16
Disponibilitat dels aminoàcids	16
Requeriments d'hidrats de carboni dels peixos	18
Ingredients vegetals com a fonts de proteïnes	20
Limitacions de l'ús d'ingredients vegetals	20
Ingredients vegetals emprats en pinsos per peixos	21
Substitució de la farina de peix per proteïnes vegetals	22
Els isòtops estables com a traçadors metabòlics	24
Variacions en l'abundància natural i el fraccionament dels isòtops estables	25
Marcatge amb isòtops estables	27
OBJECTIUS	29
MATERIAL I MÈTODES	33
1. Dissenys experimentals	35
1.1. BLOC EXPERIENTAL I	
1.1.1. Dietes	35
1.1.2. Animals i condicions de cultiu	35
1.1.3. Protocol experimental	38
1.1.4. Anàlisi estadístic	40

1.2. BLOC EXPERIMENTAL II	
1.2.1. Dietes	41
1.2.2. Animals i condicions de cultiu	41
1.2.3. Protocol experimental	45
1.2.4. Anàlisi estadístic	46
1.3. BLOC EXPERIMENTAL III	
1.3.1. Dietes	47
1.3.2. Animals i condicions de cultiu	47
1.3.3. Protocol experimental	50
1.3.4. Anàlisi estadístic	51
1.4. BLOC EXPERIMENTAL IV	52
1.5. BLOC EXPERIMENTAL V	53
2. Mètodes d'anàlisi	54
2.1 Components principals de teixit	
2.1.1. Determinació dels índexs somàtics	54
2.1.2. Contingut d'aigua	54
2.1.3. Extracció i quantificació de lípids	54
2.1.4. Extracció i quantificació de proteïnes	55
2.1.5. Extracció i quantificació de glicogen	56
2.2. Paràmetres plasmàtics	
2.2.1. Valoració de proteïnes plasmàtiques	58
2.2.2. Valoració de glucosa	59
2.3. Relació isotòpica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de proteïna, lípid i glicogen tissulars, proteïnes plasmàtiques i pinsos	
2.3.1. Anàlisi elemental – espectrometria de masses de relació isotòpica	61
2.3.2. Expressió dels resultats d'enriquiment	64
2.4. Determinació de la concentració i la relació isotòpica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) dels aminoàcids lliures de plasma i múscul blanc	
2.4.1. Extracció dels aminoàcids lliures	67
2.4.2. Purificació dels aminoàcids lliures	68
2.4.3. Derivatització	70
2.4.4. Cromatografia de gasos – espectrometria de masses	74
2.4.5. Cromatografia de gasos – espectrometria de masses	

de relació isotòpica	76
2.4.6. Càlcul de l'enriquiment dels aminoàcids	77
RESULTATS I DISCUSSIÓ	79
BLOC EXPERIMENTAL I	
Establiment del protocol experimental	
Efecte de la relació aminoàcids essencials / aminoàcids no essencials de la dieta sobre la capacitat d'utilització de la proteïna en la truita irisada i l'orada	81
Resultats	
1. Comparació del marcatge amb ^{13}C i ^{15}N	82
2. Efecte de la relació aminoàcids essencials / aminoàcids no essencials de la dieta sobre la capacitat d'utilització de la proteïna en la truita irisada i l'orada	
2.1. Creixement i composició corporal	84
2.2. Destí de la proteïna de la dieta en teixits i components principals	
2.2.1. Fetge	86
2.2.2. Múscul blanc	86
2.2.3. Paquet visceral + greix perivisceral	89
2.2.4. Distribució tissular de ^{13}C i ^{15}N	89
2.2.5. ^{13}C i ^{15}N en proteïnes plasmàtiques	90
Discussió	91
BLOC EXPERIMENTAL II	
Substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal en la truita irisada. Ús de la proteïna de la dieta	95
Resultats	
1. Creixement i composició corporal	96
2. Glucèmia	98
3. Destí de la proteïna de la dieta en teixits i components principals	
3.1. Fetge	98

3.2. Múscul blanc	99
3.3. Paquet visceral + greix perivisceral	100
3.4. Carcassa	100
3.5. Recuperació total de ^{13}C i ^{15}N en teixits	102
4. Concentració i marcatge de ^{13}C en AA lliures del plasma	103
5. Concentració i marcatge de ^{13}C en AA lliures del múscul blanc	107
6. Concentració i marcatge de ^{13}C i ^{15}N de les proteïnes plasmàtiques	111
Discussió	112

BLOC EXPERIMENTAL III

Substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal en l'orada.

Ús de la proteïna de la dieta	117
Resultats	
1. Creixement i composició corporal	118
2. Glucèmia	120
3. Destí de la proteïna de la dieta en teixits i components principals	
3.1. Fetge	120
3.2. Múscul blanc	121
3.3. Paquet visceral + greix perivisceral	122
3.4. Carcassa	122
3.5. Recuperació total de ^{13}C i ^{15}N en teixits	124
4. Concentració i marcatge de ^{13}C en AA lliures del plasma	124
5. Concentració i marcatge de ^{13}C en AA lliures del múscul blanc	129
6. Concentració i marcatge de ^{13}C i ^{15}N de les proteïnes plasmàtiques	136
Discussió	137

BLOC EXPERIMENTAL IV

Influència dels ingredients vegetals en l'ús dels hidrats de carboni en truita irisada i orada

Resultats	
1. Destí del marcador ^{13}C -midó en teixits i components principals en la truita irisada	142

2. Destí del marcador ^{13}C -midó en teixits i components principals en l'orada	144
Discussió	147
 BLOC EXPERIMENTAL V	
Isòtops Estables (^{15}N i ^{13}C) en la truita irisada i l'orada: variacions de l'abundància natural	151
Resultats	152
Discussió	158
 CONCLUSIONS	 161
 REFERÈNCIES	 167

L'aqüicultura és el sector de producció d'aliment d'origen animal que més ha crescut en els últims anys. Des del 1970, l'aqüicultura ha crescut a nivell mundial un 8.9% cada any, davant del 2.8% de creixement del sector ramader i de l'1.2% de la pesca. L'any 1970 l'aqüicultura contribuïa en un 3.9% a la producció mundial de peix, crustacis i mol·luscs. L'any 2003 una tercera part de la producció total mundial procedia de l'aqüicultura (Figura 1.1; FAO, 2004).

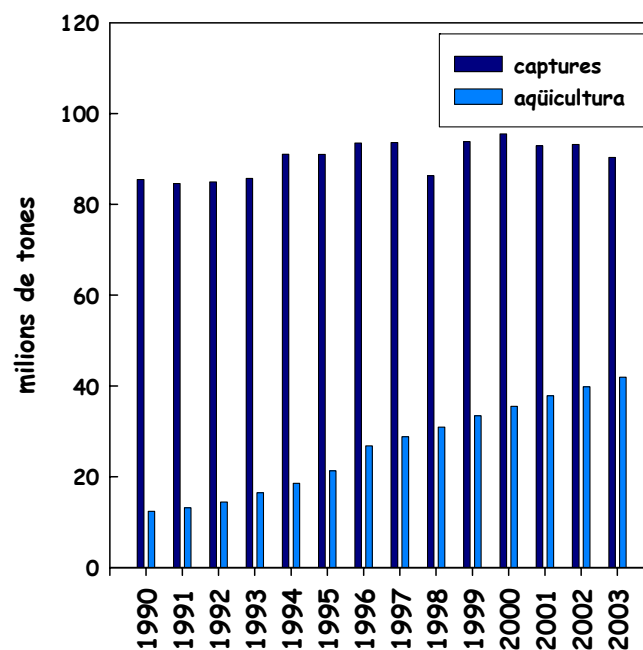


Figura 1.1: Evolució de l'aqüicultura (Dades extretes de l'informe de la FAO, 2004)

Les espècies de peix més cultivades a Europa són carnívores, és a dir, la seva principal font d'aliment és la proteïna. Per a aquestes espècies, com la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i l'orada (*Sparus aurata*), la proteïna i els lípids són les principals fonts d'energia (Atherton i Aitken, 1970; Pieper i Pfeffer, 1980a; Mommsen i col, 1980). En canvi, utilitzen relativament poc els hidrats de carboni. Degut a aquests requeriments nutritius, la farina i l'oli de peix són els constituents majoritaris dels pinsos fabricats pel cultiu de peix. Així, l'any 2000 es va destinar un 24 % de la pesca

total a la producció de farina i oli de peix. Un 35 % de la farina i un 57% de l'oli de peix van ser utilitzats per la producció de pinsos per peixos. Suposant que el ritme de creixement del sector continués fins el 2010, el 56% de la farina i el 85-98 % de l'oli de peix produïts haurien de ser utilitzats pel sector aquícola. En canvi, durant els últims anys, la producció de farina i oli de peix s'ha mantingut estàtica i la proteïna s'ha convertit en el component més car en la formulació de les dietes. D'altra banda, la producció de farina i oli de peix es concentra en determinades regions del món, creant una elevada dependència del comerç exterior. Tampoc cal oblidar la pressió que s'exerceix sobre els estocs de peix i la dependència que hi ha d'oscil·lacions climatològiques que puguin afectar-los. Per aquests motius, un dels principals objectius de la nutrició en peixos és reduir al màxim la despesa de la proteïna de la dieta amb finalitat energètica. Això s'aconsegueix definint els aminoàcids essencials per a cada espècie i elaborant dietes on aquests estiguin disponibles, després dels processos digestius i absortius, en les quantitats i proporcions adequades per a la síntesi de proteïnes destinades al creixement.

La situació del sector ha estimulat dues grans línies de recerca. La primera, reduir el contingut de proteïna de la dieta mitjançant l'increment de lípids i d'hidrats de carboni. S'ha demostrat que les fonts d'energia no proteiques permeten estalviar proteïna amb finalitat energètica (*sparing effect* o efecte estalviador), destinant-se una major quantitat al creixement (Brauge i col., 1995; Arzel i col., 1998; Company i col., 1999). Per aquesta finalitat estalviadora també cal contemplar la funció dels aminoàcids no essencials (AANE). S'ha demostrat que els AANE són metabolitzats i alterats en major proporció que els aminoàcids essencials (AAE) (Wilson i col., 1985), i que els peixos són capaços d'estalviar AAE a costa d'AANE (Kim i col., 1991). Hi ha però, poca informació de l'efecte de la relació AAE/AANE de la dieta sobre la capacitat d'estalvi proteic.

L'altre línia de recerca es centra en testar fonts de proteïnes alternatives a la farina de peix. D'una banda, es considera que poden utilitzar-se les despulles del processat de les espècies salvatges capturades i també els peixos capturats que no tenen cap ús. D'altra banda, els recursos vegetals es presenten com a bons candidats per reemplaçar la farina i l'oli de peix. En aquesta línia, les principals fonts de proteïna vegetal emprades en la formulació de pinsos per peixos són les farines de les llavors de soja, de colza, de gira-sol, de tramús i de cacauet. Generalment també s'inclou blat de

moro o farines de cereals i lleguminoses perquè aporten midó que proporciona propietats cohesives a l'aliment. Encara que existeix molta variabilitat entre espècies, la majoria d'estudis amb peixos considerats carnívors demostren que és possible substituir fins a un 40% de farina de peix per proteïna vegetal, però que percentatges majors acostumen a provocar una reducció del creixement i una menor eficiència d'utilització de l'aliment en els salmònids (Davies i Morris, 1997; Mambrini i col., 1999; Refstie i col., 2000) i en els teleostis marins (Shimeno i col., 1993; Ballestrazzi i col., 1994; Robaina i col., 1995; Nengas i col., 1996; Burel i col., 2000a,b). La reducció del creixement s'associa generalment a la presència de factors antinutricionals (Francis i col., 2001), a la manca d'algun AAE a les fonts vegetals (Murai i col., 1986; Kaushik, 1990; Kaushik i col., 1995) i a la presència de hidrats de carboni complexos (Rackis, 1974; Storebakken i col., 2000).

En el present bloc introductori es descriu, en primer lloc, alguns conceptes de metabolisme proteic i els requeriments proteics i d'hidrats de carboni dels peixos, centrant-nos especialment en la truita irisada i l'orada. A continuació es recullen els estudis més rellevants de substitució de farina de peix per fonts de proteïna vegetal i, finalment, es presenten els isòtops estables com a eina per fer estudis metabòlics.

Metabolisme proteic en peixos

A la figura 1.2 es representa un esquema global dels processos on intervé la proteïna i els seus aminoàcids (AA). El flux d'AA procedents de la dieta, la concentració d'AA lliures en els teixits, el metabolisme dels teixits i la utilització dels AA per sintetitzar proteïnes estan estretament relacionats.

Les proteïnes de la dieta són hidrolitzades a l'intestí i els AA resultants són absorbits i entren pel sistema portal al fetge. El flux d'AA que entra via dieta és generalment major que la quantitat total d'AA lliures en el peix sencer (Carter i col., 1995; Houlihan i col., 1995). En el fetge els AA poden utilitzar-se per síntesi proteica, oxidació amb finalitat energètica, conversió a glucosa o conversió a lípids. Tanmateix, el fetge té un paper central en el control i la regulació dels AA cap a altres teixits.

En el múscul, els AA són utilitzats per sintetitzar proteïnes, és a dir, per créixer, i com a font d'energia.

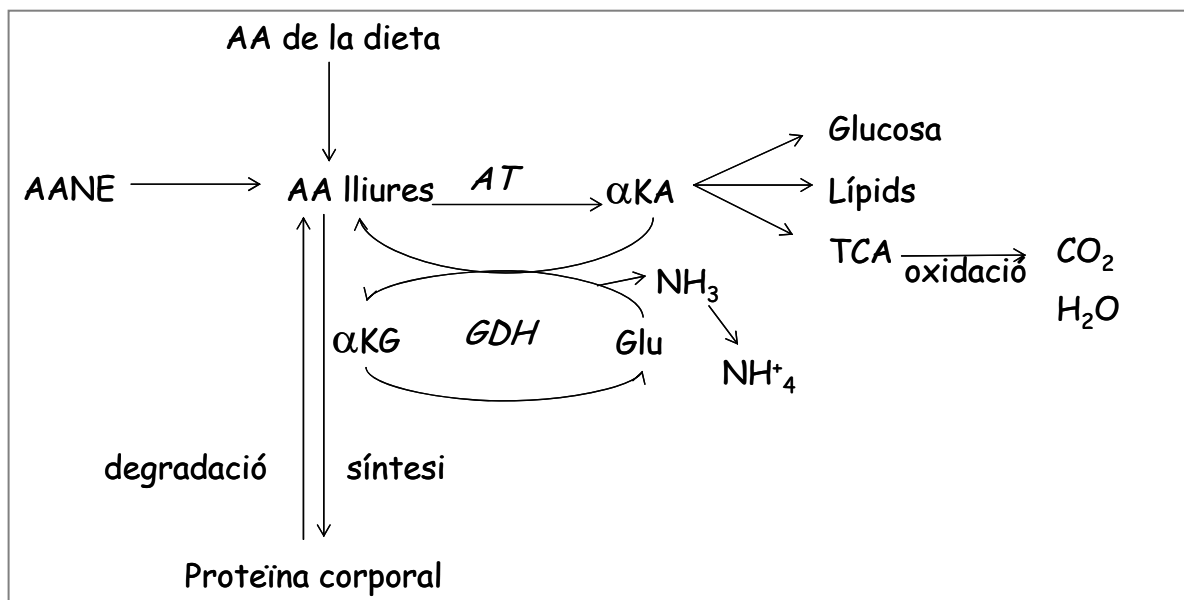


Figura 1.2: Esquema general del metabolisme proteic. AA: aminoàcid, AANE: aminoàcid no essencial, AT: aminotransferasa, αKG: alfa-cetoglutarat, αKA: alfa-cetoàcids (piruvat i oxalacetat majoritàriament), Glu: àcid glutàmic, TCA: cicle dels àcids tricarboxílics.

Recanvi proteic

Les proteïnes corporals estan en continu procés de recanvi: síntesi i degradació. La síntesi de proteïnes requereix la presència de tots els AA, essencials i no essencials, simultàniament en les quantitats adequades.

En els peixos, igual que en els vertebrats superiors, la síntesi de proteïnes varia segons el teixit. Així, la síntesi proteica és major en el fetge, seguit de brànquia, tub digestiu, múscul vermell i múscul blanc (Narayansingh i Eales, 1975). Tanmateix, el patró temporal de síntesi proteica varia entre teixits, essent el pic de síntesi proteica en fetge abans que en múscul (Lyndon i col., 1992). En termes absoluts, el múscul blanc és el teixit que sintetitza més proteïnes, ja que representa entorn del 50% de tot el pes corporal i la major part de proteïnes sintetitzades pel múscul són retingudes (50-70% en peixos en front d'un 25-40% en mamífers). Aquestes diferències poden relacionar-se amb que el creixement muscular dels peixos té lloc per hiperplàsia (incorporació continua de fibres) i per hipertròfia, en contrast amb els vertebrats superiors en els que el creixement és només per hipertròfia.

En els peixos, en general, un increment de la ingesta comporta un increment de la síntesi i la degradació de proteïnes (Houlihan i col., 1993). Una part de les proteïnes sintetitzades serà retinguda per creixement, de manera que la relació entre síntesi i creixement expressa l'eficiència de retenció de les proteïnes sintetitzades. El balanç relatiu entre la síntesi, la degradació i el creixement varia considerablement en funció de la condició nutricional. Segons el model proposat per Houlihan i col. (1993) (Figura 1.3), en situació de manteniment del balanç nitrogenat, la taxa de síntesi de proteïnes (k_s) és igual a la de degradació (k_d), i per tant la taxa de reciclatge proteic (k_t) és equivalent a K_s i K_d . En estat no estacionari, en situació de pèrdua de pes, la taxa de degradació supera a la de síntesi, de manera que el reciclatge proteic és equivalent a la taxa de síntesi. En

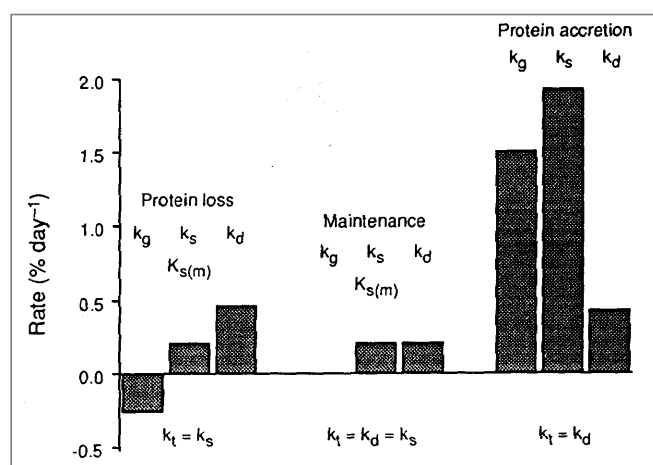


Figura 1.3: Creixement proteic (kg) en el múscul blanc de truita (40g, 8°C). Dades de McCarthy i col. publicades per Houlihan i col. (1993).

situació de creixement, hi ha un procés continu de síntesi de proteïnes noves i de resíntesi de molècules degradades; en aquest cas el reciclatge proteic és equivalent a la taxa de degradació.

La síntesi de proteïnes i el consum d'energia estan estretament relacionats (Waterlow i Millward, 1989; Houlihan, 1991; Lyndon i col., 1992), per això una forma de maximitzar el creixement és, en part, reduint la taxa de reciclatge proteic (Carter i col., 1998, Mente i col., 2002). Des del punt de vista de l'aqüicultura, aquells animals amb una major eficiència de conversió de les proteïnes sintetitzades seran els més adequats per cultivar.

Les taxes de síntesi i degradació estan influïdes per molts factors, com per exemple, la temperatura (Mathers i col., 1993), la ració (Carter i col., 1993), l'espècie (revisat per Houlihan i col., 1993), l'estadi del cicle biològic (Mathers i col., 1993), el pes corporal (Houlihan i col., 1986), l'exercici (Houlihan i Lauret, 1987) i la pròpia jerarquia dels animals dintre d'una mateixa espècie (McCarthy i col., 1992, 1994). La composició de la dieta també influeix fortament sobre les taxes de síntesi i degradació. A nivell de tot el cos, la taxa de reciclatge proteic incrementa quan la dieta té un elevat contingut proteic (Houlihan i col., 1989; Meyer-Burgdorf i Rosenow, 1995b), però també quan hi ha una concentració subòptima de proteïnes (Meyer-Burgdorf i Rosenow, 1995b), un perfil d'AA poc balancejat (Fauconneau, 1985; Langar i Guillaume, 1994; Perera, 1995) o durant el dejuni (Kim i col., 1992a). En aquests últims casos l'increment del reciclatge prové de l'increment de la degradació proteica.

Les taxes de síntesi, degradació, reciclatge, deposició proteica i deposició de proteïnes recent sintetitzades varien quan la farina de peix és substituïda per fonts de proteïna alternatives. Així, en l'anguila, la substitució de la farina de peix per farina de gira-sol provoca un increment del reciclatge proteic i una menor eficiència de deposició proteica (De la Higuera i col., 1999). La substitució de la farina de peix per un 50% de farina de col·lagen o de plomes en el llobarro provoca una menor taxa de deposició proteica, alhora que dietes basades en AA hidrolitzats provoquen una menor eficiència de retenció de les proteïnes sintetitzades per increment de la taxa de degradació, en comparació amb dietes basades amb AA proteics (Langar i col. 1993). Truites irisades alimentades amb dites amb un 30% de soja mostren una menor eficiència de retenció de les proteïnes sintetitzades en comparació amb truites alimentades amb farina de peix (Martin i col., 2003). En la gambeta (*Litopenaeus vannamei*) alimentada amb caseïna, la síntesi proteica i la retenció de proteïnes és menor, mentre que la degradació proteica és

major, en comparació amb animals alimentats amb farina de peix (Mente i col., 2002). Altres components de la dieta a part de la font proteica o el perfil d'AA, també influeixen sobre la taxa de reciclatge proteic. Així per exemple, l'absència de carbohidrats en la dieta fa incrementar la taxa de degradació de les proteïnes (Peragon i col. 1999). D'altra banda, dietes amb un elevat contingut de carbohidrats i un baix contingut proteic fan disminuir la taxa de deposició proteica, indicant un increment de la degradació proteica i una disminució de la taxa de retenció de les proteïnes sintetitzades (Viaplana-Marín i col., 2005).

Oxidació d'aminoàcids

L'oxidació dels AA en peixos és comparativament més elevada que en mamífers (McFarlan i VonHolt, 1969; Nagai i Ikeda, 1972, 1973; Cowey, 1975). Els peixos utilitzen els AA amb finalitat energètica preferentment a la glucosa, essent els AANE més oxidats que els AAE (Walton i Wilson, 1986). En règim d'alimentació, els AA que majoritàriament s'oxiden són els procedents de la dieta, ja que el subministrament d'AA procedents de la proteolisi muscular és escàs (Houlihan i col., 1993). En canvi, en situació de dejuni, els AA corporals són el principal substrat energètic (Mommsen i col, 1980; French i col., 1983).

La degradació dels AA té lloc en dues etapes. En primer lloc, els AA són convertits en molècules intermediàries que entren en el cicle dels àcids tricarboxílics. Els enzims implicats solen ser específics de l'AA i les reaccions són de tipus desaminació oxidativa, transdesaminació i descarboxilació no oxidativa. En segon lloc, aquests intermediaris són oxidats a CO₂ i H₂O mitjançant oxidases i deshidrogenases. La deshidrogenasa present en els teixits animals és la glutamat deshidrogenasa (GDH) (Bell, 1968). El grup NH₂ dels AA catabolitzats pot utilitzar-se per reaccions de transaminació, catalitzades per l'alanina i l'aspartat aminotransferasa (ALAT i ASAT), també conegudes com a glutamat-piruvat aminotransferasa i glutamat-oxalacetat aminotransferasa, respectivament (GPT i GOT), o pot ser alliberat per reaccions de desaminació abans de ser eliminat. Les reaccions de desaminació poden ser directes o per transdesaminació, essent aquesta última la via majoritària.

El **control enzimàtic** del catabolisme dels AA depèn de dos mecanismes:

◇ “*Fine control*”: depèn de la Km. Walton i Cowey (1982) van demostrar que les concentracions dels AA en els teixits de peix estan per sota dels valors de Km dels enzims implicats en el seu catabolisme. L'increment de la concentració d'AA en els teixits, per exemple en estat postprandial o com a resposta a una ingesta hiper-proteica, fa incrementar l'oxidació dels AA (Walton i Cowey, 1977; Cowey i Sargent, 1979).

◇ “*Coarse control*” o control de la concentració dels enzims. Aquest és un control important en l'adaptació dels animals a les variacions d'ingesta proteica. En la carpa i la truita la concentració de determinats enzims catabòlics del fetge (histidina desaminasa i urocanasa en carpa, GDH i ALAT en truita) incrementa en resposta a una dieta hiperproteica (Sakaguchi i Kawai, 1970; Sánchez-Muros i col., 1998). En situació de dejuni, la proteolisi muscular incrementa i per tant el nivell d'AA plasmàtics. En aquesta situació, l'activitat dels enzims ALAT i ASAT en el fetge i el múscul també incrementa (Mommsen i col., 1980; Moon i Johnston, 1981; Moon, 1983).

Gluconeogènesi a partir d'aminoàcids

El catabolisme de la proteïna de la dieta o de les pròpies proteïnes corporals és una via important per a l'obtenció de glucosa. Els aminoàcids més gluconeogènics en els peixos són l'alanina, la glicina i la serina (Cowey i col, 1977a; Walton i Cowey, 1979 a,b; Hayashi i Ooshiro, 1977, 1979; Renaud i Moon, 1980). El glutamat i l'aspartat també ho són però en menor quantitat (Walton i Cowey, 1982; Renaud i Moon, 1980).

Els quatre enzims gluconeogènics són la piruvat carboxilasa (PC), la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK), la fructosa bisfosfatasa (FBPasa) i la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa). La FBPasa i la G6Pasa són ubiques (Johnston i Moon, 1979; Knox i col., 1980). En canvi la PC i la PEPCK únicament es troben presents en el fetge, que és el principal teixit gluconeogènic (Phillips i Hird, 1977; Mommsen i col., 1985), i en el ronyó del llenguado (Jorgensen i Mustafa, 1980) i del salmó atlàntic (Mommsen i col., 1985). En el cas del múscul, únicament s'ha detectat activitat gluconeogènica a partir de lactat en la palaia (Batty i Wardle, 1979).

En el fetge dels peixos, la canalització dels AA cap a síntesi proteica, oxidació o gluconeogènesi està fortament relacionada amb l'estat nutritiu. Estudis *in vitro* amb hepatòcits aïllats mostren que la taxa de gluconeogènesi és major en situació de dejuni

que en situació d'alimentació en anguiles americanes (Renaud i Moon, 1980) i truites irisades (French i col., 1981). Tanmateix, en la truita irisada, durant el dejuni incrementa la taxa d'incorporació de ^{14}C -Ala (Cowey i col., 1977a) i de ^{14}C -Glu (De la Higuera i Cárdenas; 1985) a glucosa. A nivell enzimàtic s'ha vist que l'activitat dels enzims gluconeogènics incrementa en situació de dejuni en el llobarro (Zammit i Newsholme, 1979), la palaia (Moon i Johnston, 1980), la truita (Moon i col, 1989) i la perca (Foster i Moon, 1991).

Una situació comparable al dejuni és la migració. Mommsen i col. (1980) van proposar que durant la migració dels salmons es produeix una conversió neta d'AA a Ala en el múscul blanc (proteolisi) que és alliberada a la sang i s'utilitza com a substrat gluconeogènic pel fetge i el ronyó. Posteriorment, les mesures *in vitro* de French i col. (1983) van confirmar l'increment en la taxa de gluconeogènesi en salmons en època de migració.

Les dietes amb un elevat contingut proteic i un baix contingut d'hidrats de carboni fan incrementar la taxa d'incorporació de ^{14}C -Ala a glucosa en la truita irisada (Cowey i col., 1977a) i l'activitat dels enzims gluconeogènics (G6Pasa, FDPasa i PEPCK) en la truita irisada, la seriola i l'orada (Cowey i col., 1977b; Shimeno i col, 1979; Metón i col., 2003). D'altra banda, dietes riques en carbohidrats fan disminuir l'expressió dels enzims gluconeogènics en l'orada (Panserat i col., 2002), mentre en la truita no s'observa cap efecte dels hidrats de carboni sobre l'expressió dels enzims gluconeogènics (Panserat i col., 2001), fet que pot explicar, en part, la hiperglicèmia que presenta aquesta espècie quan és alimentada amb dietes riques en hidrats de carboni.

Lipogènesi a partir d'aminoàcids

El principal teixit de síntesi d'àcids grassos és el fetge. L'esquelet de carboni dels AA és convertit fins a acetil CoA, per la piruvat deshidrogenasa, i l'acetil CoA és convertit a Acil CoA mitjançant reaccions de carboxilació, condensació i reducció catalitzades per la Acetil CoA carboxilasa i pel complex *Fatty Acil CoA synthetasa* (FAS). Els triglicèrids es formen per esterificació de 3 àcids grassos amb 1 glicerol-1-fosfat.

L'efecte de la proteïna de la dieta sobre la lipogènesi hepàtica ha estat poc estudiada. En la truita, dietes amb un baix contingut proteic provoquen en alguns casos la disminució de l'activitat de les deshidrogenases hepàtiques (generadores de NADPH)

(Walton, 1986; Barroso i col., 1994), però en d'altres casos no s'observa aquest efecte (Lupiañez i col., 1989). En el llobarro s'ha observat que dietes amb un 25% de proteïna crua fan incrementar l'activitat de l'acetil coA carboxilasa, mentre majors quantitats de proteïna no afecten l'activitat de l'enzim (Dias i col., 2003). En els vertebrats superiors a part de la quantitat de proteïna, també la qualitat d'aquesta afecta a l'activitat dels enzims lipogènics (Rosebrough i col., 1982; Herzberg i Rogerson, 1984; Iritani i col., 1986, 1996). En els peixos hi ha molt pocs estudis de l'efecte de la font proteica sobre la lipogènesi, però s'ha vist que dietes riques en proteïna vegetal (soja o farina de blat de moro) provoquen en el llobarro la disminució dels enzims lipogènics (G6PDH, EM, ATP-citrat liasa, Acetil coA carboxilasa i FAS) en comparació amb peixos alimentats amb farina de peix (Dias i col. 2005).

Excreció de nitrogen

A diferència dels vertebrats terrestres, el principal producte final del metabolisme del N en els teleostis és l'amoni (NH_4^+) (80% de l'excreció de N), excretat principalment per les brànquies (Smith, 1929; Vellas i Sefarty, 1974). Els peixos també produeixen quantitats petites d'urea, procedents del trencament dels àcids nucleics (Foster i Goldstein, 1969). L'amoni es forma a partir de la desaminació dels AA, les amides, les purines, pirimidines i hexosamines. L'amoniac (NH_3), alliberat en els processos de desaminació, és molt tòxic, però en condicions de pH fisiològic es transforma en amoni. La producció d'amoni es fa principalment al fetge mitjançant transdesaminació (Van Waarde, 1981; Casey i col., 1983). En situació postprandial, el ronyó, el múscul blanc i l'intestí també contribueixen a la producció d'amoni. En el múscul blanc l'amoni es produeix pel cicle del purin-nucleòtid (Lowenste, 1972).

La composició de l'aliment influeix sobre l'excreció de nitrogen. Així l'excreció d'amoni incrementa quan les dietes són riques en proteïna i quan el balanç d'AA no és adequat per la síntesi proteica i el creixement (Cho i Kaushik, 1985). Tanmateix l'excreció d'amoni s'ha correlacionat amb l'activitat dels principals enzims del catabolisme dels AA (Fromm, 1963 ; Infante, 1974).

Requeriments proteics i d'aminoàcids dels peixos

Els peixos, igual que en els vertebrats superiors, són incapaçs de sintetitzar determinats AA, denominats AA essencials (AAE), i per tant han de ser aportats per la dieta. En canvi, els aminoàcids no essencials (AANE) sí que poden ser sintetitzats a partir dels corresponents α -cetoàcids, per transaminació. En els peixos també es distingeixen dos AA semiessencials, que només poden ser sintetitzats a partir de dos aminoàcids essencials. Són la cisteïna/cistina i la tirosina que deriven respectivament de la serina/metionina i de la fenilalanina.

Els deu AAE pels peixos són els mateixos que pels vertebrats superiors no ureotètics. Entre els AAE es poden distingir tres categories:

- arginina (Arg) i histidina (His): es sintetitzen en el metabolisme intermediari però aquesta síntesi no comporta un balanç positiu degut a la baixa activitat dels sistemes enzimàtics.
- leucina (Leu), isoleucina (Ile), valina (Val), triptofà (Trp), fenilalanina (Phe) i metionina (Met): poden sintetitzar-se per transaminació, però a una velocitat insuficient degut a la manca de substrat.
- lisina (Lys) i treonina (Thr): no es poden sintetitzar a partir de cap metabòlit intermediari degut a l'absència de les transaminases necessàries.

En qualsevol cas, per tota aplicació pràctica, aquests deu aminoàcids s'han de considerar essencials. Els requeriments d'AAE es determinen preparant una sèrie de dietes que contenen percentatges graduals de l'AAE en estudi i el requeriment s'estableix estudiant la resposta (creixement) a diferents dosis. D'aquesta manera els requeriments quantitius dels deu AAE han estat exactament definits per la truita irisada (Kim i col., 1992 a,b,c; Kim, 1993; Rodehutschord i col., 1997) i per l'orada (Luquet i Sabaut, 1974; Kaushik, 1998; Fournier i col., 2002). En general, es considera que els requeriments d'AAE no canvien substancialment entre espècies (Cowey, 1994; Akiyama i col., 1997).

El requeriment proteic es defineix com el nivell òptim de proteïna que maximitza el creixement, i equival a la suma dels requeriments d'AAE més un aport nitrogenat d'AANE. Els requeriments proteics i d'aminoàcids essencials dels peïxos són, en molts casos, el doble dels requeriments de rata, pollastre i porc (revisions de Mertz, 1972; Cowey, 1975, Cowey i Stevenson, 1979; Ogino, 1980). Per salmònids el nivell òptim de proteïna a la dieta és d'un 40% (Cowey, 1975), mentre per espècies marines és d'un 45-50% (Peres i Oliva-Teles, 1999; Kaushik, 1997). En la truita s'ha establert que del 40% de proteïna requerida, un 24% és per cobrir els requeriments d'AAE i un 16% per cobrir les necessitats energètiques (Kim, 1997).

Qualitat nutricional de les proteïnes

• Perfil d'aminoàcids essencials

Una font proteica és equilibrada quan aporta el perfil d'AAE requerit per una determinada espècie. Aleshores es diu que el patró d'AAE està ben balancejat. En canvi, si la font proteica aporta un o més AAE en menor quantitat de la requerida per una determinada espècie aleshores es considera una proteïna poc balancejada o imbalancejada. Les proteïnes imbalancejades limiten la síntesi proteica ja que només s'emprarà per sintetitzar proteïnes una quantitat d'AA equivalent a la disponibilitat de l'AA limitant.

Una bona manera d'establir els requeriments d'AAE d'una espècie és basant-se en el seu perfil d'AAE corporal, ja que s'ha demostrat que existeix una elevada correlació entre el perfil d'AAE corporal i els requeriments de l'espècie (Mambrini i Kaushik, 1994). La concentració d'AA lliures en els teixits animals és un bon indicador de la idoneïtat dels AA de la dieta i pot servir per quantificar els requeriments aminoacídics de l'animal (Pion, 1976). D'altra banda, existeix una elevada correlació entre els AAE de la dieta i els del plasma (Nose, 1972; Ogata, 1986; Lyndon i col., 1993), i els AA lliures dels teixits poden alterar-se en funció de la qualitat de la dieta (Kaushik i Luquet, 1980).

Per avaluar la qualitat d'una dieta s'utilitza l'índex anomenat "*Amino acid score*", índex que es basa en dues assumpcions:

1. la síntesi de proteïnes en el teixit estarà limitada si tots els AA de la dieta no estan presents en la quantitat adequada

2. la síntesi de proteïnes estarà limitada si la quantitat d'AAE de la dieta és inferior als requeriments de l'animal.

Aquest índex es calcula com el percentatge de cada AA en la dieta respecte als AA d'una dieta de referència que conté els requeriments establerts per a cada espècie. L'AA que tingui el menor percentatge es considera l'AA limitant. L'índex de la dieta serà l'índex de l'AA limitant.

• ***Relació aminoàcids essencials / aminoàcids no essencials***

En la pràctica, els requeriments d'AANE es consideren de forma global, com a requeriments de tots els aminoàcids no essencials en conjunt. La formulació de les dietes es basa en establir el requeriment proteic i les necessitats específiques de cada AAE per a cada espècie, de manera que l'aport d'AANE s'estableix com a diferència entre l'aport total de proteïna i l'aport d'AAE. Però, per definir les millors condicions d'utilització de la proteïna de la dieta és important saber no només els requeriments concrets de cada AAE sinó també la proporció d'aquests respecte als AANE. De fet, dietes completament carents d'AANE tenen un efecte negatiu sobre el creixement (Shuhmacher i col., 1995). Els estudis en porcs de Wang i Fuller (1989) van demostrar que el balanç entre AAE i AANE de la dieta influeix sobre la retenció de N. En els porcs, la relació òptima AAE/AANE és de 1 o 1.3, mentre majors proporcions d'AANE fan disminuir la retenció de N. En truites, l'eficiència d'utilització de l'aliment millora amb dietes amb una relació AAE/AANE de 1.5 en comparació amb dietes amb una relació de 0.67 (Shuhmacher i col., 1995) i amb dietes amb una relació AAE/AANE de 1.32 en comparació amb dietes amb una relació de 1.94 (Green i col., 2002). En la tilàpia, la deposició proteica és més elevada quan s'alimenta amb dietes amb una relació AAE/AANE de 0.67 en relació a peixos alimentats amb una relació de 0.33 (Mambrini i Kaushik, 1994). En general es pot establir que per una determinada ingesta d'AAE, la retenció proteica és òptima si la proporció de AANE és propera al 50% (Mambrini i Guillaume, 1999), cosa que succeeix quan la font de proteïna és d'origen animal, mentre en el cas de dietes basades en proteïnes vegetals cal suplementar amb AA, no només per proporcionar els AAE sinó també per proporcionar una relació AAE/AANE que maximitzi el creixement.

• ***Proteïna i energia metabolitzable***

La bona utilització de la proteïna de la dieta depèn del balanç òptim per a cada espècie entre proteïna i energia metabolitzable. Per les espècies marines la relació òptima de proteïna/energia de la dieta és major i l'eficiència de retenció proteica menor en comparació amb els salmònids (Kaushik, 1997).

En general, per tots els peixos un aport excessiu d'energia no proteica condueix a una reducció de la ingesta abans de que es consumeixi la quantitat de proteïna adequada, ja que els nivells d'ingesta estan determinats principalment per l'energia total disponible de la dieta (Page i Andrews, 1973; Peter, 1979; Kentouri i col., 1995). D'altra banda, un nivell massa elevat de proteïna/energia comporta l'oxidació dels aminoàcids (Cowey, 1979), fet que no és desitjable des del punt de vista de rendibilitat de la dieta. Algunes espècies, com l'orada, regulen el consum d'aliment en funció de la relació proteïna/energia de la dieta per satisfer els seus requeriments nutricionals (Kentouri i col., 1995).

Les fonts d'energia no proteiques permeten estalviar proteïna amb finalitat energètica. Generalment s'ha considerat que els lípids són millor font d'energia que els carbohidrats, perquè aporten un contingut energètic elevat i no presenten els problemes associats al consum de nivells alts de carbohidrats. Tot i això, sembla que l'efecte dels lípids sobre l'estalvi de proteïna és menys eficient en l'orada que en els salmònids (Vergara i col., 1996; Company i col., 1999). D'altra banda, cada vegada hi ha més estudis que demostren que els hidrats de carboni correctament processats contribueixen a l'estalvi proteic (Pieper i Pfeffer, 1980b; Kim i Kaushik, 1992; Capilla i col., 2003).

• ***Disponibilitat dels aminoàcids***

La qualitat proteica d'una dieta depèn de la digestió i absorció dels seus AA, ja que aquests processos condicionaran el patró d'AA disponibles per a la síntesi proteica. La mesura de la digestibilitat dels nutrients de la dieta dona una indicació del valor nutricional d'aquesta i es recomana que sempre es realitzi com a primera mesura de la qualitat d'una dieta (Cho i Kaushik, 1990).

Quan les dietes estan formulades amb un elevat contingut d'AA cristal·lins les taxes de creixement són, en alguns casos, inferiors en relació a les obtingudes quan les dietes es formulen a partir de proteïna (Walton i col., 1982; Murai i col., 1984; Walton i col., 1986; Coloso i col., 1988; Moon i Gatlin, 1989). La reducció del creixement s'ha

associat a la més ràpida taxa d'absorció dels AA cristal·lins respecte als proteics (Murai i col., 1987; Cowey i Walton, 1988; Garzón, 1995; Sierra, 1995). L'aparició asincrònica dels AA cristal·lins respecte als que formen part de proteïnes en els llocs de síntesi proteica estimula el catabolisme dels AA i disminueix la síntesi proteica i per tant el creixement (Cowey i Luquet, 1983). De fet, s'ha demostrat que si els AA cristal·lins són recoberts es millora el creixement, estimulants la síntesi i la deposició proteica (Garzón, 1995; Sierra, 1995; De la Higuera i col., 1997). Ara bé, en d'altres casos els AA cristal·lins s'utilitzen de forma eficient. En el cas del salmó atlàntic s'ha demostrat que és possible incloure en la dieta un 30% d'AA cristal·lins sense afectar al creixement (Espe i Lied, 1994). En la truita un 54% d'AA cristal·lins promou el creixement de la mateixa manera que ho fa una dieta basada únicament en proteïna (Rodehutschord i col., 1995), i en l'orada un 10% d'AA cristal·lins s'utilitzen de forma eficient (Marcouli i col., 2004). Recentment Dabrowski i col. (2003) han comparat l'ús dels AA en alevins i juvenils de truita irisada a partir de tres dietes formulades amb els mateixos AA però en forma d'AA cristal·lins, de dipèptids o de proteïna. Aquests autors han demostrat que la dieta basada en dipèptids sintètics promou el creixement de la mateixa manera que ho fa la dieta basada en proteïna. En canvi, la dieta basada en AA cristal·lins provoca un increment de l'excreció d'amoní en comparació a la basada en dipèptids, indicant un increment dels processos de desaminació. Tanmateix, els autors indiquen que la dieta basada en dipèptids provoca un major consum d'oxigen en l'estat postprandial i que per tant caldria millorar encara la hidròlisi, absorció i transport d'aquests dipèptids.

Requeriments d'hidrats de carboni dels peixos

Els peixos tenen uns requeriments de glucosa baixos (50 mg /100 g de peix i dia) però necessaris pel manteniment del sistema nerviós, eritròcits i gònades (òrgans altament glicolítics). La taxa d'utilització de la glucosa pels peixos és menor que la dels mamífers (Cowey i col., 1977a; Mazeaud, 1973; Lin i col., 1978), la velocitat de renovació de la glucosa circulant és més lenta (5-6 hores) comparada amb la dels mamífers (menys de 30 min) i el reciclatge de la glucosa varia molt segons l'espècie, les condicions mediambientals i l'estat nutricional (de 2 a 55 mmol/kg de pes corporal/min).

Els únics hidrats de carboni que poden ser retinguts en la formulació dels pinsos són els hidrats de carboni complexos com el midó. Aquests constitueixen una font d'energia barata, aportant una energia bruta mitja de 16.7 KJ/g. Ara bé, per l'alimentació dels peixos cal considerar no l'energia bruta sinó l'energia digerible que aporten, que difereix considerablement de l'energia bruta segons l'espècie. En general un increment del contingut de sucres en la dieta redueix la seva digestibilitat (Kim i Kaushik, 1992; Brauge i col., 1994). Els tractaments hidrotèrmics (cocció-extrusió, gelatinització) milloren la digestibilitat dels hidrats de carboni complexos per la majoria d'espècies d'aigua dolça i marina, permetent un major aport d'energia digerible (Bergot i Brèque, 1983; Takeuchi i col., 1990). Les principals fonts d'hidrats de carboni són els midons vegetals: de cereals, proteaginoses, arrels i tubercles pretractats. Processats de manera correcta, els glúcids contribueixen a l'estalvi proteic ja que la glucosa s'utilitza com a font d'energia i desvia als aminoàcids lluny de les vies oxidatives i de la gluconeòlisi (Kaushik i Oliva-Teles, 1985; Peragón i col., 1999; Ruohonen i col., 1999; Metón i col., 1999).

Algunes espècies han mostrat una relativa inhabilitat de metabolitzar els hidrats de carboni exògens. Aquesta inhabilitat es reflexa en una hiperglicèmia prolongada quan s'administra una càrrega de glucosa (Palmer i Ryman, 1972; Shimeno i col., 1977;

Bergot, 1979; Brauge i col., 1995). Els efectes i la durada de la hiperglicèmia depenen molt de l'espècie. Furuichi i Yone (1981) van demostrar que per a una mateixa dosi de glucosa la hiperglucèmia era més severa en una espècie carnívora com la seriola que en una omnívora com la carpa. En general sembla que com més carnívora sigui l'espècie més llarg serà el temps d'hiperglicèmia (Moon, 2001). Pels salmònids i per espècies marines el nivell òptim de carbohidrats digeribles en la dieta $\leq 20\%$ (revisat per Wilson, 1994).

Ingredients vegetals com a fonts de proteïnes

Limitacions de l'ús d'ingredients vegetals

Entre les principals limitacions de l'ús de proteïnes d'origen vegetal destaquen la reducció de la palatabilitat (Mackie i Mitchel, 1985; Reigh i Ellis, 1992; Gomes i col., 1995; Bureau i col., 1998; Refstie i col., 1998; Arndt i col., 1999), desequilibris d'aminoàcids com per exemple els sulfurats (Médale i col., 1998), la baixa disponibilitat del fòsfor i els efectes metabòlics dels factors antinutricionals (Alarcón i col., 1999; Francis i col., 2001), i la disminució de l'activitat dels enzims proteolítics (Dabrowsky i col., 1989; Rumsey i col., 1993). També cal tenir present que moltes proteïnes vegetals són deficientes en un o més AAE i per tant, en molts casos cal suplementar les dietes amb AAE cristal·lins (Murai i col., 1986; Kaushik, 1990; Kaushik i col., 1995).

Els factors antinutricionals (FAN) de les fonts vegetals són molt diversos: inhibidors de proteases, fitoestrogens, lectines, antivitaminas, fitases, saponins, diversos oligosacàrids i proteïnes antigèniques (Tacon i Jackson, 1985, Hendricks i Baileg, 1989; Macrae i col., 1993; Liener, 1994; Anderson i Wolf, 1995, Friedman, 1996; Alarcón i col., 1999). Els FANs es classifiquen segons la seva sensibilitat tèrmica (temperatura necessària per inactivar-los sense alterar el valor biològic dels altres components). Així, les lectines i els inhibidors de proteases i amilases són sensibles a la calor, mentre els tannins, oligosacàrids, saponines, fitoestrògens, fitats i alcaloides són resistents. A part del tractament tèrmic, existeixen altres estratègies per reduir el potencial nociu dels FAN. Mitjançant el cultiu selectiu es seleccionen aquelles varietats de colza, patata o tramús amb menor contingut d'alcaloides, glicosinolats, gossipol i àcid erúdic. Mitjançant extrusió i esclofollament (treure la clofolla) es redueix el contingut de tannins del tramús i de diverses lleguminoses.

La majoria de les fonts proteiques vegetals contenen fòsfor en forma de fitat. El fitat té una baixa biodisponibilitat pels peixos, donada l'absència de fitases al tracte gastrointestinal. Com a mesura pal·liativa, les dietes es suplementen amb fòsfor

inorgànic, o bé s'addicionen fitases microbianes (Rodehutschord i Pfeffer, 1995; Oliva-Teles i col., 1998).

Ingredients vegetals emprats en pinsos per peixos

A la Taula 1.1 es presenta la composició de les matèries primeres d'origen vegetal més emprades en la formulació de pinsos. Actualment, la soja (*Glycine max*) es considera una de les millors fonts proteiques ja que proporciona un perfil d'AA adient per a molts teleostis. Malauradament, conté un 30% de carbohidrats no digeribles i altres compostos que poden dificultar el procés digestiu (Rackis, 1974; Storebakken i col., 2000).

La colza (*Brassica napus*), presenta un perfil de proteïnes bastant ben equilibrat però conté una quantitat de cel·lulosa massa elevada.

El cereals com el blat (*Triticum aestivum*) i el blat de moro (*Zea mays*), són rics en midó (62% - 72%), bastant poc digerible en estat cru, però que, correctament tractat (cocció-extrusió) incrementa molt la seva digestibilitat, constituint una font energètica interessant per als peixos. Ara bé, el contingut proteic d'aquests cereals és pobre, especialment el contingut d'AAE i sobretot de lisina.

El tramús (*Lupinus sp*) és relativament ric en oli, no conté midó i presenta un contingut de proteïna i una composició d'AA similar a la soja, encara que és deficient en metionina.

Els pèsols (*Pisum sativum*) són les proteaginoses actualment més emprades en el mercat europeu. Tenen un percentatge de lípid i proteïna baix però són rics en midó, el qual confereix un gran poder aglutinant al pinso.

Taula 1.1. Composició de matèries primeres d'origen vegetal

	% en material seca				
	Extracte no nitrogenat	Midó (hidrolitzat acid)	Proteïna bruta	Lípids	Cendres
Tortó de soja	30.3 - 28.5	3.3 -3.1	42.5 - 48	1.8 - 1.9	6 - 6.2
Tortó de colza	33.3	5.2	38.7	1.8	7
Gluten de blat		10	79	5	1
Gluten de blat de moro	37.7		60	2.8	2.8
Blat	68.8	56	11.3	1.9	1.7
Blat de moro	69	60.5	9	4.2	1.6
Tramús extrusionat	27.6		47.1	9.6	3.4
Pèsol extrusionat	52.7	42.4	22	1.6	3.4

Tortó: co-producte de l'extracció de greixos. Informació extreta de Mambrini i Guillaume (1999).

Substitució de la farina de peix per proteïnes vegetals

A nivell de producció comercial la farina de peix s'ha reemplaçat per soja fins a un 50% en dietes per peix gat, carpa i molts teleostis tropicals i crustacis (Akiyama, 1988; Lovell, 1990; Tacon, 1993). A nivell experimental, s'ha estudiat la soja i els seus derivats (concentrats de proteïna de soja, fase soluble de l'extracte de soja etc.) per espècies d'interès aquícola. Els resultats són variables i depenen molt del tractament que hagi patit la soja. En la truita irisada, un 50% de substitució de la farina de peix per farina de soja redueix el creixement i la utilització de nutrients (Dabrowski i col., 1989; Kaushik i col., 1995). En canvi, un 20% de substitució amb farina de soja tractada amb infraroig o amb extracció de la fase insoluble, no altera ni el creixement, ni la taxa de conversió de l'aliment ni la retenció del nitrogen (Oliva-Teles i col., 1994). En l'orada, un 10, 20 i 30% de substitució amb farina de soja no afecta a la ingesta ni al creixement, però a mesura que incrementa el percentatge de substitució el contingut de lípids hepàtics augmenta i l'eficiència d'utilització de l'aliment i la proteïna, l'activitat tripsina i el contingut de glicogen hepàtic disminueixen (Robaina i col., 1995). Els millors resultats fins al moment s'han obtingut amb concentrats de proteïna de soja. En la truita irisada, el reemplaçament total de la farina de peix per concentrat de proteïna de soja no afecta ni al creixement ni a la utilització de nutrients (Kaushik i col., 1995). En canvi en l'orada, més d'un 30% de substitució amb concentrat de proteïna de soja provoca la disminució progressiva del contingut de lípids corporals, de la ingesta, del pes i de la retenció d'energia (Kissil i col., 2000).

Els estudis experimentals duts a terme amb tramús són prometedors. En la truita irisada, fins a un 40% de substitució de farina de peix per tramús sense clofolla no provoca un efecte negatiu sobre el creixement ni la utilització dels nutrients (Farhangi i Carter., 2001). El creixement, la taxa d'ingesta, el balanç nitrogenat i la digestibilitat de la dieta tampoc es veuen compromesos amb una substitució del 50% amb tramús extrusionat (Burel i col., 2000a,b). En l'orada, un 10, 20 i 30% de substitució amb tramús tampoc afecten ni al creixement ni a la ingesta, encara que l'activitat tripsina disminueix amb el 30% de substitució (Robaina i col., 1995).

El reemplaçament d'un 40% de farina de peix per farina de gira-sol en dietes per truita irisada no alteren la utilització de la proteïna i de l'energia de la dieta (Sanz i col.,

1994). La substitució del 20% de la farina de peix per farina de pèsol en dietes per orada tampoc compromet el creixement, la utilització de l'aliment o la digestibilitat de la proteïna (Pereira i Oliva-Teles, 2002). En relació a la colza, fins a un 66 % de concentrat de proteïna de colza en dietes per truita no provoca canvis en el creixement, la ingesta, l'eficiència d'utilització de l'aliment, de la proteïna i de l'energia (Teskeredzic i col., 1995). En l'orada, quantitats creixents de concentrat de proteïna de colza (30, 60, 100%) redueixen el creixement i la ingesta (Kissil i col., 2000).

Els productes formats a partir de fonts vegetals com el *colzapro* - llavor de colza i pèsols- i dietes formulades a partir d'una barreja d'ingredients vegetals (farina de tramús, fava, pèsol, gluten de blat de moro, soja i *colzapro*) poden substituir a la farina de peix fins a un 15%, en el cas del *colzapro* (Gomes i col, 1993) i fins a un 66%, en el cas de la barreja d'ingredients vegetals (Gomes i col., 1995), sense alterar el creixement de truites irisades.

Malgrat els importants avenços en aquest camp, la substitució total de la farina de peix per proteïnes vegetal és difícil perquè, en general, la inclusió d'una elevada quantitat de proteïna vegetal comporta una reducció del creixement i una menor eficiència d'utilització de l'aliment. A més a més, el coneixement que es té dels requeriments nutricionals de l'orada i de les possibles alternatives a la farina de peix és més limitat del que es coneix per espècies d'aigua dolça, tot i que l'orada és una de les espècies més importants cultivades en l'àrea mediterrània.

Els Isòtops Estables com a traçadors metabòlics

Tradicionalment els estudis de metabolisme en peixos s'han dut a terme amb isòtops radioactius. El perill que representa l'ús de la radioactivitat en termes de seguretat personal i de contaminació ambiental en estudis de camp fa que, des de fa uns anys, els isòtops estables es presentin com a bona alternativa al mètode tradicional.

Isòtops són totes aquelles formes d'un element donat (mateix pes atòmic) que contenen diferent número de neutrons. En els estudis de metabolisme, el terme "isòtop estable" s'aplica als isòtops no radioactius d'un element que són menys abundants que l'isòtop més abundant a la natura. A la taula 1.2 es mostra l'abundància natural dels isòtops estables més utilitzats en biologia. Com es pot observar, el ^{13}C té una contribució del 1.11% al total de C i el ^{15}N representa un 0.36% del total de N.

Taula 1.2: Abundància natural dels isòtops estables més utilitzats en biologia

^2H	0.016%				
^{13}C	1.11%				
^{15}N	0.36%				
^{17}O	0.04%	^{18}O	0.20%		
^{33}S	0.75%	^{34}S	4.21%	^{36}S	0.02%

La composició isotòpica d'un mostra es calcula com la relació d'un isòtop respecte a un altre ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Donada la diferent proporció dels diferents isòtops a la natura, la mesura de la composició isotòpica d'una mostra sol ser molt baixa. Per això, els resultats de composició isotòpica es normalitzen respecte a uns estàndards de referència i s'expressen en tant per mil (unitats δ).

L'estudi dels isòtops estables ha incrementat substancialment des de la dècada dels 80. La raó principal ha estat l'aparició d'equips d'espectrometria de masses de

relació isotòpica i el desenvolupament de softwares de control i d'adquisició de dades. Actualment, els espectrometres de masses de relació isotòpica (IRMS, Isotopic Ratio Mass Spectrometer) permeten mesurar variacions isotòpiques molt petites (0.01%).

La diferència de massa entre les formes isotòpiques d'un element provoquen diferències de comportament durant els processos físics i les reaccions químiques. Les formes isotòpiques lleugeres (^{12}C o ^{14}N) formen enllaços més dèbils i reaccionen més ràpidament que els isòtops pesats (^{13}C o ^{15}N) (Hoefs, 1980). Les diferències en l'energia d'enllaç i en les constants de reacció fan que l'abundància natural dels isòtops estables variï en funció de les espècies químiques (Hoefs, 1980; Farquhar i col., 1989; Hayes, 1993). Aquest canvi en l'abundància isotòpica entre espècies químiques, deguda a processos físics o químics, s'anomena **fraccionament isotòpic**. El fraccionament entre dues espècies químiques (A i B), o entre un substrat i un producte, es calcula com la diferència de composició isotòpica: $\delta A - \delta B$.

Els processos de fraccionament fan que els diferents materials biològics tinguin una signatura característica. Així, per exemple, la via de fotosíntesi de les plantes C4 i CAM provoca un menor fraccionament isotòpic que la via de les plantes C3 (O'Leary, 1988). Per aquesta raó les plantes C3 estan empobrides en ^{13}C ($\delta^{13}\text{C} = -34\text{‰}$ a -22‰) respecte a les C4 i CAM ($\delta^{13}\text{C} = -20\text{‰}$ a -10‰). Entre les diferents espècies químiques, els lípids estan empobrits en ^{13}C en relació a altres compostos (DeNiro i Epstein, 1977) ja que durant la síntesi dels lípids l'enzim piruvat deshidrogenasa oxida més ràpidament un grup carbonil amb ^{12}C que un grup carbonil amb ^{13}C (DeNiro i Epstein, 1977; Hayes, 1993). Durant la desaminació els grups ^{14}N -amino són eliminats preferentment i, conseqüentment, el N excretat està enriquit en ^{14}N en relació a la proteïna de l'animal (Steel i Daniel, 1978). Els processos de transaminació també afavoreixen la mobilització dels grups amino amb ^{14}N (Macko i col., 1986). Per aquestes raons, els animals d'un nivell tròfic superior (carnívors) presenten un nivell de $\delta^{15}\text{N}$ superior que els animals d'un nivell tròfic més baix (herbívors).

Variacions en l'abundància natural i el fraccionament dels isòtops estables

L'estudi de l'abundància natural dels isòtops estables ha permès establir relacions tròfiques entre animals salvatges, reconstruir dietes en paleontologia (revisat

per Gannes i col., 1998), mesurar el flux d'energia i nutrients en ecosistemes (Peterson i Fry, 1987; Rundel i col., 1989), i s'estan constituint com una eina cada vegada més poderosa pels estudis mediambientals (Lajtha i Michener, 1994; Marino i i McElroy, 1991). Ara bé, per poder fer inferències a partir dels resultats obtinguts amb isòtops estables cal tenir presents les següents consideracions. En primer lloc, l'abundància natural del ^{13}C i del ^{15}N d'un animal està fortament influïda per la composició isotòpica de la seva dieta (DeNiro i Epstein, 1978, 1981). En el cas del ^{15}N , les proteïnes d'un consumidor estan enriquides en ^{15}N (3‰ a 5‰) respecte a les proteïnes de la seva dieta. Aquesta diferència és causada pel fraccionament durant els processos de desaminació i la transaminació (DeNiro i Epstein, 1981; Ambrose i DeNiro, 1986). En els cas de ^{13}C la situació és més complexa. L'esquelet de carboni dels constituents d'una dieta (proteïna, lípids i carbohidrats) poden ser destinats a diferents components tissulars. Aquest fenomen s'anomena *isotopic routing* (Krueger i Sullivan 1984; Schwarcz, 1991). La segona consideració que cal tenir present és que, en diverses espècies d'animals, s'ha vist que la composició isotòpica de carboni i nitrogen varia entre els diferents teixits. Les variacions de ^{13}C s'han associat al diferent contingut de lípids, proteïnes o carbohidrats dels teixits (DeNiro i Epstein, 1978). Les variacions de ^{15}N han estat menys estudiades. Schmidt i col. (2004) han relacionat el contingut de ^{15}N dels teixits amb la diferent composició en AAE i AANE d'aquests.

Els estudis de composició isotòpica en peixos són molt escassos. En la truita irisada i en la vieira s'han observat diferències en la quantitat de ^{15}N i ^{13}C entre teixits que s'han relacionat amb el contingut de lípids (Pinnegar i Polunin, 1999; Lorrain i col., 2002). Sota el nostre coneixement no hi ha dades de l'orada.

Des del punt de vista fisiològic, diversos estudis indiquen que l'abundància natural del ^{15}N en els teixits i el fraccionament d'aquest isòtop entre la dieta i l'animal varia en funció de l'estat nutritiu de l'animal. Corbs americans (*Corvus brachyrhynchos*) alimentats amb proteïnes animals van créixer més ràpid i van mostrar menys fraccionament del ^{15}N entre la dieta i els teixits que corbs alimentat amb proteïnes vegetals (Hobson i Clark, 1992). Els autors suggereixen que l'estrès nutricional provocat per una dieta poc indicada per a aquests animals (dieta vegetal) va ser la causant del major fraccionament isotòpic. L'increment del ^{15}N es va associar a una major mobilització i redeposició de les proteïnes corporals i a un canvi en la composició d'AA dels teixits. Posteriorment, amb oques salvatges (*Chen rossii*), es va

comprovar que el dejuni provocava un increment de ^{15}N però no de ^{13}C (Hobson i col., 1993). Adams i Sterner (2000) van estudiar el fraccionament del ^{15}N en *Daphnia magna* alimentades amb algues amb diferent relació C:N. Aquests autors han demostrat per primera vegada que existeix una relació lineal entre el fraccionament isotòpic del ^{15}N i la relació C:N de l'aliment. Gaye-Siessegger i col. (2004) van alimentar a tilàpies amb dietes isoenergètiques i isolipídiques però amb diferent percentatge de proteïna. El fraccionament del N i del C era menor en els grups amb major deposició proteica. Trueman i col. (2005) han demostrat per primera vegada que el fraccionament del ^{15}N entre la dieta i els teixits del salmó està inversament relacionat amb la taxa de creixement. Per tant, la mesura del fraccionament isotòpic pot ser una eina per estudiar el balanç proteic, però els estudis són encara escassos.

Marcatge amb isòtops estables

Lluny de l'abundància natural, els isòtops estables poden ser administrats artificialment com a traçadors metabòlics. Tot i les diferències físiques i químiques existents, diversos estudis en humans (revisat per Koletzko i col., 1998) han demostrat que els isòtops estables són bons traçadors. Aquests, poden ser administrats per via oral o intravenosa, de forma individual o múltiple, en forma de molècula o com a ingredient sencer marcat uniformement. S'han emprat amb èxit en estudis de metabolisme en medicina, especialment en pediatria (Koletzko i col., 1998, Parimi i col., 2002) i en estudis de nutrició en humans - determinació de les taxes de reciclatge d'aminoàcids, glucosa o àcids grassos (Patterson i col., 1997, 2002), mesures d'oxidació d'aminoàcids (Kriengsinyos, i col., 2002), distribució de metabòlits concrets, determinació de rutes metabòliques i estudis farmacocinètics -.

El ^{15}N s'ha utilitzat en diversos estudis de metabolisme proteic en peixos. Així s'ha mesurat la síntesi proteica administrant per via oral un 0.5 % i un 1% de ^{15}N en la truita (Carter i col., 1994), la palaia anglesa (Carter i col., 1998) i la carpa (Meyer-Burgdorff i Rosenow, 1995a), o bé administrant per via venosa una sobrecàrrega de ^{15}N -Fenilalanina en el salmó atlàntic (Owen i col., 1999).

El carboni radioactiu (^{14}C) s'ha emprat extensament en estudis de metabolisme. En canvi, sota el nostre coneixement el ^{13}C només s'ha utilitzat per estudiar la biodisponibilitat d'aminoàcids de la dieta en larves de peix (Conceição i col., 2003).

A diferència de la radioactivitat que es troba en unes quantitats ínfimes en la natura, els isòtops estables del N i del C, es troben, de forma natural, en unes quantitats gens despreciables. Aquestes quantitats, relativament elevades, plantegen la qüestió de la dosi necessària d'isòtops per a ésser utilitzats com a traçadors de la proteïna de la dieta, és a dir, la quantitat mínima que cal administrar per via oral per marcar tots els múltiples destins de la proteïna de la dieta a diferents temps postprandials.

Aquesta tesi s'emmarca en un projecte europeu que té l'objectiu de crear les condicions per a la millor utilització de les fonts de proteïna vegetal. En aquesta línia, els objectius generals d'aquesta tesi són: posar a punt les metodologies necessàries per fer el seguiment de la proteïna de la dieta amb isòtops estables i estudiar l'efecte de la substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal sobre l'ús de la proteïna de la dieta en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i l'orada (*Sparus aurata*).

Seguint aquests objectius generals, els objectius concrets d'aquesta tesi són:

- i. Establir el protocol experimental i els mètodes d'anàlisi per quantificar la incorporació de ^{13}C i ^{15}N de la proteïna de la dieta en els teixits i els seus components principals (proteïna, lípid i glicogen) amb la finalitat d'estudiar l'ús de la proteïna de la dieta.
- ii. Determinar si la relació entre els aminoàcids essencials i els aminoàcids no essencials de la dieta modifica l'ús de la proteïna de la dieta en la truita irisada i l'orada.
- iii. Estudiar l'efecte de la substitució parcial i total de la farina de peix sobre l'ús de la proteïna de la dieta en la truita irisada i l'orada.
- iv. Posar a punt la tècnica per mesurar la incorporació de ^{13}C de la proteïna de la dieta en els aminoàcids lliures de plasma i múscul blanc per determinar si els ingredients vegetals provoquen imbalanços d'aminoàcids en la truita irisada i l'orada.
- v. Analitzar la influència dels ingredients vegetals sobre l'ús dels hidrats de carboni en la truita irisada i l'orada.
- vi. Determinar si la composició isotòpica natural de carboni i nitrogen de la truita irisada i l'orada està condicionada per la dieta consumida i el teixit.

1. Disseny experimental

1.1. BLOC EXPERIMENTAL I – Establiment del protocol experimental. Efecte de la relació Aminoàcids Essencials / Aminoàcids No Essencials de la dieta sobre la capacitat d'utilització de la proteïna en la truita irisada i l'orada

1.1.1. Dietes

Es van formular dues dietes (Taula 2.1) per a truita irisada i orada. Ambdues dietes de cada espècie eren isoproteiques i isoenergètiques. La font proteica estava constituïda per farina de peix (65 – 68%) i una barreja d'ingredients vegetals (33 – 35 %): gluten de blat, blat extrusionat, pèsol extrusionat i soja. Les dietes es van suplementar amb aminoàcids cristal·lins fins obtenir el perfil d'aminoàcids corresponent a la composició muscular de cada espècie (Taula 2.2). Les dietes RT i GSB s'estableixen com a dietes control amb una relació AAE/AANE de 1.03 per truita i 1.13 per orada. A les dietes RTglu i GSBglu, dietes experimentals, se'ls va addicionar àcid glutàmic, disminuint la relació EAA/NEAA a 0.82 per truita i 1.03 per orada. Les quatre dietes cobrien tots els requeriments nutritius establerts pel National Research Council (NRC, 1993).

1.1.2. Animals i condicions de cultiu

Truites irisades, de pes inicial 14.1 ± 0.04 g, van ser distribuïdes a l'atzar en 6 tancs experimentals (triplicats de dieta), amb 75 animals per tanc. Els tancs eren de fibra de vidre, d'1 m³ de volum. Els animals es van alimentar durant 12 setmanes (del 26 de març al 15 de juny) amb una o altra dieta, administrades manualment dues vegades al dia fins a sacietat (control visual). En finalitzar el període de creixement i per realitzar el protocol experimental, un grup de truites de cada condició, escollides a l'atzar, van ser

Taula 2.1: Ingredients i composició química de les dietes per a truita irisada i orada formulades amb diferent relació AAE/AANE

<i>Ingredients (g/kg)</i>	Truita irisada		Orada	
	RT	RTglu	GSB	GSBglu
Farina de peix (PC 70%)	389.93	316.39	499.98	478.06
CPSP G ¹	0	0	50	0
Gluten de Blat ²	71.39	0	0	0
Blat extrusionat	135.71	71.78	0	56.08
Pèsol extrusionat ³	215.09	56.82	199.15	0
Farina de Soja (PC 42%)	25.26	331.25	121.89	300
Oli de peix	101.59	109.48	83.61	94.51
Lligand (alginat de sodi)	10	10	10	10
Barreja mineral ⁴	10	10	10	10
Barreja de vitamines ⁵	10	10	10	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%)	10.89	16.06	0	0
L-His	1.77	1.75	2.04	2.00
L-Lys	6.46	5.94	3.14	4.85
L-Met	0.91	1.99	0.95	1.18
L-Thr	1.53	1.73	0.60	1.54
L-Ile	5.92	4.1	5.57	4.58
L-Val	3.54	2.71	3.07	2.61
L-Glu	0	50	0	24.58
Composició química				
Matèria seca (MS, %)	92.2	90.5	92.1	93.7
Proteïna (% MS)	45.1	46.3	52.7	53.0
Lípids (% MS)	15.6	16.4	15.7	16.4
Energia bruta (kJ/g DM)	22.4	22.1	22.5	22.5

Aquestes dietes van ser formulades a l'Institut Nacional de Recerca Agrònoma de França (INRA, St. Pée Sur Nivelles). PC: proteïna crua. MS: matèria seca. ¹Concentrat de proteïnes de peix solubles (Sopropêche; Boulogne sur Mer, France). ²Amylum, Holanda. ³Aquatex, França. ^{4,5}d'acord amb NRC (1993).

Taula 2.2 Composició analítica dels aminoàcids de les dietes per a truita irisada i orada formulades amb diferent relació AAE/AANE

Aminoàcid (%MS)	RT	RTglu	GSB	GSBglu
ARGININA	2.60	2.58	3.26	3.25
HISTIDINA	1.10	1.12	1.41	1.33
ISOLEUCINA	1.98	1.85	2.60	2.84
LEUCINA	3.05	2.96	3.68	3.85
LISINA	3.21	3.54	4.05	4.05
METIONINA	1.01	1.02	1.29	1.30
CISTEINA	0.49	0.47	0.49	0.53
FENILALANINA	1.71	1.63	2.04	2.09
TIROSINA	1.32	1.30	1.56	1.57
TREONINA	1.81	1.89	2.16	2.18
TRIPTOFÀ	0.43	0.53	0.56	0.59
VALINA	2.19	1.97	2.78	2.84
Alanina	2.21	2.18	2.98	2.85
Àcid Aspàrtic	3.40	3.97	4.80	4.84
Àcid Glutàmic	8.09	13.27	6.87	9.74
Glicina	2.37	2.29	3.10	2.86
Prolina	2.25	1.87	3.00	3.16
Serina	1.89	1.94	2.09	2.12
AAE	20.90	20.86	25.86	26.42
AANE	20.21	25.52	22.86	25.57
AAE/AANE	1.03	0.82	1.13	1.03

Valors proporcionats per l'INRA. Els AAE estan indicats en lletres majúscules i els AANE amb minúscules. MS: matèria seca.

transportades a les instal·lacions de l'INRA de St. Pée Sur Nivelles, on van ser aclimatades durant dues setmanes (fins el 2 de juliol), distribuïdes en tancs cònics de 60 litres. A llarg de tot el període de creixement la temperatura de l'aigua es va mantenir constant a $17 \pm 1^\circ\text{C}$ i la llum va seguir els canvis del fotoperíode natural.

Orades procedents de Tina Menor (Santander) i amb un pes inicial 14.7 ± 0.1 g van ser aclimatades durant vint dies a les instal·lacions de l'Institut d'Aqüicultura de Torre la Sal (IATS, Castelló). Un cop aclimatades, es van establir 6 grups (triplicats de dietes) de 90 individus cadascun, en tancs de fibra de vidre de 500 L de capacitat. El flux d'aigua marina entrant era de 10L /min, i el contingut d'oxigen superior al 85% de saturació. Les orades es van alimentar durant 12 setmanes (del 27 d'abril al 25 de juliol) amb la dieta control o amb l'experimental, administrades manualment dues vegades al dia fins a sacietat (control visual). Al llarg de tot el període de creixement la llum i la temperatura van seguir el cicle natural, incrementant la temperatura de 17°C a 25°C . Els experiments amb orada van ser realitzats a les mateixes instal·lacions de l'IATS.

1.1.3. Protocol experimental

En un estudi previ als estudis presentats en aquesta tesi es va administrar a un grup de truites i orades unes dietes marcades amb un 1% de ^{15}N i un 1% de ^{13}C -proteïna d'*Spirulina* i es va mostrejar a 11 i 24 hores postingesta. La dosi de ^{13}C va resultar insuficient per marcar el teixit muscular. En canvi, el ^{15}N no va presentar aquest problema ja que superàvem en un 3% la seva abundància natural. Com a conclusió, en els estudis que es presenten en aquesta tesi, les dietes es van marcar amb un 3% de ^{13}C i un 1% de ^{15}N , per tal de mantenir la proporció que es troba a la natura entre aquests dos isòtops.

Per dur a terme aquest primer bloc experimental es van prendre divuit truites i divuit orades de cada dieta que van ser lleugerament anestesiades (2,3-difenoxietanol), previ dejuni de 24 hores, i forçades a ingerir una ració de l'1% del seu pes corporal de les corresponents dietes marcades. El marcatge va consistir en addicionar un 3% de ^{13}C -proteïna d'*Spirulina* i un 1% de ^{15}N -proteïna d'*Spirulina* (Martek Biosciences Corp., Columbia, USA) uniformement marcades en tots els àtoms ($>98\%$ ^{13}C i $>98\%$ ^{15}N). La ingesta forçada es va realitzar amb cànules gàstriques, sota lleugera anestèsia. L'enriquiment de les dietes es mostra a la Taula 2.3.

Simultàniament, 2 peixos de cada dieta i espècie van rebre un 1% de dieta on s'havia addicionat un 4% d'*Spirulina* sense marcar (*Spirulina* delipidada). Aquests animals constituïen el blanc de l'experiment.

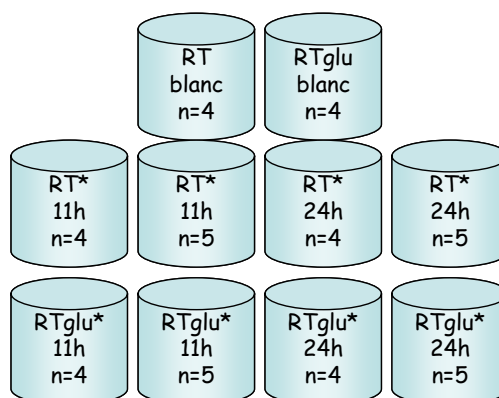
Taula 2.3: Percentatge d'àtoms en excés (APE) de ^{13}C i ^{15}N de les dietes experimentals

<i>Dieta</i>	APE ^{13}C		APE ^{15}N	
RT	2.90	0.002	0.96	0.003
RTglu	2.91	0.002	0.96	0.002
GSB	2.90	0.004	0.84	0.002
GSBglu	2.73	0.005	0.78	0.004

Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de les dietes marcades (n=4) on s'ha descomptat l'abundància natural d'ambdós isòtops (n=4). Les mostres es van analitzar per anàlisi elemental – espectrometria de masses de relació isotòpica.

Després de la ingesta (realitzada en un màxim de 2 minuts per peix) els animals van ser recuperats ràpidament i ubicats als tancs experimentals (Figura 2.1).

Figura 2.1 : Esquema de la distribució dels tancs per a realitzar els experiments amb truita irisada. La distribució va ser la mateixa per als experiments amb orada. Els animals que van rebre la dieta marcada amb ^{13}C i ^{15}N es van disposar en els tancs marcats amb *.



Passades 11 i 24 hores de la ingesta, 9 peixos experimentals i 2 blancs de cada dieta van ser sacrificats seccionant l'espina dorsal, prèvia extracció d'1 ml de sang per punció a la vena caudal amb xeringues heparinitzades. Es van prendre mostres de fetge, múscul blanc, paquet visceral incloent greix perivisceral (PV+G) i resta de peix (anomenada carcassa). Les mostres van ser congelades ràpidament en nitrogen líquid i posteriorment conservades a -80°C fins el moment de l'anàlisi. Es van determinar els índexs somàtics i es va analitzar el contingut de lípid, proteïna i glicogen en els teixits i la incorporació de marcatge a aquests.

La sang es va centrifugar a 12.000 g i es va separar el plasma, el qual va ser conservat en neu carbònica durant el transport a les instal·lacions de la facultat. Posteriorment les mostres es van conservar a -80°C fins al moment de l'anàlisi.

1.1.4. Anàlisi estadística

Els diferents paràmetres van ser comparats mitjançant la prova T per a dades independents (paquet estadístic SPSS 11.0). Els resultants es consideren significatius quan $P < 0.05$.

1.2. BLOC EXPERIMENTAL II - Substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal en la truita irisada. Ús de la proteïna de la dieta

1.2.1. Dietes

Es van formular quatre dietes (Taula 2.4) que contenien o bé farina de peix com a única font proteica (dieta FM) o bé quantitats creixents d'ingredients vegetals (dietes PP50, PP75 i PP100), que reemplaçaven la proteïna animal en un 50%, 75% i 100% respectivament. Com a ingredients vegetals es va incloure farina de gluten de blat de moro, gluten de blat, pèsol extrusionat i farina de colza. Donat que la farina de peix aporta un major contingut de lípids, es va addicionar oli de peix en diferents quantitats per tal d'obtenir un percentatge similar de lípids en totes les dietes. En quant a la font d'hidrats de carboni, com les fonts vegetals contenen midó i les animals no, es va afegir blat extrusionat (60% de midó) en quantitats pertinents per obtenir nivells similars de midó.

Totes les dietes eren isoenergètiques i isoproteiques (Taulas 2.5 i 2.6) i cobrien els requeriments nutricionals establerts per truita pel National Research Council (1993).

Les dietes vegetals es van suplementar amb aminoàcids essencials cristal·lins per reflectir la composició aminoacídica del múscul. En les quatre dietes la relació AAE/AANE era propera a 1 (Taula 2.7)

1.2.2. Condicions de cultiu

Aquest estudi es va dur a terme amb truites irisades cultivades a les instal·lacions experimentals de l'Institut de Recerca Agrònoma de Donzaq (INRA, França). Els animals, de pes inicial 19 grams, van ser cultivats des del 21 de març fins al 17 de juny. Es van distribuir 75 animals per dieta en 16 tancs de fibra de vidre d'un m³ (quaduplicats de dieta). Les dietes es van distribuir manualment fins a sacietat (control visual) 2 vegades al dia. La temperatura es va mantenir a 17±1°C i el fotoperíode va ser el corresponent a l'època de l'any i latitud.

Taula 2.4: Ingredients de les dietes per a truita irisada formulades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

<i>Ingredients (g/kg)</i>	FM	PP50	PP75	PP100
Farina de peix	637.9	319	159.5	0
Farina de gluten de blat de moro	0	116	177.1	232.4
Gluten de blat	0	100	150	200
Pèsol extrusionat ¹	0	80	120	163.3
Farina de colza ²	0	46.9	75	100
Blat extrusionat	203.4	110.2	42.5	0
Oli de peix	128.6	143.6	151.1	158.7
Lligand (alginat de sodi)	10	10	10	10
Barreja mineral ³	10	10	10	10
Barreja de vitamines ⁴	0	10	10	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	0	16.1	37.8	40
L-Arg	0	6.2	9.5	12.5
L-His	0	1.9	2.9	3.9
L-Lys	0	13.8	20.8	27.6
DL-Met	0	2.0	3.1	4.1
L-Trp	0	1.3	2.1	2.7
L-Thr	0	4.1	6.2	8.3
L-Ile	0	3.5	5.3	7.1
L-Val	0	4.7	7.0	9.4

Dietes formulades a l'Institut de Recerca Agrònoma de França (INRA). ¹ Aquatex , França. ² Primor 00. ^{3,4} d'acord amb NRC (1993).

Taula 2.5: Composició química de dietes per a truita irisada formulades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Matèria seca (MS, %)	94.4	92.2	91.5	91.6
Proteïna (% MS)	51.5	50.3	49.1	48.6
Lípids (% MS)	19.7	19.6	19.6	19.2
Midó (%MS)	13.8	11.7	10.2	10.5
Energia bruta (KJ/g MS)	22.7	23.5	23.9	23.6
Fòsfor (kJ/g MS)	1.9	1.4	1.6	1.3
Cendres (%MS)	7.7	7.4	6.9	5.9

Aquestes dades corresponen a la composició química analítica realitzada per l'equip de l'INRA. MS: matèria seca

Taula 2.6: Digestibilitat de la matèria seca, dels nutrients i l'energia de dietes per a truita irisada formulades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Matèria seca	83.4	79.2	76.8	72.0
Proteïna	93.4	93.7	93.9	93.6
Lípids	95.6	92.8	91.6	90.3
Midó	99.2	80.7	75.5	56.2
Energia	92.0	87.7	86.4	82.7

Valors analítics proporcionats per l'INRA. La digestibilitat es va analitzar segons Kim i Kaushik (1992).

Taula 2.7: Composició analítica dels aminoàcids de dietes per a truita irisada formulades amb diferent percentatge de proteïna vegetal

Aminoàcids (%MS)	FM	PP50	PP75	PP100
ARGININA	3.5	2.6	2.4	3.3
HISTIDINA	0.9	1.0	1.0	1.2
ISOLEUCINA	1.8	1.7	1.9	2.2
LEUCINA	3.3	4.5	4.0	4.2
LISINA	4.0	3.6	3.6	3.5
METIONINA	1.2	1.2	0.9	0.9
FENILALANINA	1.6	1.9	2.0	2.0
TIROSINA	1.4	1.8	1.5	1.5
TREONINA	2.4	2.4	2.4	2.3
VALINA	2.1	2.2	2.4	2.8
Alanina	2.9	2.5	2.2	2.0
Àcid aspàrtic	4.2	3.6	2.6	2.1
Àcid glutàmic	7.4	9.9	11.1	12.8
Glicina	3.1	2.2	1.7	1.4
Prolina	2.1	2.8	2.5	3.3
Serina	2.1	2.3	2.0	2.1
AA Totals	44.7	46.7	45.0	48.1
AAE	22.6	23.2	22.6	24.2
AANE	22.0	23.5	22.3	23.8
AAE/AANE	1.0	0.9	1.0	1.0

Valors proporcionats per l'INRA. Els AAE estan indicats en lletres majúscules i els AANE amb minúscules. MS: matèria seca.

En finalitzar el període de creixement les truites es van transportar a les instal·lacions de St. Pée sur Nivelles per realitzar el protocol experimental. Els animals van ser distribuïts en tancs cònics de 60 litres, van ser adaptats a les mateixes condicions de cultiu que a Donzaq i es van alimentar amb les mateixes dietes fins el dia del mostreig.

1.2.3. Protocol experimental

De la mateixa manera que en el bloc experimental I, el dia de l'experiment les truites van ser alimentades amb les corresponents dietes marcades amb isòtops estables. La via d'administració de la dieta, les dosis de marcatge i els temps de mostreig van ser els mateixos que els descrits al punt 1.1.3: administració oral (1% del pes corporal) de la corresponent dieta marcada amb un 3% de ^{13}C -proteïna d'*Spirulina* i 1% de ^{15}N -proteïna d'*Spirulina*, ambdós marcadors d'una puresa del 98% (*Martek Biosciences Corp.*).

Dotze animals de cada condició experimental van rebre la dieta marcada i dos animals van rebre una dieta amb un 4% de *Spirulina* sense marcar.

El marcatge dels pinsos va ser analitzat per anàlisi elemental - espectrometria de masses de relació isotòpica. L'enriquiment en ^{13}C i ^{15}N es mostra a la Taula 2.8. Cal esmentar que el marcatge de ^{15}N de la dieta PP50 va ser més elevat del que s'havia calculat teòricament. Després de la ingesta forçada els animals es van recuperar i es van distribuir com es mostra en la Figura 2.2.

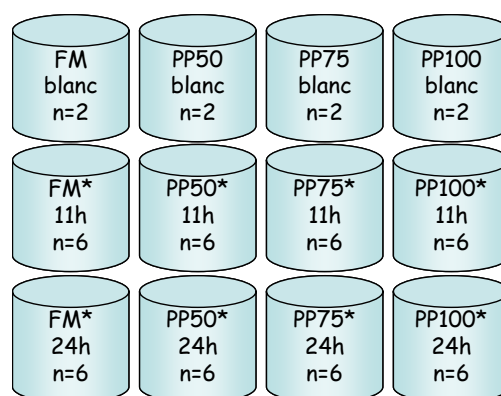


Figura 2.2: Esquema de la distribució dels tancs. De cada tanc de peixos blancs es va prendre un animal per a cada temps de mostreig. Els animals que van rebre la dieta marcada amb ^{13}C i ^{15}N es van disposar en els tancs marcats amb *.

Onze i vint-i-quatre hores després de la ingesta es van mostrejar 6 truites de cada condició. Es van prendre mostres de sang per punció a la vena caudal amb xeringues heparinitzades. La sang es va centrifugar, una part de la fracció plasmàtica (400 μl) es

va desproteïnitzar per obtenir els aminoàcids lliures (protocol descrit al punt 2.4.1.) i una alíquota de 50 µl es va separar per valorar la proteïna plasmàtica i la glucosa (punts 2.2.1. i 2.2.2. respectivament). La resta del plasma es va guardar en un altre tub eppendorf. Els plasmes es van congelar amb neu carbònica i posteriorment es van conservar a -80°C.

Posteriorment els animals es van sacrificar seccionant l'espina dorsal i es van prendre mostres de fetge, múscul blanc, paquet visceral incloent greix perivisceral (PV+G) i resta de peix (anomenada carcassa). Les mostres de teixit es van congelar immediatament en nitrogen líquid i posteriorment es van conservar a -80°C. Es van determinar els índexs somàtics i es va analitzar el contingut de lípid, proteïna i glicogen en els teixits i la incorporació de marcatge a aquests.

Taula 2.8: Percentatge d'àtoms en excés (APE) de ^{13}C i ^{15}N de les dietes experimentals

Dieta	APE ^{13}C		APE ^{15}N	
FM	2.66	0.03	0.87	0.02
PP50	2.36	0.03	1.48	0.06
PP75	2.62	0.04	1.18	0.02
PP100	2.38	0.02	0.88	0.01

Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana de les dietes marcades (n=4) on s'ha descomptat l'abundància natural d'ambdós isòtops (n=4). Les anàlisis han estat realitzades per la tècnica d'anàlisi elemental – espectrometria de masses de relació isotòpica

1.2.4. Anàlisi estadístic

L'efecte de la font proteica sobre els diferents paràmetres analitzats es va testar per anàlisi de la variança (ANOVA) d'una via. Les diferències entre grups van ser determinades per les proves de comparació múltiple de Tukey, quan s'assumia homogeneïtat de variàncies, o de T3 Dunet, quan no s'assumia homogeneïtat de variàncies. Per una mateixa dieta, els resultats de 11 i 24 hores postingesta van ser contrastats per la prova T per a dades independents. Si no s'especifica el contrari els resultats es consideren significatius quan $P < 0.05$. Totes les anàlisis van ser realitzades amb el programa SPSS 11.0.

1.3. BLOC EXPERIMENTAL III – Substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal en l'orada. Ús de la proteïna de la dieta

1.3.1. Dietes

Es van formular quatre dietes per orada (Taula 2.8) amb diferent percentatge de farina de peix i fonts vegetals. La dieta FM tenia farina de peix com a única font proteica. Les dietes PP50, PP75 i PP100 estaven elaborades amb percentatges creixents de fonts vegetals (50%, 75% i 100% respectivament): farina de gluten de blat de moro, gluten de blat, pèsols extrusionats, farina de colza i tramús dolç. Tanmateix, donat que la farina de peix aporta un major contingut de lípids, es va addicionar oli de peix en diferents quantitats per tal d'obtenir un percentatge similar de lípids en totes elles. En quant a la font d'hidrats de carboni, es van incorporar quantitats pertinents de blat extrusionat, que conté un 60% de midó, per tal d'obtenir dietes amb un contingut similar de midó.

Totes les dietes eren isoenergètiques i isoproteiques (Taula 2.9) i cobrien els requeriments nutricionals establerts per l'orada pel National Research Council (1993).

Les dietes vegetals es van suplementar amb aminoàcids essencials cristal·lins per reflectir la composició aminoacídica del múscul (Taula 2.10). En les quatre dietes la relació EAA/NEAA era propera a 1.1.

1.3.2. Condicions de cultiu

Aquest estudi es va dur a terme amb orades cultivades a les instal·lacions experimentals de l'Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal (CSIC, Castelló). Els animals, de pes inicial 16-17 grams, van ser cultivats des del 29 d'abril fins al 29 de juliol. Els animals estaven distribuïts a raó de 90 animals per tanc, en 12 tancs de fibra de vidre de 500 litres de capacitat (triplicats de dieta).

Taula 2.8: Ingredients de les dietes per a orada formulades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

<i>Ingredients (g/kg)</i>	FM	PP50	PP75	PP100
Farina de peix	703.7	352.0	176.0	0
Farina de gluten de blat de moro	0	120.0	180.0	250.0
Gluten de blat	0	120.0	180.0	250.0
Pèsols extrusionats ¹	0	60.0	90.0	120.0
Farina de colza ²	0	30.9	67.2	27.3
Tramús dolç	0	0	0	6.9
Blat extrusionat	142.0	94.9	30.6	15.5
Oli de peix	124.3	141.3	149.8	158.0
Lligand (Alginat de sodi)	10.0	10.0	10.0	10.0
Barreja mineral ³	10.0	10.0	10.0	10.0
Barreja de vitamines ⁴	10.0	10.0	10.0	10.0
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	0	6.5	30.7	51.1
L-Arg	0	7.6	11.3	15.9
L-His	0	2.3	3.4	4.8
L-Lys	0	15.9	23.6	32.5
DL-Met	0	2.5	3.6	5.4
L-Trp	0	1.4	2.2	2.9
L-Thr	0	5.0	7.4	10.4
L-Ile	0	4.2	6.2	8.4
L-Val	0	5.4	8.0	11.1

Dietes formulades a l'Institut de Recerca Agrònoma de França (INRA). ¹ Aquatex , França. ² Primor 00. ^{3,4} d'acord amb NRC (1993)

Taula 2.9: Composició química de les dietes orada a formulades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Matèria seca (MS, %)	93.7	94.3	91.1	90.1
Proteïna (% MS)	46.1	47.5	44.8	42.8
Lípid (% MS)	16.5	16.6	17.2	16.8
Energia bruta (KJ/g MS)	20.4	21.3	21.4	21.7

Aquestes dades corresponen a la composició química analítica realitzada per l'equip de l'INRA. MS: matèria seca

Figura 2.10: Composició analítica dels aminoàcids de les dietes per a orada formulades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

Aminoàcid (%MS)	FM	PP50	PP75	PP100
ARGININA	6.5	6.5	5.5	5.5
HISTIDINA	2.2	2.5	2.7	2.9
ISOLEUCINA	4.8	4.8	5.0	5.5
LEUCINA	8.2	8.3	8.7	9.5
LISINA	8.6	9.5	10.3	7.0
METIONINA	2.7	2.7	2.5	2.7
FENILALANINA	4.2	4.4	4.6	5.0
TREONINA	4.2	4.2	4.4	4.8
TIROSINA	3.5	3.3	3.5	3.7
VALINA	5.5	5.7	6.1	6.5
TRIPTOFÀ	1.2	1.2	1.2	1.2
Alanina	6.8	5.4	4.9	4.4
Àcid Aspàrtic	10.3	6.9	5.7	4.5
Àcid Glutàmic	15.5	18.5	22.2	25.8
Glicina	6.8	4.6	3.9	2.9
Prolina	4.0	5.1	6.0	7.6
Serina	4.2	4.0	4.4	4.5
AAE (%)	50.3	51.9	53.4	53.1
AANE (%)	47.6	44.6	47.0	49.6
AAE/AANE	1.06	1.16	1.14	1.07

Valors proporcionats per l'INRA. Els AAE estan indicats amb lletres majúscules i els AANE amb minúscules. MS: matèria seca.

Les dietes es van distribuir manualment fins a sacietat (control visual) 2 vegades al dia. Durant tot el període de creixement el fotoperíode i la temperatura van seguir els canvis estacionals naturals, incrementant la temperatura des de 17°C a l'inici de l'experiment fins a 25°C en finalitzar. El flux d'aigua era de 20 L/min i la concentració d'oxigen sempre superior al 85% de saturació.

1.3.3. Protocol experimental

El protocol experimental realitzat va ser exactament el mateix que el descrit en els experiments anteriors: en finalitzar el període de creixement els animals van ser alimentats amb les corresponents dietes marcades amb isòtops estables i mostrejats a 11 i 24 hores postingesta. La via d'administració de la dieta i les dosis de marcatge van ser els mateixos que els descrits anteriorment: administració oral (1% del pes corporal) de la corresponent dieta marcada amb un 3% de ^{13}C -proteïna d'*Spirulina* i 1% de ^{15}N -proteïna d'*Spirulina*, ambdós marcadors d'una puresa del 98% (*Martek, Biosciences Corp.*). Dotze animals de cada dieta van rebre la dieta marcada i dos animals van rebre una dieta amb un 4% de *Spirulina* sense marcar.

El marcatge dels pinsos va ser analitzat per anàlisi elemental - espectrometria de masses de relació isotòpica. L'enriquiment en ^{13}C i ^{15}N es mostra a la Taula 2.11.

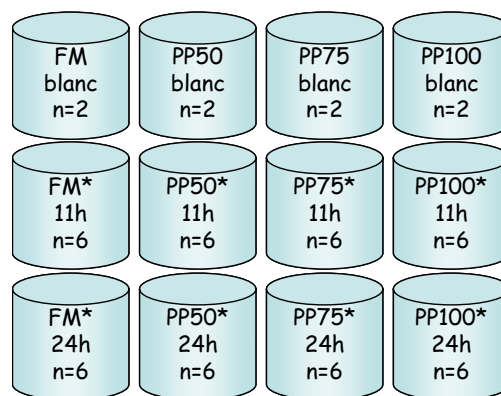
Taula 2.11: Percentatge d'àtoms en excés (APE) de ^{13}C i ^{15}N de les dietes experimentals

<i>Dieta</i>	APE ^{13}C		APE ^{15}N	
FM	2.66	0.006	1.14	0.003
PP50	2.69	0.003	1.15	0.005
PP75	2.61	0.008	0.92	0.003
PP100	2.71	0.016	0.81	0.005

Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de les dietes marcades (n=4) on s'ha descomptat l'abundància natural d'ambdós isòtops (n=4). Les anàlisis es van realitzar per la tècnica d'anàlisi elemental – espectrometria de masses de relació isotòpica

Després de la ingesta forçada els animals es van recuperar i es van distribuir com es mostra a la Figura 2.3.

Figura 2.3: Esquema de la distribució dels tancs. De cada tanc de peixos blancs es va prendre un animal per a cada temps de mostreig. Els animals que van rebre les dietes marcades amb ^{13}C i ^{15}N es van disposar en els tancs marcats amb *.



Es van mostrejar 6 animals de cada dieta 11 hores després de la ingesta i 6 més a 24 hores. Es van prendre mostres de sang per punció a la vena caudal amb xeringues heparinitzades. La sang es va centrifugar, una part de la fracció plasmàtica (400 μl) es va desproteïtzar per obtenir els aminoàcids lliures (protocol descrit al punt 2.4.1.) i una alíquota de 50 μl es va separar per valorar la proteïna plasmàtica i la glucosa (punts 2.2.1. i 2.2.2. respectivament). La resta del plasma es va guardar en un altre tub eppendorf. Totes les mostres van ser congelades amb neu carbònica i posteriorment es van conservar a -80°C .

Posteriorment els animals es van sacrificar seccionant l'espina dorsal i es prengueren mostres de fetge, múscul blanc, paquet visceral incloent greix perivisceral (PV+G) i resta de peix, anomenada carcassa. Les mostres de teixit es van congelar immediatament en nitrogen líquid i posteriorment es van conservar a -80°C .

1.3.4. Anàlisi estadística

L'efecte de la dieta sobre els diferents paràmetres analitzats va ser testat per anàlisi de la variança (ANOVA) d'una via. Les diferències entre grups van ser determinades per proves de comparació múltiple (Tukey, quan existia homogeneïtat de variàncies, i T3 Dunet, quan no existia homogeneïtat de variàncies). Per una mateixa dieta, els resultats a 11 i 24 hores postingesta van ser contrastats per la prova T per a dades independents. Els resultats es consideren significatius quan $P < 0.05$. Les proves estadístiques es van realitzar amb el programa SPSS 11.0.

1.4. BLOC EXPERIMENTAL IV – Influència dels ingredients vegetals en l'ús dels hidrats de carboni en la truita irisada i l'orada

Aquest estudi es va dur a terme amb les truites i les orades adaptades a les dietes FM i PP100. Les dietes per cada espècie, els períodes de creixement i les condicions de cultiu es troben descrites en els blocs experimentals II (1.2) i III (1.3).

En finalitzar els períodes de creixement, quatre truites de cada dieta i cinc orades van ser lleugerament anestesiades (2,3-difenoxietanol) i van rebre una ració de l'1% dels seu pes corporal de dietes prèviament marcades amb un 3% de midó- ^{13}C (^{13}C -midó d'alga, Martek Biosciences Corp.). Un animal de cada espècie i grup va rebre la mateixa ració de dieta sense marcar. El marcatge dels pinsos va ser analitzat per anàlisi elemental - espectrometria de masses de relació isotòpica. L'enriquiment de ^{13}C , expressat com a percentatge d'àtoms en excés, era 2.68 per la dieta FM de truita i 2.65 per la PP100. L'enriquiment de les dietes per orada era 2.66 per FM i 2.84 per PP100.

Després de la ingesta els animals van ser recuperats i distribuïts en tancs experimentals, tal com mostra la Figura 2.4. Els animals van ser sacrificats a les onze hores de la ingesta. Es van prendre mostres de sang, fetge, múscul blanc, paquet visceral + greix perivisceral (PV+G) i la resta del peix (anomenada carcassa). Les mostres de teixit es van congelar immediatament en nitrogen líquid i posteriorment es van conservar a -80°C .

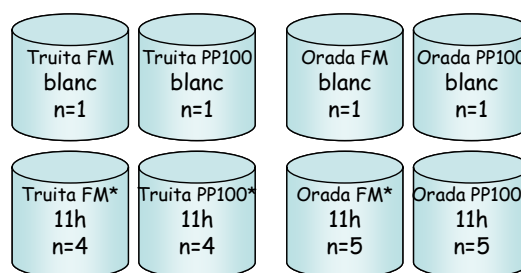


Figura 2.4: Esquema de la distribució dels tancs experimentals. Els animals que van rebre la dieta marcada amb ^{13}C es van disposar en els tancs marcats amb *.

Per testar l'efecte de la dieta sobre la capacitat d'ús i transformació dels hidrats de carboni, els diferents paràmetres analitzats es van comparar per la prova T per a dades independents (paquet estadístic SPSS 12.0). Els resultats es consideren significatius quan $P < 0.05$.

1.5. BLOC EXPERIMENTAL V – Isòtops estables (^{15}N i ^{13}C) en la truita irisada i l'orada: variacions de l'abundància natural

Aquest estudi es va realitzar amb les truites i les orades adaptades a les diferents dietes experimentals presentades en els blocs I (1.1), II (1.2) i III (1.3). Els resultats que es presenten en aquest bloc estan expressats en unitats δ (‰ de l'isòtop pesant respecte al lleuger). Els valors de δ de l'organisme sencer són una estima dels valors reals, ja que es van calcular a partir dels valors obtinguts en els diferents teixits.

L'anàlisi estadístic es va realitzar amb el programa SPSS 12.0. L'anàlisi es va fer de forma independent per a cada espècie. L'efecte de la dieta consumida i/o del tipus de teixit sobre l'abundància natural de ^{15}N i ^{13}C en tot l'animal, en cadascun dels teixits i en els components principals (proteïna, glicogen i lípid) es va testar mitjançant el test ANOVA de dues vies. En tots els casos quan es trobaven diferències significatives es realitzaven els tests de comparació múltiple de Tukey o T3-Dunnet. Les relacions lineals es van testar per regressió simple. Els resultat es consideren significatius quan $P < 0.05$.

2. Mètodes d'Anàlisi

2.1. Components principals de teixit

Consideracions:

Les mostres de teixits (fetge, múscul blanc i paquet visceral + greix perivisceral) es van homogenar amb un morter amb N₂ líquid. La fracció corresponent a la resta del peix (carcassa) es va homogenar emprant una trituradora (*Pacojet PJI, Pacojet AG, Suïssa*) que permetia processar la mostra entre -18 °C i -23 °C.

2.1.1. Determinació dels índexs somàtics

Índex hepatosomàtic (IHS) = g fetge · 100 g⁻¹ pes corporal (pes fresc)

Índex músculosomàtic (IMS) = g múscul · 100 g⁻¹ pes corporal (pes fresc)

Índex viscerosomàtic (IVS) = g vísceres · 100 g⁻¹ pes corporal (pes fresc)

2.1.2. Contingut d'aigua

El contingut d'aigua es va determinar per gravimetria. Es van pesar mostres de teixit (200 – 250 mg) en safates d'alumini dessecades i prèviament tarades. Després de 24 hores a 105°C el contingut d'aigua es va determinar per diferència de pes. El contingut d'aigua no es presenta com a resultat en sí, però va servir per realitzar càlculs posteriors.

2.1.3. Extracció i quantificació de lípids

L'extracció de lípids es va fer d'acord amb el mètode de Folch i col. (1957). L'extracte lipídic es va quantificar per gravimetria.

Reactius: - Cloroformo:metanol (2:1) (C:M) (*Panreac*)

- Clorur magnèsic 0.017% (*Panreac*)

Procediment:

Es van pesar 300 mg de mostres homogènies de fetge, carcassa o paquet visceral + greix perivisceral (PV+G) i 700 mg de múscul. Els lípids es van extreure amb cloroformo:metanol 2:1 (4 ml), homogenitzant amb un politró (*Polytron PT 3000, Kinematica AG, Suïssa*), en el cas del fetge, o agitant durant 5 hores, en el cas dels altres teixits. La separació dels lípids (fracció de cloroform) de les molècules hidrosolubles (fracció de metanol) es va fer addicionant clorur magnèsic 0.017% (2 ml) i centrifugant a 2000 rpm (*Sorvall TC6*), durant 15 minuts a temperatura ambient. El procés d'extracció es va repetir tantes vegades com fos necessari fins a aconseguir l'extracció completa.

L'extracte lipídic es va filtrar amb un embut de vidre i paper de filtre Whatman nº1 (*Whatman International Ltd., UK*). El filtrat es va recollir en vials prèviament tarats i tractats amb cloroform per tal de minimitzar la presència de greix. El cloroform es va evaporar sota campana i es van pesar els vials amb el lípid cru. El contingut lipídic es va determinar per diferència de pes. Els resultats s'expressen com a g lípid · 100 g⁻¹ de teixit fresc (% en pes fresc). Els lípids es van conservar en un dessecador per tal de prendre mostres per a l'anàlisi isotòpic.

2.1.4. Extracció i quantificació de proteïnes

A partir de les mostres anteriorment delipidades, es va procedir a la precipitació de la proteïna mitjançant àcid trifluoroacètic.

Reactius:

- Àcid trifluoroacètic (TFA) 10% (*Sigma Aldrich*)

Procediment:

Les mostres de teixit delipidat es van centrifugar (2000 rpm, 10 minuts, temperatura ambient, *Sorvall TC6*) eliminant-se el sobrenedant format per la fase de metanol, aigua i molècules hidrosolubles. El pelet es va homogenar amb el politró amb 1 ml de TFA al 10% i es van fer dos rentats del braç del politró, cadascun amb 0.75 ml de TFA 10%. L'homogenat final estava en un volum de 2.5 ml. La proteïna lligada es

va separar dels aminoàcids lliures per centrifugació a 6000 g, 30 minuts a 4°C. La proteïna es va assecar mitjançant un sistema de buit (*Speed Vac Plus AR, Savant Speed Vac Systems, USA*). El contingut de nitrogen dels teixits es va determinar per anàlisi elemental (*Elemental Analyser Flash 1112, ThermoFinnigan, Alemany*), a la Unitat de Cromatografia de Gasos - Espectrometria de Masses Aplicada dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. El percentatge de proteïna es va calcular assumint que el contingut de nitrogen és d'1 g per cada 6.25 g de proteïna. Els resultats es presenten com a g proteïna · 100 g⁻¹ de teixit fresc (% en pes fresc).

2.1.5. Extracció i quantificació de glicogen

L'extracció i purificació del glicogen es va realitzar per hidròlisi alcalina amb KOH 30% en calor i posterior precipitació amb dues parts iguals d'etanol absolut (Good i col., 1933). La determinació de la concentració de glicogen es va fer per colorimetria segons mètode de l'antrona descrit per Fraga i col. (1956) i modificat per Alemany (1973).

Reactius:

- KOH 30% (*Panreac*)
- Etanol Absolut (*Panreac*)
- Reactiu d'antrona (*Panreac*):
antrona (1 g/L) en H₂SO₄ 84%
- Glicogen de *Mytilus edulis* (*Sigma-Aldrich*)

Solució patró:

La solució patró es va preparar amb glicogen a concentracions de 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg/L en aigua destil·lada (A.D).

Procediment:

Mostres de 200 mg de fetge o 500 mg de múscul blanc van ser digerides amb 1 ml de KOH 30% a 90°C fins a la completa dissolució del teixit (aproximadament 20

minuts). Posteriorment es van afegir 2 ml d'etanol absolut i les mostres es van deixar reposar un mínim de 24 hores en fred, aconseguint així la floculació del glicogen. Les mostres es van centrifugar a 3000 rpm (*Jouan CR 4 11*), durant 15 minuts a 10°C. El pelet (glicogen) es va redissoldre amb 1 ml d'A.D. Aquest procés de purificació es va repetir una segona vegada.

Per fer la valoració del contingut de glicogen les mostres es van diluir tal com indica la Taula 2.12, degut a la diferent quantitat de glicogen dels teixit i en funció de l'espècie.

Taula 2.12: Dilució de les mostres de glicogen dependent del teixit i de l'espècie

	<i>dilució 1</i>	<i>dilució 2</i>	<i>dilució 3</i>
Fetge truita	Purificat dissolt en 1 ml AD	100 µl dil.1 + 700 µl AD	80 µl dil.2 + 920 µl AD
Fetge orada	Purificat dissolt en 1 ml AD	100 µl dil.1 + 700 µl AD	20 µl dil.2 + 980 µl AD
Múscul truita / orada	Purificat dissolt en 1 ml AD	100 µl dil.1 + 700 µl AD	400 µl dil.2 + 600 µl AD

Es van incubar aliquotes de 400 µl de la dilució 3 i de la solució patró amb 2 ml de reactiu d'antrona a 90°C durant 20 minuts. Després de la incubació, les mostres es van refredar en gel i es van atemperar abans de la lectura de les absorvànies (*Spectronic Genesis 2, Milton Roy*) a 625 nm. La concentració de glicogen a les mostres es va calcular a partir de la recta patró descrita anteriorment. Els resultats es presenten com a g de glicogen · 100 g⁻¹ de teixit fresc (% en pes fresc).

Val a dir que el banc de dilucions de les mostres es va realitzar segons la Taula 2.12 perquè calia conservar part de la mostra de glicogen per a l'anàlisi isotòpic. Així, la mostra restant de la dilució 1 (900 µl) es tornava a precipitar amb etanol, es centrifugava, el pelet es liofilitzava (*Liofilitzador Cryodos, Telstar, Espanya*) i finalment el glicogen purificat es conservava en un dessecador fins a l'anàlisi isotòpic.

2.2. Paràmetres plasmàtics

2.2.1. Valoració de proteïnes plasmàtiques

La concentració de proteïnes plasmàtiques es va determinar colorimètricament pel mètode de Lowry i col. (1951). Aquest mètode es fonamenta en la reacció dels pèptids o les proteïnes amb sulfat de coure i un àlcali formant-se un compost porpra. El Cu^{2+} quela els enllaços peptídics reduint-se a Cu^+ . En afegir-se el reactiu de Folin, els ions Cu^+ redueixen lentament l'àcid fosfomolibdic-fosfotúngstic a blau d'heteropolimolibdè, que és detectable en el rang de longitud d'ona de 500 a 750 nm.

Reactius:

- Reactiu A: Solució de Cu^{2+} :
 - CuSO_4 30 mmol/L
 - Na_2EDTA 28 mmol/L
 - NaOH 20 mmol/L
- Solució alcalina:
 - Na_2CO_3 190 mmol/L
 - NaOH 100 mmol/L

La barreja de les dues solucions del reactiu A es va preparar el mateix dia de la valoració, a raó de 2.5 ml de la solució de Cu^{2+} per cada 100 ml de solució alcalina.

- Reactiu B: Reactiu de Folin-Cicolteau (*Panreac*):
 - Sodi tungstat 2-hidrat 10 g

Sodi molibdat 2-hidrat	2.5 g
Àcid orto-fosfòric 85%	5 ml
HCl 35%	10 ml
Liti-sulfat-1-hidrat	15 g
Aigua s.c.p.	100 ml

Aquest reactiu es va preparar en el moment en que el necessitàvem, diluint el reactiu comercial en aigua bidestil·lada (V/V), mantenir-lo en tot moment protegit de la llum.

- Albúmina sèrica bovina (Fracció V) (*Sigma Aldrich*)

Solució patró:

La solució patró es va preparar amb albúmina sèrica bovina a concentracions de 0, 20, 30, 40, 50 60, 70, 80, 100, 150 i 200 mg/L en aigua bidestil·lada.

Procediment:

Les mostres es van diluir en proporció 1:100 en aigua bidestil·lada. Es van incubar aliquotes de 100 µl de mostra i de patró durant 20 minuts amb 4 ml de reactiu A. Seguidament es van afegir 200 µl del reactiu B, i es van incubar durant 15 minuts. El color desenvolupat es llegeix amb l'espectròmetre (*Spectronic Genesis 2, Milton Roy*) a 500 nm. Els resultats s'expressen en g de proteïna plasmàtica ·100 ml⁻¹ plasma, calculats a partir dels valors de la recta patró.

2.2.2. Valoració de Glucosa

La glucosa plasmàtica es va valorar pel mètode enzimàtic de la glucosa-oxidasa descrit per Werner i col. (1970). La glucosa-oxidasa transforma la glucosa en àcid glucònic. Aquesta reacció implica l'alliberament de peròxid d'hidrògen que, en presència de peroxidasa, reacciona amb el fenol i la 4-aminofenazona, originant un compost que té la màxima absorvència a 505 nm.

Reactius:

- Reactiu Glucofix (*Menarini*):

Fenol	5.3 mmol/L
Tampó fosfats (pH=7.5)	150 mmol/L
4-aminofenazona	0.4 mmol/L
Glucosa oxidasa	16000 UI/L
Peroxidasa	1000 UI/L

- D(+)-Glucosa anhidre (*Panreac*).

Solució patró:

La solució patró es va preparar amb glucosa a concentracions de 35, 70, 140, 280, 420 i 550 μM amb aigua bidestil·lada.

Procediment:

Les mostres es van diluir 1:20 en aigua bidestil·lada. Aliquotes de 200 μl de mostres i estàndards es van incubar amb 2 ml de reactiu glucofix al 50% durant 15 minuts a 37°C (bany humit amb agitació). La lectura de les absorbàncies es va fer amb un espectrofotòmetre (*Spectronic Genesis 2, Milton Roy*) a 505 nm. Els resultats s'expressen en mmols glucosa $\cdot \text{L}^{-1}$ plasma.

2.3. Relació isotòpica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ i $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de proteïna, lípid i glicogen tissulars, proteïnes plasmàtiques i pinsos

La determinació de les relacions isotòpiques en components principals (proteïna, lípid i glicogen) de teixits (fetge, múscul, carcassa i paquet visceral + greix perivisceral), de proteïnes plasmàtiques i dels pinsos experimentals es van dur a terme per anàlisi elemental – espectrometria de masses de relació isotòpica.

2.3.1. Anàlisi elemental – espectrometria de masses de relació isotòpica

Fonament tècnic:

1. **Analitzador elemental** (Figura 2.5): la primera part de l'anàlisi consisteix en una combustió total de la mostra en presència d'oxigen (reactor de combustió a 900°C). Els productes resultants (CO_2 , N_2 , NO_x , SO_2 , H_2O ...), portats per heli, passen a través d'un reactor de reducció (Cu^{2+} a 640°C) on els òxids de nitrogen són reduïts a N_2 . Després de la reducció, els productes passen per una trampa d'aigua ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) i a continuació entren en la columna cromatogràfica (columna empaquetada de tamís molecular $1.5\text{ m} \times 1/4''$) on el N_2 i el CO_2 se separen.

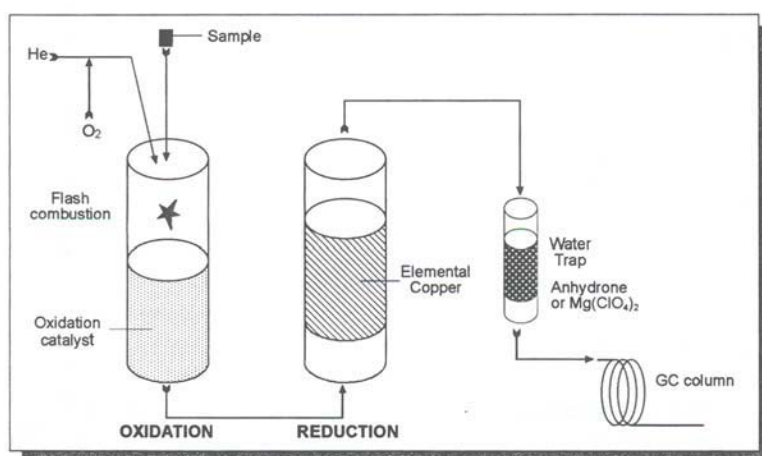


Figura 2.5: Esquema de l'analitzador elemental.

2. **Interfase** (Figura 2.6): El N_2 i el CO_2 entren a la interfase ($40^\circ C$) on conflueixen amb CO_2 i N_2 purs de referència.

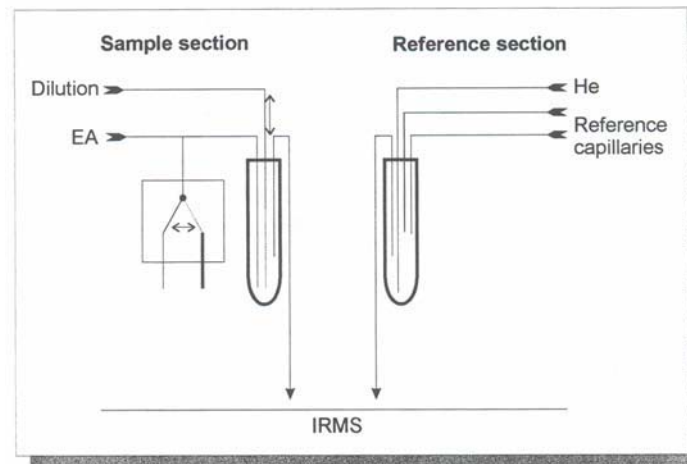


Figura 2.6:
Esquema de la
interfase

3. **Espectròmetre de masses de relació isotòpica:** els gasos problema i els de referència entren a l'espectròmetre de masses de relació isotòpica (IRMS) on els feixos iònics són separats en funció de m/z i mesurats en col·lectors de copa de Faraday. Pel N_2 es mesuren les masses 28, 29 i 30 i pel CO_2 les masses 44, 45 i 46. La composició isotòpica de la mostra es calcula per comparació amb els gasos de referència, els quals, al seu torn, estan calibrats en relació a uns estàndards internacionals, que són: VPDB (Viena Pee Dee Belemnite) pel ^{13}C i N_2 atmosfèric pel ^{15}N . El VPDB és un mineral amb una composició isotòpica similar al bicarbonat dissolt a l'oceà, i considerat enriquit respecte als compostos orgànics. El N_2 atmosfèric és considerat molt homogeni arreu del món.

Patrons:

Per calibrar l'equip es disposava d'uns patrons d'anàlisi isotòpica i d'anàlisi elemental certificats (Taules 2.13, 2.14, 2.15). Aquests patrons es passaven al principi de l'anàlisi i s'intercalaven cada 12 mostres, corregint així les possibles desviacions de l'instrumental.

Taula 2.13: Patrons i pes (mg) adients per a l'anàlisi de ^{15}N

	<i>Patró</i>	<i>Composició</i>	<i>%N</i>	$\delta^{15}\text{N}$	<i>mg</i>
Composició natural	IAEA N1	sulfat d'amoni	21	0.4	0.15 - 0.25
	IAEA NO3	nitrat potàssic	14	4.7	0.32 - 0.38
	IAEA N2	sulfat d'amoni	21	20.3	0.15 - 0.25
Patrons enriquits	IAEA 305 A	sulfat d'amoni	21	39.8	0.15 - 0.25
	IAEA 310 A	urea	46	47.2	0.08 - 0.12
	IAEA 310 B	urea	46	244.6	0.08 - 0.12
	IAEA 305 B	sulfat d'amoni	21	375.3	0.15 - 0.25

IAEA: International Atomic Energy Agency, Viena, Austria.

Taula 2.14 : Patrons i pes (mg) adients per a l'anàlisi de ^{13}C

	<i>Patró</i>	<i>Composició</i>	<i>%C</i>	$\delta^{13}\text{C}$	<i>mg</i>
Composició natural	IAEA CH7	polietilè	87	-31.8	0.3 - 0.4
	USGS 24	grafit	100	-16.0	0.2 - 0.3
	IAEA CH6	sacarosa	42	-10.4	0.6 - 0.8
Patrons enriquits	IAEA 309 A	bicarbonat sòdic	14	93.9	0.9 - 1.1
	IAEA 309 B	bicarbonat sòdic	14	466	0.9 - 1.1

IAEA: International Atomic Energy Agency, Viena, Austria. USGS: US Geological Survey.

Taula 2.15: Patrons i pes (mg) adients per a l'anàlisi elemental

<i>Patró</i>	<i>%C</i>	<i>%N</i>	<i>mg</i>
CICLOHEXANONA	51.79	20.14	0.2
ATROPINA	70.56	4.84	0.8
ACETANILIDA	71.09	10.36	0.4

Procediment:

Les anàlisis es van realitzar amb un analitzador elemental *-Elemental Analyser Flash 1112-* acoblat a un espectròmetre de masses de relació isotòpica *-Finnigan MAT Delta C-* mitjançant una interfase *-Conflo III - (ThermoFinnigan, Alemany)*, a la Unitat de Cromatografia de Gasos - Espectrometria de Masses Aplicada dels Serveis Científico-tècnics de la Universitat de Barcelona.

Per a la determinació de la relació isotòpica de les proteïnes, els lípids i el glicogen era necessari l'extracció i purificació prèvia d'aquests compostos. Els procediments d'extracció, purificació i assecat per a cada teixit es troben detallats als punts anteriors (2.1.3., 2.1.4., 2.1.5.). Per assecat teixits sencers i pinso es va utilitzar un liofilitzador (*Liofilitzador Cryodos, Telstar, Espanya*). Les mostres seques es van homogeneïtzar en un petit morter.

La quantitat necessària de mostra per a l'anàlisi depenia de la concentració de carboni i nitrogen de les mostres, i calia garantir que com a mínim hi haguessin 20µg de l'element minoritari. En el nostre cas es van pesar entre 0.3 i 0.6 mg de mostra. Les mostres es van pesar amb una microbalança (*Mettler-Toledo MX-S*) i es van encapsular en càpsules d'estany (3.3 x 5 mm , *Cromlab*)

2.3.2. Expressió dels resultats d'enriquiment

Delta (δ): parts per mil de l'isòtop estable en la mostra (*sa*) respecte als estàndards internacionals (*st*: VPDB, N₂ atmosfèric).

$$\delta = \left[\left(\frac{R_{sa}}{R_{st}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}, {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$$

$$R_{st} (\text{VPDB}) = 0.01237; R_{st} (\text{N air}) = 0.003676.$$

Àtom %: valor absolut d'àtoms de l'isòtop pesant per cada 100 àtoms totals d'element.

En els estudis on s'administraven isòtops estables com a traçadors, l'enriquiment de ^{13}C o ^{15}N es va calcular seguint l'exemple que es descriu a continuació.

Exemple per a ^{13}C (igualment vàlid per a ^{15}N):

1. APE (*atom percentage excess*): diferència entre l'àtom % experimental i l'àtom % del corresponent blanc.

2. A partir de l'APE (A) es van calcular els g^{13}C per 100 grams de C total presents a cada mostra (càlcul 2).

3. Càlcul de:

- la dosi de marcador ingerit (càlcul 3.1)
- la quantitat de marcador en un teixit (càlcul 3.2)
- la quantitat de marcador en components principals (cp) de teixit (cpteixit) (càlcul 3.3)
- la quantitat de marcador en la fracció soluble (càlcul 3.4).

4. Finalment els resultats d'enriquiment en teixit i/o component principal, obtinguts a les 11 o 24 hores després de la ingesta, es van referir a la dosi de marcador ingerida. Així els resultats s'expressen com a percentatge de marcatge trobat en cada fracció als diferents temps postprandials:

- marcatge total d'un teixit (expressió 4.1)
- marcatge en un component principal d'un teixit (expressió 4.2)

$$(2) \quad \frac{g^{13}C}{g C_i} = A \times \frac{6.023 \cdot 10^{23} \text{ at } Ct}{1 \text{ mol } Ct} \times \frac{1 \text{ mol } Ct}{\left[\left[12 \times (1-A) \right] + (13 \times A) \right] g} \times \frac{1 \text{ mol }^{13}C}{6.023 \cdot 10^{23} \text{ at }^{13}C} \times \frac{13 g}{1 \text{ mol }^{13}C}$$

$$(3.1) \quad \frac{g^{13}C_{ingerits}}{100 g \text{ peix}} = \frac{g^{13}C}{g C \text{ pinso}(p.s.)} \times \frac{g C \text{ pinso}(p.s.)}{g \text{ pinso}(p.s.)} \times \frac{g \text{ pinso}(p.s.)}{g \text{ pinso}(p.f.)} \times \frac{g \text{ pinsoingerit}(p.f.)}{100 g \text{ peix}}$$

$$(3.2) \quad \frac{g^{13}C_{teixit}}{100 g \text{ peix}} = \frac{g^{13}C}{g C_{teixit}} \times \frac{g C_{teixit}}{g \text{ teixit}(p.s.)} \times \frac{g \text{ teixit}(p.s.)}{g \text{ teixit}(p.f.)} \times \frac{g \text{ teixit}(p.s.)}{100 g \text{ peix}}$$

$$(3.3) \quad \frac{g^{13}C_{cpteixit}}{100 g \text{ peix}} = \frac{g^{13}C_{cp}}{g C_{cp}} \times \frac{g C_{cp}}{g cp} \times \frac{g cp}{g \text{ teixit}} \times \frac{g \text{ teixit}}{100 g \text{ peix}}$$

$$(3.4) \quad \frac{g^{13}C \text{ fracció soluble}}{100 g \text{ peix}} = \frac{g^{13}C_{teixit}}{100 g \text{ peix}} - \sum \frac{g^{13}C_{cpteixit}}{100 g \text{ peix}}$$

$$(4.1) \quad \frac{g^{13}C_{teixit}}{100 g^{13}C_{ingerit}}$$

$$(4.2) \quad \frac{g^{13}C_{cpteixit}}{100 g^{13}C_{ingerit}}$$

2.4. Determinació de la concentració i la relació isotòpica ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) d'aminoàcids lliures de plasma i múscul blanc

Els aminoàcids lliures de plasma i múscul blanc de truita i orada es van separar i quantificar per cromatografia de gasos. La relació isotòpica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es va obtenir per espectrometria de masses de relació isotòpica.

2.4.1. Extracció dels aminoàcids lliures

Reactius:

- àcid trifluoroacètic (TFA) 10% (*Sigma Aldrich*)
- NorLeucina (NLeu) 1000 μM (*Sigma Aldrich*)

Procediment:

En el moment del mostreig es van prendre mostres de sang de la vena caudal amb xeringues heparinitzades. La sang es va centrifugar (13000g, 5 minuts) i es va recollir la fracció plasmàtica. Una alíquota de 400 μl de plasma es va barrejar amb 200 μl de NLeu 1000 μM (patró intern) i amb 200 μl de TFA al 10%. Les mostres, reposades 24 hores en fred, es van centrifugar a 13000 rpm (*Mikro 200, Hettich*) durant 15 minuts a 4°C. El sobrenedant, fracció on es trobaven els aminoàcids lliures, es va recollir i es va conservar a -80° C.

En el cas del múscul blanc, es van prendre les mostres conservades des del moment del mostreig a -80°C i es van pulveritzar amb nitrogen líquid. Es van pesar 200 mg i es van hidrolitzar homogenitzant amb el politró (*Polytron PT 3000, Kinematica AG, Suïssa*) amb 1 ml de TFA al 10%. Es van fer dos rentats del braç del politró, cadascun de 750 μl de TFA 10%, obtenint finalment un homogenat de múscul en 2.5 ml de TFA10%. L'homogenat es va centrifugar a 6000 g durant 30 minuts a 4°C. El sobrenedant, aminoàcids lliures, es va recollir i es va conservar a 4°C.

2.4.2. *Purificació dels aminoàcids lliures*

Reactius:

- NLeu 1000 μ M
- Patró AA-S-18 (*Sigma Aldrich*)
- Dowex 50 W X8 H+ fortament àcida (200 – 400 mesh) (*Sigma Aldrich*)
- HCl Suprapur (*Sigma Aldrich*)
- NH_4OH 2M (*Merck*)

Procediment:

Els extractes d'AA es van purificar centrifugant (13000 g durant 45 minuts a 4°C) amb filtres de cel·lulosa regenerada *Ultrafree-MC 1000 NMWL* (*Millipore, EUA*). En el cas de les mostres de múscul blanc es va prendre 1 ml de filtrat i es van afegir 250 μ l de NLeu 1000 μ M. La resta de la mostra es va congelar a -80°C . El filtrat es va assecat sota buit (*Speed Vac*).

Les mostres seques es van ressuspèndre amb 1ml de HCl 0,1M i es van eluir a través d'una resina de bescanvi catiónic (Dowex 50 W X8 H+), amb grups sulfònics carregats negativament. La constitució de la resina i el gradient de solvents es va realitzar adaptant el protocol descrit per Owen i col. (1999). A continuació es descriu l'esmentat protocol.

↳ Constitució de la resina:

El primer pas per constituir la resina va consistir en un prerrentat d'una part de resina amb dues parts de solució de prerrentat (g/ml) durant tota la nit (O/N) a temperatura ambient. La solució de prerrentat estava formada per una barreja de HCl 1M / Metanol (V/V). Després del prerrentat O/N, la resina es va rentar seguint els següents passos:

- Es va eliminar la solució de prerrentat amb l'ajuda d'un Kitasato.

- Es va recuperar la resina i es va rentar durant 30 minuts amb HCl 1M, a raó de 2 parts de HCl per una de resina (ml/g).
- L'HCl es va eliminar i la resina es va rentar dues vegades amb aigua bidestil·lada (ABD), a raó de 2 parts d'ABD per una de resina.
- Es va tornar a recuperar la resina i es va rentar durant 30 minuts amb ABD (2 parts per una de resina).
- Es va eliminar l'ABD i es va rentar amb 1 litre ABD.
- Es va recuperar la resina i es va rentar durant 30 minuts amb NH₄OH 2M (2 parts per una de resina).
- Finalment es va eliminar l'NH₄OH 2M i es va rentar amb 1 litre d'ABD. El rentat finalitzava quan el pH de la resina es trobava en el rang de 5-6.
- La resina es conservava amb ABD (2 parts per una de resina) a la nevera, màxim 1 setmana.

↳ Muntatge de les columnes:

Les columnes es van muntar en puntes de pipeta de 1 - 5 ml, a les que prèviament s'havia posat llana de vidre a la punta perquè la resina quedés retinguda. La llana de vidre no havia d'estar molt compacte ja que s'havia de permetre la sortida dels eluents. Es van carregar 3 ml de resina en cada punta.

↳ Cromatografia de bescanvi catiónic:

- Les columnes es van activar per addició de 6 ml de HCl 1M.
- Les mostres i els patrons (ressuspesos en 1 ml de HCl 0.1M), van ser eluits en la columna activada.
- A continuació, seguint aquest ordre, es van eluir:
 - 2 ml de HCl 1M,
 - 2 X 1 ml d'ABD,
 - 3 ml ABD

- 2 ml de NH₄OH 2M.

Fins aquest punt es descartaven tots els residus.

- Els aminoàcids, retinguts fins aquest moment a la columna, eren eluits mitjançant 4 ml de NH₄OH 2M.

L'NH₄OH es va evaporar sota nitrogen, obtenint els aminoàcids cristal·lins. La completa eliminació de l'NH₄OH era fonamental i crítica per a la correcta derivatització de les mostres. En cas que quedés humitat, la molècula derivatitzant s'uniria a l'aigua i no als aminoàcids.

2.4.3. Derivatització

Fonament tècnic:

Per separar aminoàcids per cromatografia de gasos cal derivatitzar-los, per disminuir la seva polaritat. El reactiu escollit per la derivatització va ser la *N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida* (coneguda com MTBSTFA o MBDSTFA). L'elecció d'aquest reactiu es va fer a partir d'informació bibliogràfica (Early i col., 1987; Woo i Chang, 1993; Woo i Lee, 1995; Owen i col., 1999; Witmann i col., 2002) El MTBSTFA té un pes molecular de 241,3 g/mol i una punt d'ebullició de 168 -170°C.

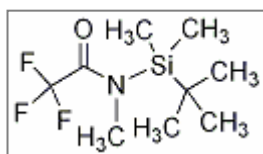


Figura 2.7: Molècula de *N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida*

El MTBSTFA s'uneix als grups carboxil, hidroxil, tiol i amines primàries i secundàries (Figura 2.8). La derivatització mitjançant MTBSTFA impedeix determinar la cisteïna i la cistina de forma acurada perquè durant el procés de derivatització hi ha una conversió parcial de cisteïna en cistina; per altra banda, l'arginina tampoc es derivatitza completament (Woo i Lee, 1995).

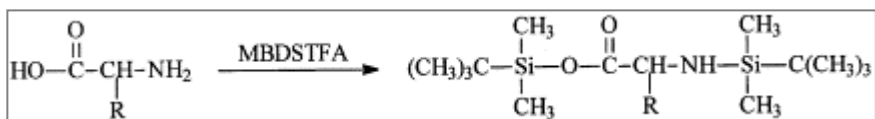


Figura 2.8: Reacció d'unió dels aminoàcids amb la *N*-metil-*N*-*t*-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamide (MBDSTFA) formant el corresponent *t*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivat. Imatge de Witman i col. (2002)

Reactius:

- *N*-metil-*N*-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida (MTBSTFA o MBDSTFA) (*Sigma Aldrich*)
- *N*-Dimetilformamida (DMF) (*Merck*)
- Sulfat sòdic (Na_2SO_4) (*Merck*)

Establiment de les condicions de derivatització:

A la Taula 2.16 es referencien alguns protocols que van servir com a base per determinar les millors condicions de derivatització. Es va considerar que la barreja de MTBSTFA + DMF (V/V) era la més adient per derivatitzar els aminoàcids. Es van assajar les condicions de temps i temperatura proposades per Woo i Chang (1993) i per Owen i col. (1999) i es va comparar el factor de resposta (FR) dels aminoàcids derivatitzats respecte a la NLeu (Taula 2.17), així com la correlació entre diferents concentracions de patró i l'àrea sota la corba (Taula 2.18). Per realitzar aquesta prova es van prendre 500, 1000 i 2000 μmols dels AA del patró *AA-S-18* i es va afegir 250 μmols de NLeu. La derivatització es va dur a terme amb 50 μl MTBSTFA + 50 μl DMF + microespàtula de sulfat sòdic (Na_2SO_4). El sulfat sòdic és emprat amb la finalitat de capturar possibles restes d'aigua. Després de la derivatització es va afegir 200 μl de DMF per diluir les mostres.

Per la major part dels AA el FR era més proper a 1 quan es seguia el protocol d'Owen i col. (1999). Tanmateix les millors correlacions es van obtenir amb el mètode d'Owen i col. (1999), i per tant, aquest va ser finalment el mètode que es va seguir per derivatitzar les mostres.

Taula 2.16: Principals dades dels articles consultats per establir les condicions de derivatització.

Early i col., 1987	Sang	50 µl MTBSTFA + 50 µl DMF	50°C 60 min
Woo i Chang, 1993	Patró AA	15 µl MTBSTFA + 2 µl trietilamina	75°C 30 min
Woo i Lee, 1995	Farina de soja	30 µl MTBSTFA + 20 µl DMF	75°C 30 min
Owen i col., 1999	Múscul blanc de salmó atlàntic	50 µl MTBSTFA + 50 µl piridina	70°C 60 min
Wittmann i col., 2002	<i>S. cerevisiae</i> , Patró AA	8 µl MTBSTFA + 8 µl DMF	80°C 60 min

Taula 2.17: Factor de resposta dels AA respecte a la Nleu

Aminoàcid	Woo i Chang, 1993			Owen i col., 1999		
	FR 500 µM	FR 1000 µM	FR 2000 µM	FR 500 µM	FR 1000 µM	FR 2000 µM
Alanina	0.82	0.94	1.24	0.78	0.93	1.08
Glicina	0.86	1.06	1.47	0.78	0.96	1.19
Valina	0.87	1.05	1.37	0.91	1.03	1.30
Leucina	0.94	1.11	1.47	0.94	1.09	1.37
Isoleucina	0.94	1.10	1.41	0.94	1.07	1.34
Prolina	1.03	1.24	1.74	0.96	1.18	1.47
Metionina	1.38	1.45	1.88	1.29	1.45	1.76
Serina	0.84	0.93	1.24	0.83	0.90	1.12
Treonina	0.92	0.96	1.31	0.91	0.97	1.18
Fenilalanina	1.10	1.27	1.83	1.06	1.27	1.69
Àcid Aspàrtic	0.94	1.07	1.42	0.90	1.05	1.33
Àcid Glutàmic	1.13	1.31	1.78	1.10	1.28	1.62
Lisina	1.61	1.81	2.97	1.42	1.70	2.29
Histidina	1.80	1.97	2.91	1.67	1.89	2.34
Tirosina	1.04	1.25	1.67	1.06	1.21	1.56

Càlcul de factor de resposta:

$$FR = \frac{\mu\text{mols AA}(pe) \times \text{area Nleu}(pe)}{\text{area AA}(pe) \times \mu\text{mols Nleu}(pe)}$$

essent “*pe*” el patró AA-S-18 (patró extern).

Taula 2.18 : Coeficients de correlació entre la concentració d’aminoàcids 500, 1000 i 2000 μM i l’àrea sota la corba

Aminoàcid	<i>Woo i Chang, 1993</i>	<i>Owen et al., 1999</i>
	<i>r</i>	<i>r</i>
Alanina	0.9755	0.9998
Glicina	0.9684	0.9995
Valina	0.9809	0.9983
Leucina	0.9753	0.9986
Isoleucina	0.9840	0.9985
Prolina	0.9621	0.9999
Metionina	0.9701	0.9992
Serina	0.9689	0.9975
Treonina	0.9578	0.9981
Fenilalanina	0.9474	0.9976
Aspartat	0.9735	0.9986
Àcid Glutàmic	0.9680	0.9987
Lisina	0.8569	0.9964
Arginina	0.1191	0.2576
Histidina	0.9259	0.9989
Tirosina	0.9694	0.9950

Correlació significativa si $r > 0.95$

Procediment:

Per les mostres d’AA lliures de múscul blanc i plasma es va establir finalment el següent protocol de derivatització:

1. + 50 μl MTBSTFA + 50 μl DMF + microespàtula de Na_2SO_4
2. 60 minuts a 70°C en placa calefactora
3. + 200 μl DMF en les mostres de múscul blanc
+ 100 μl DMF en les mostres de plasma.

2.4.4. Cromatografia de gasos - espectrometria de masses (GC-MS)

Els TBDMS-derivats (o AA derivatitzats) es van analitzar amb un cromatògraf de gasos *GC 8000 Top* acoblat a un espectròmetre de masses *MD800 (ThermoFinnigan, Alomaya)*. Les condicions cromatogràfiques es detallen a la Taula 2.19.

Taula 2.19: Condicions cromatogràfiques

Columna	DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (<i>Agilent</i>)														
T ^a injector	250°C														
Rampa temperatures	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min)</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Rampa (°C/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.00</td> <td>150</td> <td>3.00</td> </tr> <tr> <td>0.00</td> <td>170</td> <td>25.00</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>275</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Temps (min)	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	1.00	150	3.00	0.00	170	25.00	10.00	275	
Temps (min)	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)													
1.00	150	3.00													
0.00	170	25.00													
10.00	275														
Detector (MD 800)	Font d'ionització	impacte electrònic													
	Rang escanejat	50-550 amu													
	T ^a font	200°C													
	T ^a interfase	260°C													

La identificació dels AA de les mostres es va fer per comparació del temps de retenció amb el patró AA-S-18, que prèviament s'havia caracteritzat per espectrometria de masses (Figura 2.9).

Els µmols de cada AA a la mostra es van calcular en relació al patró intern (NLeu) i al patró extern (AA-S-18 + NLeu), tal com es descriu a continuació:

$$\mu\text{mols AA mostra} = \frac{FR \times \text{area AA mostra} \times \mu\text{mols Nleu mostra}(pi)}{\text{area Nleu mostra}(pi)}$$

on, "pi" és el patró intern, és a dir la NLeu:

0.25 µmols NLeu en les mostres de múscul blanc

0.20 µmols NLeu en les mostres de plasma

i "FR" és el factor de resposta de cada AA.

La concentració d'AA s'expressa finalment en $\mu\text{mols/L}$ plasma i en $\mu\text{mols/g}$ múscul.

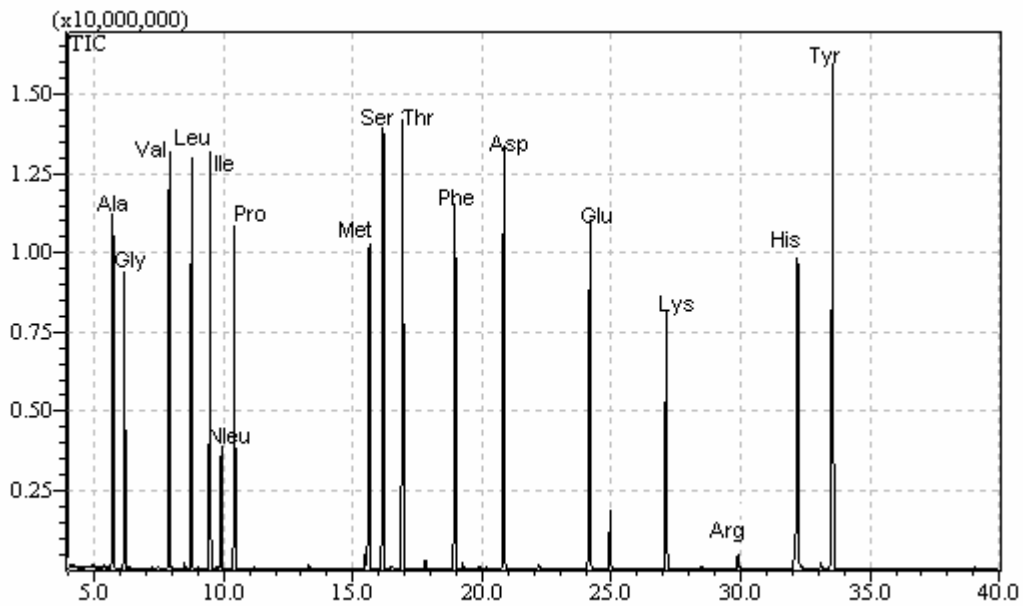


Figura 2.9: Cromatograma del patró AA-S-18 a $750\mu\text{M}$ (NLeu $250\mu\text{M}$) obtingut per GC-MS.

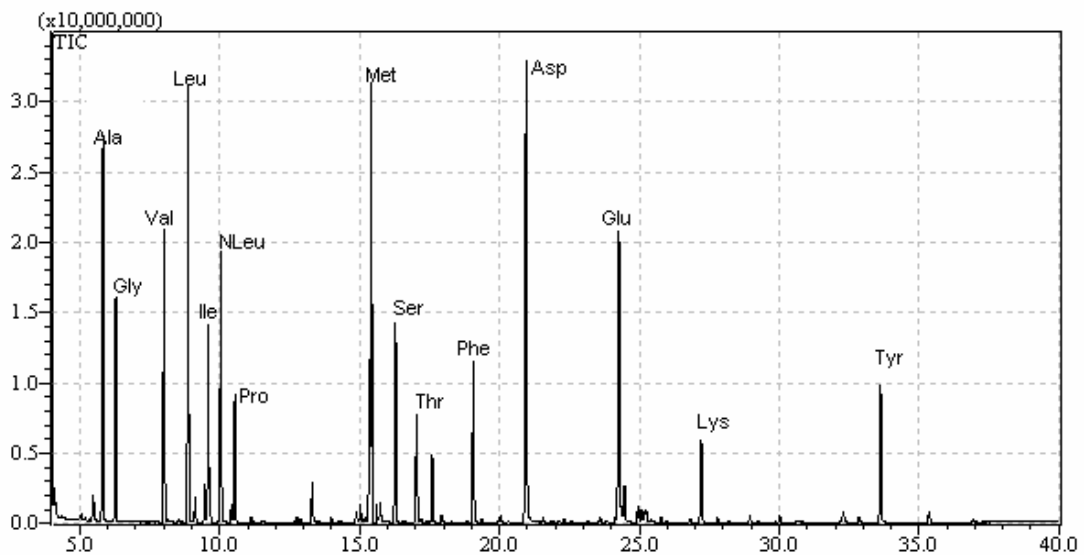


Figura 2.10: Cromatograma de l'Spirulina (+NLeu 250) obtingut per GC-MS.

2.4.5. Cromatografia de gasos – espectrometria de masses de relació isotòpica (GC-C-IRMS)

Fonament tècnic:

Els aminoàcids separats per cromatografia de gasos entren en un tub de combustió on es forma CO_2 i N_2 . En cas que es vulgui analitzar N_2 , la mostra entra en un reactor de reducció i en una trampa de N líquid per capturar el CO_2 . Els feixos iònics són separats en funció de m/z i mesurats en col·lectors de copa de Faraday. Pel N_2 es mesuren les masses 28,29 i 30 i pel CO_2 les masses 44,45 i 46 (Figura 2.11). L'IRMS calcula l'abundància isotòpica relativa del producte en relació a un gas de referència. Els resultats s'obtenen en unitats delta (δ), i en àtoms %.

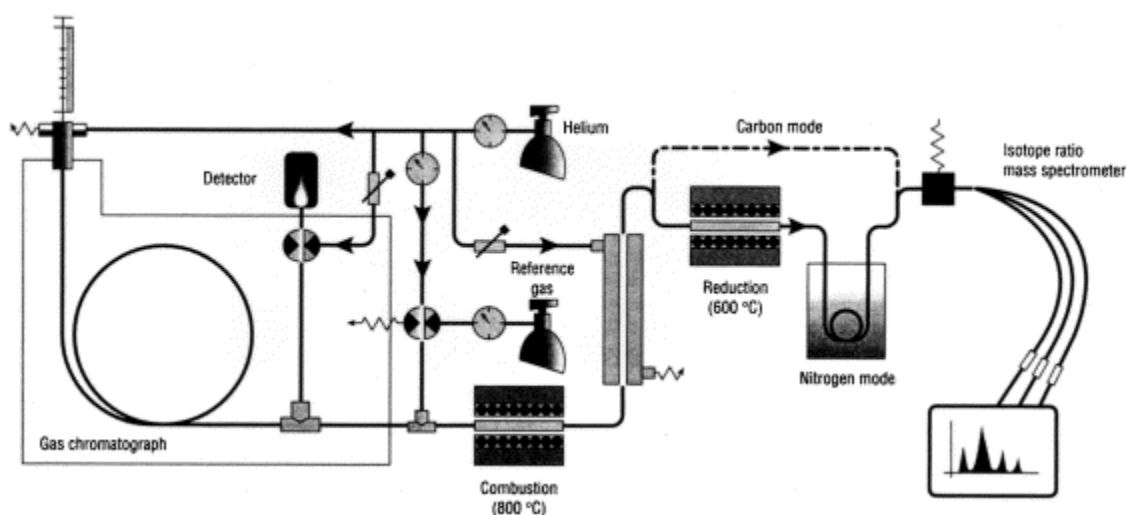


Figura 2.11 : Esquema d'un cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses de relació isotòpica.

Procediment:

La determinació de les relacions isotòpiques es va fer amb un cromatògraf de gasos *Agilent 6890* acoblat a un espectròmetre de masses de relació isotòpica *Delta Plus* (*ThermoFinnigan, Alemanya*) mitjançant una interfase *GCCombustion III* (*ThermoFinnigan, Alemanya*) a la Unitat de Cromatografia de Gasos - Espectrometria de Masses Aplicada dels Serveis Científic-tècnics de la Universitat de Barcelona. La columna del GC era la mateixa columna emprada per GC-MS (DB-5MS 30m x 0.25 mm x 0.25 μm , *Agilent*). Les condicions cromatogràfiques eren les mateixes a les emprades en el GC-MS (Taula 2.19).

La identificació dels AA es va fer per comparació dels temps de retenció amb els patrons prèviament caracteritzats per MS (Figura 2.9).

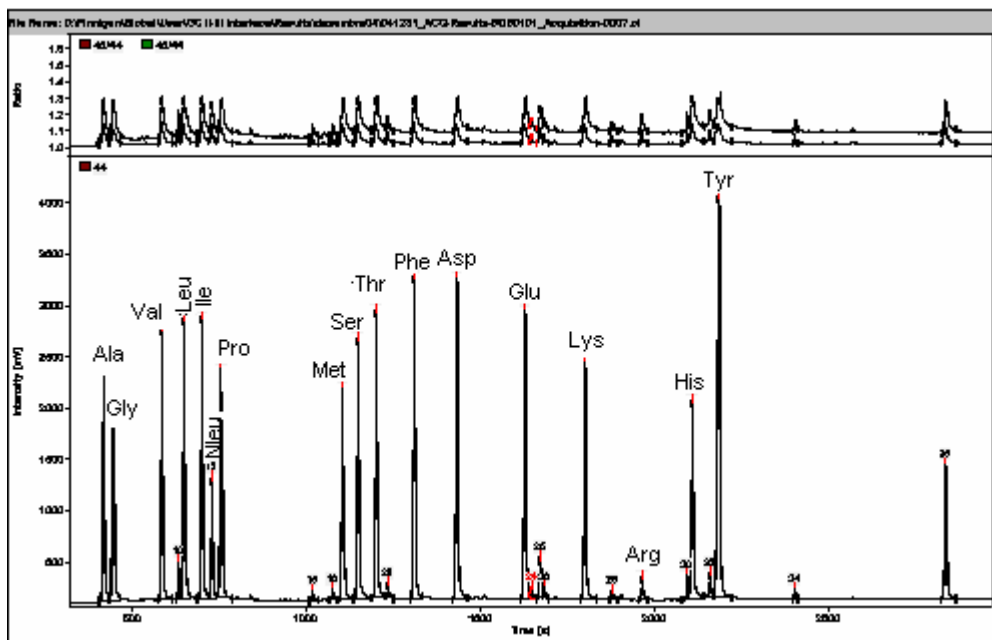


Figura 2.12 : Cromatograma del patró AA-S-18 750 μM (250 μM Nleu) obtingut per GC-C-IRMS.

2.4.6. Càlcul de l'enriquiment dels aminoàcids

↳ A partir de l'àtom % es va calcular l'APE de cada AA. L'APE ens informa de l'impacte dels AA procedents d'una sola ingesta sobre la fracció d'AA lliures.

↳ A partir de l'àtom % i de la concentració de l'aminoàcid es va calcular el marcatge total en l'AA respecte a la quantitat de ^{13}C ingerit ($\mu\text{g } ^{13}\text{C}$ en l'AA/ $\text{g } ^{13}\text{C}$ ingerit). Aquest càlcul permet corregir les diferències de concentració d'AA entre grups.

Els resultats que es mostraran en aquesta tesi corresponen a l'anàlisi d'AA marcats amb ^{13}C . Tanmateix, es va realitzar un bloc d'analítiques per determinar l'enriquiment del ^{15}N . Els resultats obtinguts no van ser òptims donada la menor quantitat de N present en els AA en comparació amb el C. A partir d'aquesta experiència, es va determinar que la quantitat de mostra necessària per analitzar el ^{15}N havia de ser d'un mínim de 4 μmols de cada aminoàcid.

BLOC EXPERIMENTAL I

Establiment del protocol experimental.

Efecte de la relació Aminoàcids Essencials / Aminoàcids No Essencials de la dieta sobre la capacitat d'utilització de la proteïna en la truita irisada i l'orada

El primer objectiu d'aquest capítol era comparar el marcatge de ^{15}N de la proteïna tissular amb el de ^{13}C en truites irisades i orades que havien estat alimentades amb dietes (RT i GSB) amb un 1% de ^{15}N -proteïna i amb un 3% de ^{13}C -proteïna, així com validar la mesura d'incorporació de ^{13}C proteic a lípids i glicogen.

El segon objectiu era determinar si l'ús de la proteïna de la dieta variava en funció de la relació AAE/AANE de la dieta. Cobrint els requeriments d'AAE, s'incrementava el contingut d'AANE, per addició d'àcid glutàmic (Taula 2.1), amb la hipòtesi que un increment d'AANE preservaria als AAE per creixement. Amb aquest objectiu es va determinar el contingut de ^{13}C i ^{15}N en els components principals (proteïna, lípid i glicogen) dels teixits i en les proteïnes plasmàtiques i la composició corporal dels animals.

Resultats

1. Comparació del marcatge amb ^{13}C i ^{15}N

Les quantitats de ^{13}C i ^{15}N afegides a les dietes van permetre superar àmpliament l'abundància natural dels dos isòtops, permetent així mesurar el destí de la proteïna de la dieta independentment de la quantitat natural d'isòtops presents en els teixits (Figures 3.1 i 3.2). L'únic cas en que l'enriquiment no incrementava de forma significativa era en el glicogen hepàtic i muscular de truita.

L'enriquiment ($\Delta\delta$) de les proteïnes hepàtiques de truita i orada (Figura 3.1 A) va ser el mateix mesurat amb ^{15}N que amb ^{13}C (truita: $\Delta_{0-11\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 61$, $\delta^{13}\text{C} = 65$, N.S.; $\Delta_{0-24\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 60$, $\delta^{13}\text{C} = 62$, N.S.; orada: $\Delta_{0-11\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 142$, $\delta^{13}\text{C} = 163$, N.S.; $\Delta_{0-24\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 128$, $\delta^{13}\text{C} = 125$, N.S.). En el cas de les proteïnes musculars (Figura 3.1 B), l'enriquiment no va diferir entre marcadors per la truita ($\Delta_{0-11\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 5.4$, $\delta^{13}\text{C} = 7.8$, N.S.; $\Delta_{0-24\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 11.2$, $\delta^{13}\text{C} = 11.7$, N.S.) però sí per l'orada quan es calculava l'enriquiment entre 0 i 24 hores ($\Delta_{0-11\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 10.3$, $\delta^{13}\text{C} = 14$, $P=0.1$ $\Delta_{0-24\text{ h}}$ $\delta^{15}\text{N} = 12.8$, $\delta^{13}\text{C} = 18$, $P<0.05$). Com es pot observar amb aquests increments relatius i amb les gràfiques, l'enriquiment en orada era sempre major que en truita.

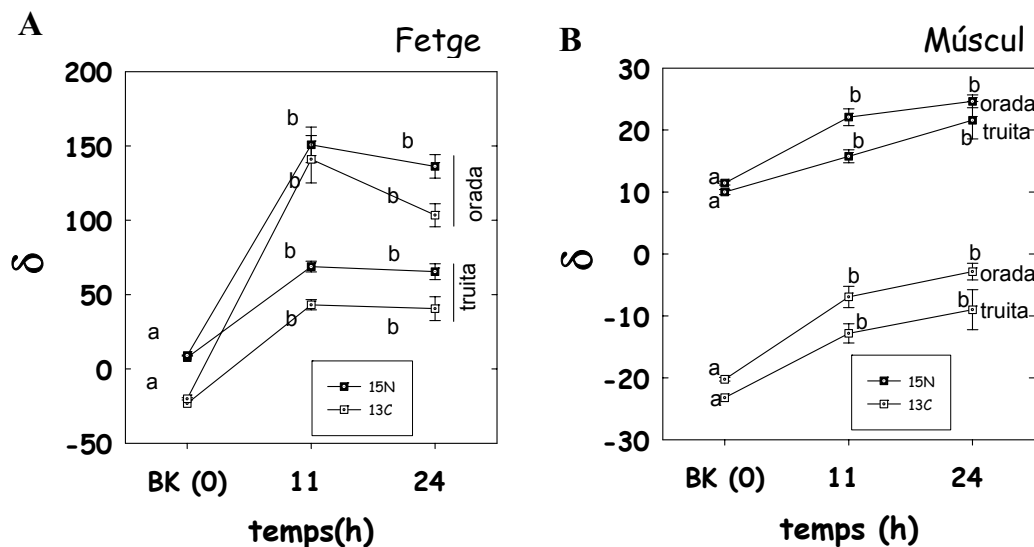


Figura 3.1: $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ en proteïnes hepàtiques (A) i musculars (B) en truites i orades adaptades a les dietes RT i GSB respectivament, 11 i 24 hores després d'una ingesta amb dieta marcada amb un 3% de ^{13}C i un 1% de ^{15}N . Els valors BK(0) corresponen als peixos blancs ($n=2$). Els valors experimentals corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre hores ($P<0.05$) per un mateix isòtop i una mateixa espècie.

A la Figura 3.2 es mostra la transferència de carboni proteic a lípids i glicogen de fetge i múscul. La incorporació de ^{13}C a glicogen hepàtic en l'orada era 227 unitats delta major en la truita a 11 hores postingesta i 35 unitats delta major a 24 hores, indicant diferències específiques entre espècies en la capacitat de sintetitzar glucosa i posteriorment glicogen, a partir de proteïna. En les dues espècies, 24 hores després de la ingesta, un 21 – 24 % del ^{13}C es trobava en la fracció lipídica en el fetge.

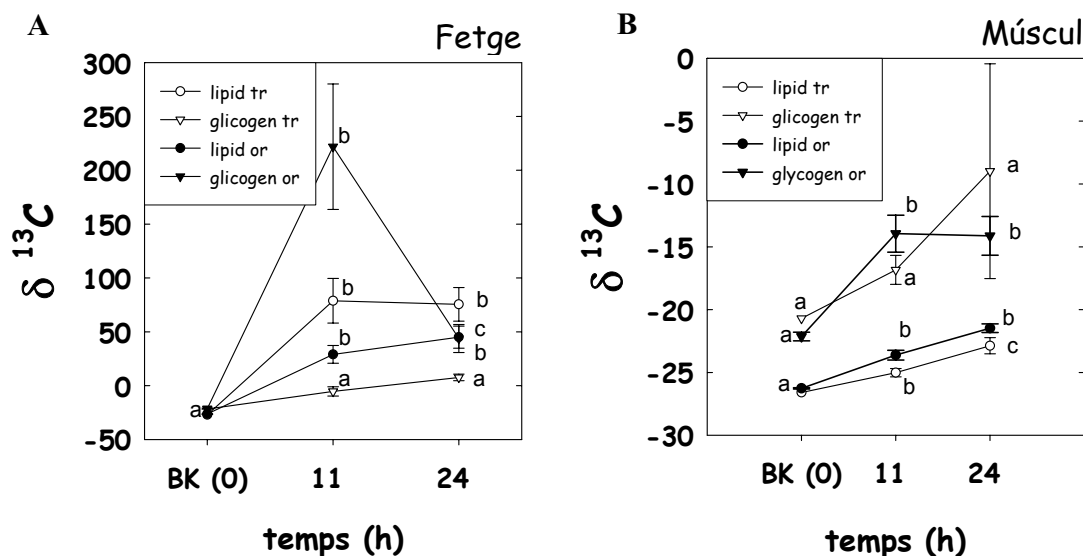


Figura 3.2: $\delta^{13}\text{C}$ en lípid i glicogen hepàtic (A) i muscular (B) en truites i orades adaptades a les dietes RT i GSB respectivament, 11 i 24 hores després de la ingesta amb dieta marcada amb un 3% de ^{13}C . Els valors BK(0) corresponen als peixos blancs (n=2). Els valors experimentals corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n= 6. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre hores ($P < 0.05$) per un sol compartiment i espècie.

Tant en proteïna com en lípid i glicogen, la incorporació dels marcadors en el fetge incrementava ràpidament entre les 0 i les 11 hores, arribant a un plató o fins i tot disminuint a 24 hores. En canvi, el marcatge en el múscul incrementava lentament i de forma lineal amb el temps.

2. Efecte de la relació AAE/AANE de la dieta sobre la capacitat d'utilització de la proteïna en la truita irisada i l'orada

2.1. Creixement i composició corporal

El pes final de les truites i orades alimentades amb les dietes experimentals (Taula 3.1) no va diferir significativament dels animals control, tot i que el pes final tendia a disminuir en els animals experimentals. Al llarg del període de creixement les truites alimentades amb la dieta experimental van mostrar hiperfàgia.

Taula 3.1: Taxes de creixement i ingesta de truites irisades i orades alimentades amb dietes amb diferent relació AAE/AANE

	RT	RTglu	GSB	GSBglu
Pes inicial (g)	14.1 ± 0.04	14.1 ± 0.03	14.7 ± 0.16	14.7 ± 0.02
Pes final (g)	90.6 ± 5.0	83.5 ± 4.5	74.9 ± 0.7	70.9 ± 1.4
Taxa de creixement específic (%)	2.22 ± 0.06	2.12 ± 0.07	1.98 ± 0.003	1.91 ± 0.002
Ingesta (g MS/kg PCP/dia)	18.6 ± 0.8 a	20.3 ± 0.5 b	17.8 ± 0.2	18.5 ± 1.0

Els valors de truita van se proporcionats per l'INRA i els d'orada per l'IATS. Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre dietes (prova Student Newman-Keuls; $P < 0.05$). Taxa de creixement específic = $[100 * [\ln(\text{pes corporal final}) - \ln(\text{pes corporal inicial})] / \text{dies}]$. MS: matèria seca. PCP: pes corporal promig

La composició tissular de les truites i les orades va variar en funció de la dieta rebuda (Taulas 3.2 i 3.3). En el fetge, el contingut de glicogen de les truites RTglu era la meitat ($P < 0.05$) del present en el grup control. En les orades alimentades amb GSBglu el contingut de glicogen hepàtic també era inferior en relació amb el grup control, encara que no significativament. Vint-i-quatre hores després de la ingesta, l'índex hepatosomàtic (IHS) de les orades GSBglu era menor que el dels animals control degut a la reducció del contingut de glicogen i a una lleugera reducció del contingut de lípids.

En la truita es va observar un marcat ritme diari de la reserva de glicogen hepàtic, independent de la dieta rebuda. Els valors de glicogen hepàtic 11 hores després de la ingesta eren el doble que a 24 hores. Comparant les dues espècies, independentment de la dieta, els nivells de glicogen hepàtic de l'orada van ser quatre vegades superiors als de truita. En la truita, el contingut en lípids en múscul, paquet visceral i carcassa era menor en els peixos alimentats amb les dietes experimentals. En orada, es va trobar una menor quantitat de lípids ($P < 0.05$) en el paquet visceral.

Taula 3.2: Composició corporal de truites irisades adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE

	RT	RTglu	RT	RTglu
	11 h		24 h	
Fetge				
IHS ¹	1.3 ± 0.08	1.2 ± 0.07	1.2 ± 0.05	1.1 ± 0.05
Lípid	3.6 ± 0.13	3.5 ± 0.07	3.7 ± 0.14	3.9 ± 0.10
Proteïna	14.8 ± 0.84	16.5 ± 0.56	16.1 ± 0.46	18.1 ± 0.25 *
Glicogen	6.4 ± 0.87	3.3 ± 0.43 *	3.8 ± 0.62	1.9 ± 0.44 *
Múscul				
Lípid	3.2 ± 0.37	2.7 ± 0.29	4.2 ± 0.37	3.0 ± 0.41 *
Proteïna	17.5 ± 0.70	18.6 ± 0.61	19.7 ± 0.35	20.8 ± 0.17 *
Glicogen	0.4 ± 0.08	0.3 ± 0.06	0.4 ± 0.08	0.2 ± 0.02
PV+G				
IVS ²			9.4 ± 0.28	9.6 ± 0.37
Lípid			45.0 ± 2.95	38.4 ± 2.39
Proteïna			3.5 ± 0.40	4.4 ± 0.80
Carcassa				
Lípid			8.0 ± 0.30	6.9 ± 0.23 *
Proteïna			17.8 ± 0.27	17.7 ± 0.20

Resultats dels animals mostrejats a 11 i 24 hores. Els valors s'expressen en percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana, d'11 individus (9 experimentals i 2 controls). ¹HSI = mg fetge·100 mg⁻¹ pes corporal, ²VSI= mg viscères·100 mg⁻¹ pes corporal. (*) indica diferències significatives (P<0.05) entre els dos grups en un mateix temps de mostreig.

Taula 3.3 : Composició corporal de les orades adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE

	GSB	GSBglu	GSB	GSBglu
	11 h		24 h	
Fetge				
IHS ¹	1.5 ± 0.06	1.4 ± 0.05	1.4 ± 0.09	1.2 ± 0.07 *
Lípid	7.4 ± 0.61	8.0 ± 0.68	9.0 ± 0.88	8.0 ± 0.63
Proteïna	11.2 ± 0.29	11.3 ± 0.56	12.3 ± 0.52	14.9 ± 0.68 *
Glicogen	11.9 ± 0.43	9.4 ± 0.46	13.9 ± 0.80	11.7 ± 0.98
Múscul				
Lípid	2.9 ± 0.20	2.0 ± 0.11*	2.2 ± 0.14	2.0 ± 0.12
Proteïna	19.3 ± 0.30	19.7 ± 0.21	19.8 ± 0.40	20.1 ± 0.25
Glicogen	0.4 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.06	0.3 ± 0.04
PV+G				
IVS ²			4.9 ± 0.21	4.7 ± 0.17
Lípid			38.6 ± 1.81	30.0 ± 1.97 *
Proteïna			5.9 ± 0.50	8.9 ± 0.90 *
Carcassa				
Lípid			10.0 ± 0.37	10.3 ± 0.28
Proteïna			17.0 ± 0.22	17.2 ± 0.18

Es presenten els resultats dels animals mostrejats a 11 i 24 hores. Els valors s'expressen en percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana, d'11 individus (9 experimentals i 2 controls). ¹HSI = mg fetge·100 mg⁻¹ pes corporal, ²VSI= mg viscères·100 mg⁻¹ pes corporal. (*) indica diferències significatives (P< 0.05) entre els dos grup en un mateix temps de mostreig.

2.2. Destí de la proteïna de la dieta en teixits i components principals

2.2.1. Fetge

Del total de ^{13}C proteic administrat es va recuperar entre un 1.5% i un 1.8% en el fetge de truita (Figura 3.3 A). D'aquest, un 38-45% es va trobar formant part de proteïnes, entre un 3.2% i un 14.7% formant part de glicogen i d'un 13% a un 25% formant part de lípids. Comparativament, la incorporació de carboni proteic procedent de dieta va ser superior en el fetge de l'orada (2.5-4%) (Figura 3.3 B) que en el de truita. Per fraccions, la incorporació a glicogen en l'orada (18-41%) va ser superior que en la truita. La quantitat de marcatge en lípids en l'orada era entre un 11.9% i un 24.2 % del total del marcatge en fetge, mentre que en proteïna es va trobar entre un 19.4% i un 26.4% del marcatge.

Per efecte de la dieta, la transferència de ^{13}C -proteic a glucosa, gluconeogènesi, i posterior síntesi de glicogen hepàtic, gluconeogènesi, va ser major ($P < 0.05$) en les truites i les orades alimentades amb les dietes experimentals. L'increment de la síntesi de glicogen es va manifestar 11 hores després de la ingesta en la truita (3.2% en els animals control respecte a 14.7% en els experimentals) i 24 hores després de la ingesta en l'orada (18.1% en els control i 29.3% en els experimentals). En l'orada, el marcatge del glicogen va disminuir d'11 a 24 hores, des d'un 41% del total del marcatge del fetge fins a un 18% ($P < 0.05$), indicant la major capacitat de mobilització d'aquesta reserva per l'orada en comparació amb la truita.

La distribució de ^{15}N en proteïna i fracció soluble en fetge en la truita i l'orada (Figura 3.4) va ser similar entre grups. Comparant les dues espècies, la recuperació de ^{15}N en fetge va ser superior en l'orada que en la truita, tal i com també s'observava pel ^{13}C .

2.2.2. Múscul blanc

La captació total de ^{13}C i ^{15}N en múscul no va diferir en funció de la dieta per cap de les espècies (Figures 3.5 i 3.6), tot i que el marcatge del ^{15}N en proteïna lligada i fracció lliure de les truites alimentades amb la dieta experimental era menor que en les control (Figura 3.6 A).

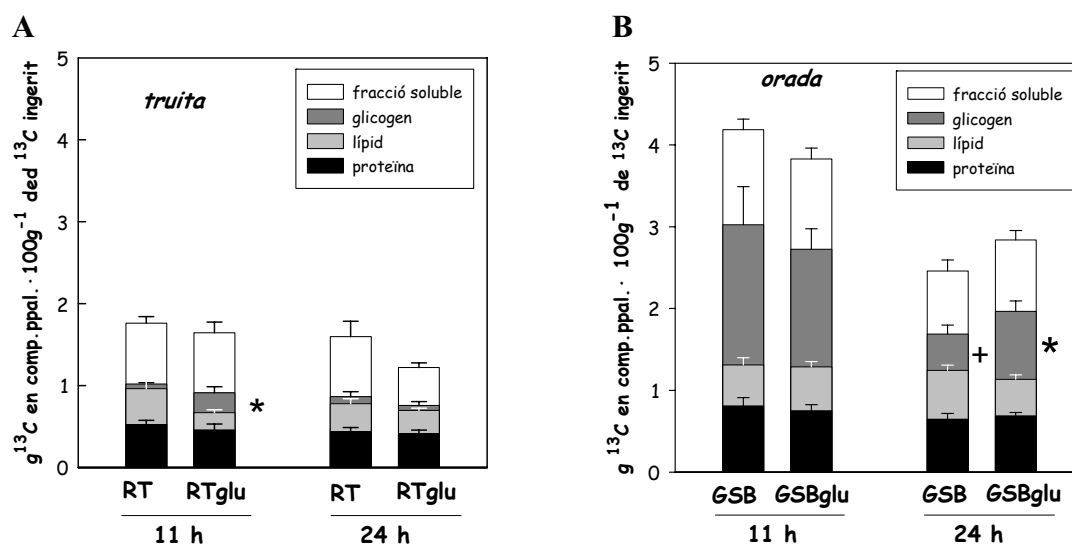


Figura 3.3: Recuperació de ^{13}C en components principals de fetge en truites irisades (A) i orades (B) adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE, a 11 i 24 hores post-ingesta. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=9$. Els símbols indiquen diferències significatives ($P<0.05$) en el marcatge d'aquella fracció entre el grup control i el grup experimental mitjançant (*), o entre 11 i 24 hores dins d'un mateix grup mitjançant (+).

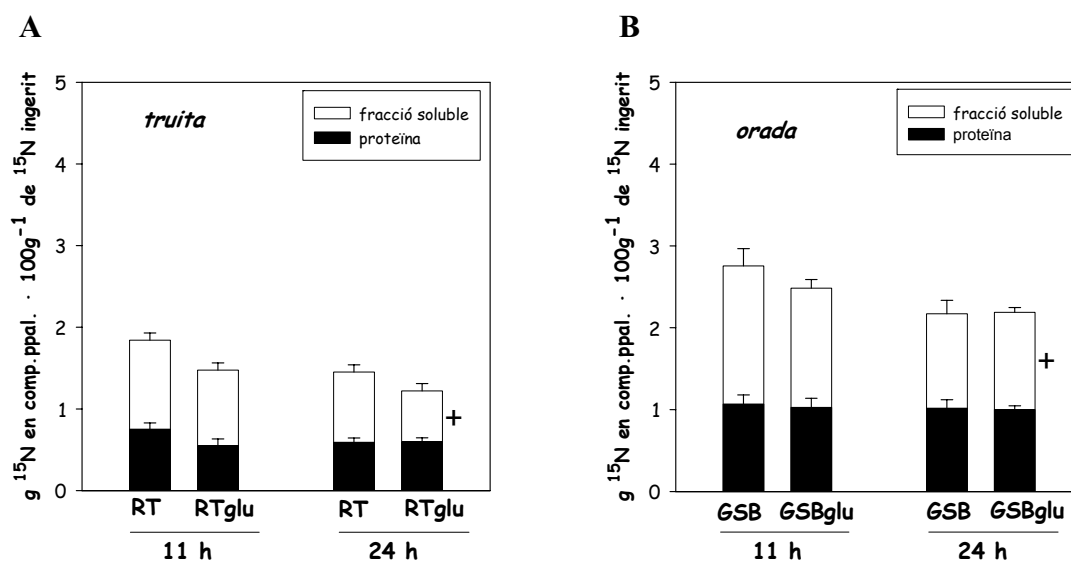


Figura 3.4: Recuperació de ^{15}N en proteïna i fracció soluble del fetge en truites irisades (A) i orades (B) adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE, a 11 i 24 hores post-ingesta. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=9$. Els símbols (+) indiquen diferències significatives ($P<0.05$) en el marcatge d'aquella fracció entre 11 i 24 hores dins d'un mateix grup.

A 24 hores postingesta, en comparació amb 11 hores, es va trobar un increment significatiu del marcadore en la fracció lipídica en truita, tant en els animals control com en els experimentals (Figura 3.5 A).

Novament, tal i com ja s'observava en fetge, el marcatge en l'orada va ser major que en la truita.

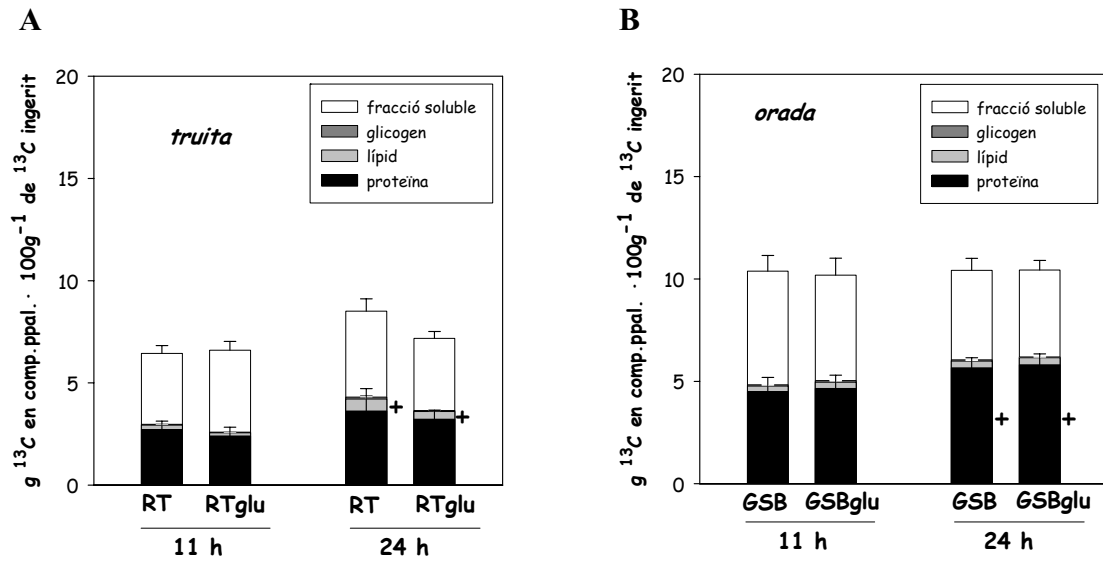


Figura 3.5: Recuperació de ^{13}C en components principals de múscul en truites irisades (A) i orades adaptades (B) a dietes amb diferent relació AAE/AANE a 11 i 24 hores post-ingesta. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=9$. (+) indica diferències significatives ($P < 0.05$) en el marcatge d'aquella fracció entre 11 i 24 hores dins d'un mateix grup.

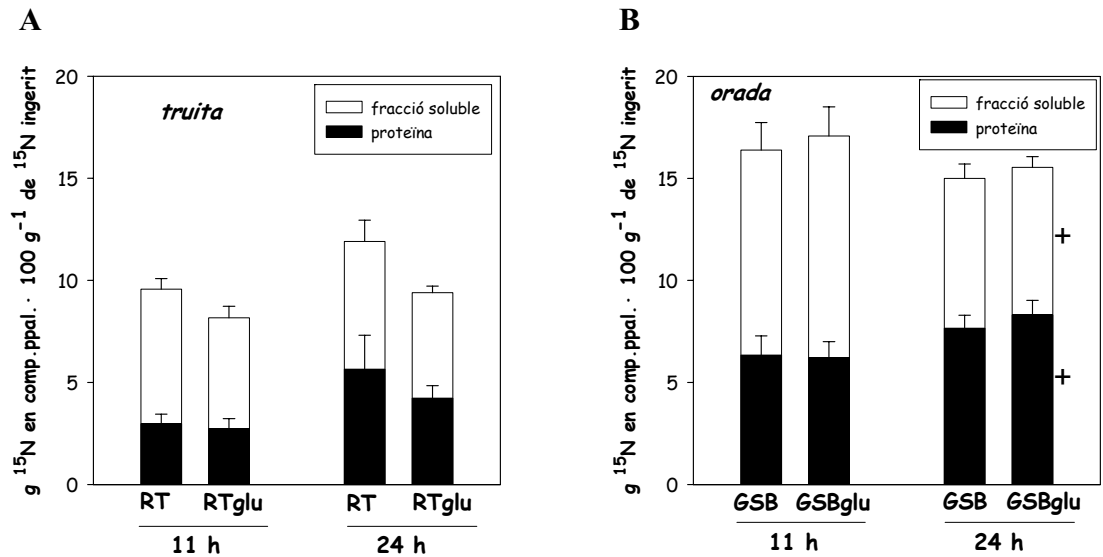


Figura 3.6: Recuperació de ^{15}N en proteïna i fracció soluble de múscul en truites irisades (A) i orades (B) adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE, a 11 i 24 hores post-ingesta. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=9$. (+) indica diferències significatives ($P < 0.05$) en el marcatge d'aquella fracció entre 11 i 24 hores dins d'un mateix grup.

2.2.3. Paquet visceral + greix perivisceral

Els animals alimentats amb les dietes experimentals van presentar un major marcatge total de ^{13}C i de ^{15}N (Figura 3.7). L'increment de marcatge és atribuïble a un major marcatge en proteïna i fracció soluble, significatiu en el cas de l'orada.

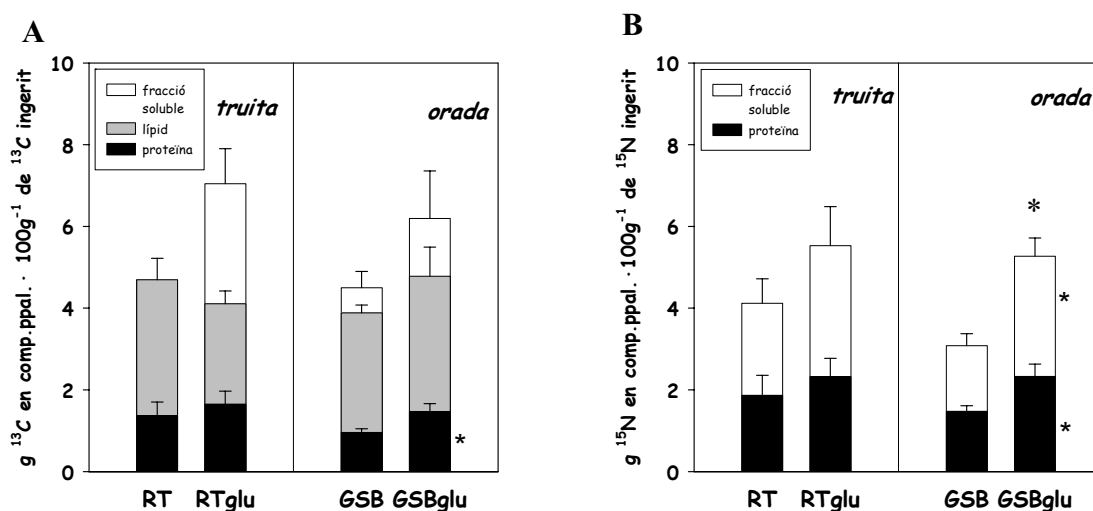


Figura 3.7 : Recuperació de ^{13}C (A) i ^{15}N (B) en components principals del paquet visceral en truites irisades i orades adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE, a 24 hores post-ingesta. Els valors representen la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=9$. Els símbols (*) a la dreta d'una barra indiquen diferències significatives ($P<0.05$) entre compartiments específics entre la situació experimental i la control. (*) a la part superior de la barra indica diferència significativa ($P<0.05$) en la recuperació total del marcador entre grups.

2.2.4. Distribució tissular de ^{13}C i ^{15}N

A la figura 3.8 es representa la quantitat de marcatge dipositat en els teixits 24 hores després de la ingesta. En el cas del ^{13}C , la diferència respecte al 100% pot ser una estima de l'oxidació de la proteïna, encara que també caldria considerar el percentatge de proteïna no digerida.

En la truita, la recuperació de ^{13}C i ^{15}N va ser molt similar entre ambdós marcadors i per les dues dietes estudiades: per RT, 30.7 % de ^{13}C i 31.4% de ^{15}N ; per RTglu, 31.8 % de ^{13}C i 34.6 % de ^{15}N . En l'orada, la recuperació d'ambdós marcadors va ser superior en el grup alimentat amb la dieta glu, de forma significativa pel ^{15}N (31.7 % de ^{13}C i 39 % de ^{15}N per GSB; 36 % de ^{13}C i 45.5 % de ^{15}N per GSBglu). Aquest increment és degut a una major deposició de marcatge en el paquet visceral i la resta de peix.

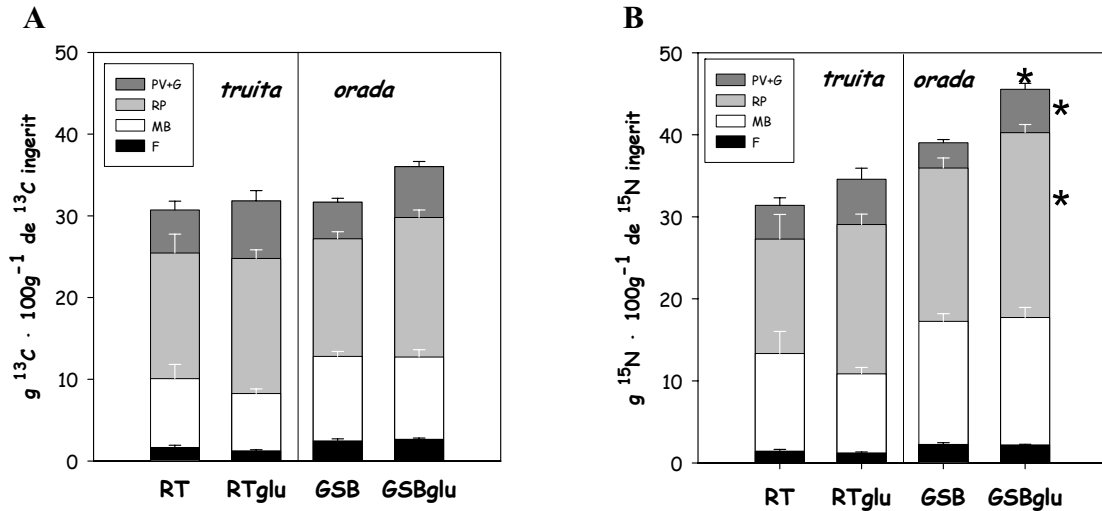
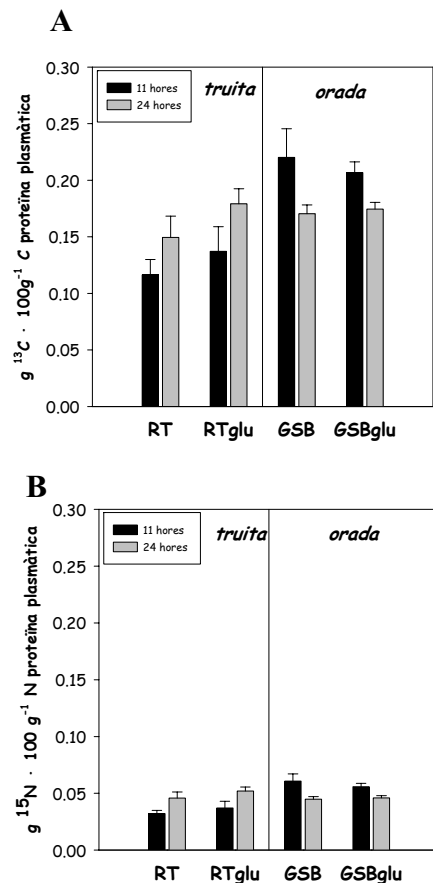


Figura 3.8: Recuperació total de ^{13}C (A) i ^{15}N (B) en teixits (PV+G: paquet visceral amb greix perivisceral, RP: resta de peix –calculat per diferència entre el marcatge total de la carcassa menys el del múscul-, MB: múscul, F: fetge) en truites irisades i orades adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE, 24 hores després de la ingesta. Els resultats s’expressen com a mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n=9. El símbol (*) a la part superior de la barra indica diferències significatives (P<0.05) en la recuperació total de marcatge en el conjunt del peix entre animals control i experimentals. El símbol (*) a la dreta d’una barra indica diferències significatives (P<0.05) en la recuperació de marcatge en un teixit entre animals control i experimentals.

2.2.5. ^{13}C i ^{15}N en proteïnes plasmàtiques

Els enriquiments en ^{13}C i ^{15}N de les proteïnes plasmàtiques a 11 i 24 hores postingesta es mostren a la figura 3.9. No es van trobar diferències en funció de la dieta rebuda, però sí en funció de l’espècie. Així, els dos marcadors van mostrar un valor màxim a 24 hores en la truita i a 11 hores en l’orada. En ambdues espècies, la relació entre el marcatge de ^{13}C i el de ^{15}N era proper a 3/1, d’acord amb la proporció de marcador que havien ingerit. Aquest fet indica que els dos marcadors estan sent utilitzats en les mateixes proporcions.

Figura 3.9: Marcatge de ^{13}C (A) i ^{15}N (B) de les proteïnes plasmàtiques en truites irisades i orades adaptades a dietes amb diferent relació AAE/AANE, a 11 i 24 hores postingesta. Els valors representen la mitjana mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n=9.



Discussió

Un dels primers objectius que es van plantejar al començament d'aquesta tesi era establir la quantitat de ^{13}C i ^{15}N que seria necessària administrar per fer el seguiment de la proteïna de la dieta en els teixits de peix, donat que aquests isòtops es troben de forma natural en uns percentatges de l'1.1 i el 0.36% (^{13}C i ^{15}N respectivament). En d'altres estudis de metabolisme proteic s'han administrat per via oral dosis de ^{15}N del 0.5 i l'1% (Carter i col., 1994, 1998; Meyer-Burgdorff i Rosenow, 1995a). Considerant que el ^{13}C és tres vegades més abundant en la natura que el ^{15}N , es va plantejar fer el marcatge amb un 3% de ^{13}C i un 1% de ^{15}N . Els resultats mostrats en aquest capítol demostren que, amb aquestes dosis, es van enriquir de forma significativa els components principals de fetge i múscul de truita i orada amb l'excepció del glicogen en truita. Per tant, en les condicions experimentals proposades (administració oral i mostreig 11 i 24 hores després de la ingesta) l'abundància natural d'ambdós isòtops no influeix en els resultats d'enriquiment de proteïna i lípids de les dues espècies ni en el cas del glicogen d'orada. El baix marcatge obtingut en el cas del glicogen hepàtic i muscular de truita indica que aquesta espècie té una baixa capacitat de sintetitzar i emmagatzemar glicogen a partir de proteïna i per tant es recomana que quan es vulgui estudiar aquesta via en aquesta espècie es disposi de mostres sense enriquir per tal de poder descomptar l'abundància natural de l'isòtop i mesurar de forma acurada la transformació de la proteïna. Si comparem entre espècies s'observa que, a diferència de la truita, l'orada té una gran capacitat de sintetitzar i emmagatzemar glicogen a partir de proteïnes (major $\delta^{13}\text{C}$ en glicogen). Els canvis temporals (entre 0, 11 i 24 hores) del marcatge del glicogen en l'orada també ens indiquen que aquesta espècie té una gran capacitat de recanvi d'aquesta reserva, com també demostra el fet que en dejuni mobilitzi un 50% del glicogen i el reposi ràpidament (Power i col. 2000). Després d'un dejuni, en aquesta espècie, és suficient un període de 8 hores a 2 dies per recuperar els nivells de glicogen i l'activitat de la 6-fosfofructo-1-kinasa (Metón i col., 2003). Comparant les truites i orades alimentades amb les dietes experimentals, l'activació de la síntesi de glicogen a partir d'aminoàcids es va fer evident 11 hores després de la ingesta en la truita, mentre en l'orada no s'observava fins a les 24 hores. Aquestes diferències temporals entre espècies estarien relacionades amb el fet que, de forma natural (dietes control), la via gliconeogènica és molt més activa en l'orada que en la

truita, com indica el fet que el 40% del total del marcatge del fetge es trobés en forma de glicogen en aquesta espècie. També, a diferència de l'orada, en la truita es va observar un marcat ritme de la reserva de glicogen en fetge. Coincidint amb el que ja havia estat descrit per a truita (Laidley i Leatherland, 1988; Figueroa i col., 2000), el contingut de glicogen en el fetge de truita va incrementar durant l'escotofase i va disminuir durant la fotofase.

Comparant entre isòtops, l'enriquiment del ^{15}N era sempre major que el del ^{13}C . Aquesta diferència està relacionada amb els múltiples destins del carboni proteic (*isotopic routing*, Krueger i Sullivan 1984; Schwarcz, 1991) en comparació amb el nitrogen. Tot i que en termes absoluts l'enriquiment sigui diferent entre isòtops, els increments nets de marcatge ($\Delta\delta$) dels dos isòtops en el fetge i en el múscul eren equivalents; per tant, la transformació de la proteïna de la dieta a proteïna corporal es pot mesurar utilitzant un 1% de ^{15}N o un 3% de ^{13}C . Entre teixits, el major enriquiment del fetge en comparació amb el múscul és explicat per la major taxa de recanvi del fetge en comparació amb la del múscul (Narayansigh i Eales, 1975; Tieszen i col., 1983; Lyndon i col., 1992). Utilitzant ^{14}C -Ile també s'observen aquestes diferències entre teixits (Mannerström i col., 2001). L'ús de ^{13}C també va permetre estudiar la transferència de carboni proteic a lípids. En ambdues espècies, la incorporació de ^{13}C a lípids (21-24%) és comparable a la mesura realitzada per truita amb ^{14}C (30%) (Cowey i Walton, 1988).

En relació al segon objectiu d'aquest capítol, l'increment d'AANE a la dieta va provocar en les dues espècies una major transferència de carboni proteic cap a glicogen, per tant una activació de la gluconeogènesi i la gliconeogènesi. En canvi, el contingut en glicogen hepàtic era menor en aquests grups. Estudis realitzats en el mateix projecte europeu demostren que l'activitat de l'enzim glucokinasa (GK) va disminuir en les dues espècies alimentades amb les dietes experimentals i que la glucèmia plasmàtica no va variar respecte a la situació control (F. Médale, resultats no publicats; Gómez-Requeni i col., 2003). Aquestes dades, juntament amb l'activació de la síntesi de glicogen a partir de proteïna mostrada pels nostres animals, ens estan indicant una situació on l'aport d'hidrats de carboni per part de la dieta és insuficient per mantenir els dipòsits de glicogen i, en últim extrem, en el cas de la truita, l'homeòstasi de la glucosa.

L'increment de la ingesta mostrada per les truites alimentades amb la dieta experimental recolza aquesta situació de demanda energètica. Hi ha diverses raons que podrien explicar una situació d'aquest tipus. D'una banda, les dietes experimentals tenien un menor contingut de carbohidrats que les dietes control (menys de la meitat de blat i pèsol extrusionat que les dietes control). Encara que els carbohidrats no són indispensables, contribueixen a l'estalvi proteic ja que la glucosa s'utilitza com a font d'energia i desvia als aminoàcids lluny de les vies oxidatives i de la gluconeogènesi (Kaushik i Oliva-Teles, 1985; Kaushik, 1997; Peragón i col., 1999; Ruohonen i col., 1999; Metón i col., 1999). D'altra banda, podria ser que l'addició d'àcid glutàmic, aminoàcid gluconeogènic, fos destinat cap a aquesta via, però aquesta idea sembla poc probable ja que recentment s'ha descrit que truites alimentades amb dietes suplementades amb aquest aminoàcid no mostren un increment de l'activitat dels enzims gluconeogènics (Kirchner i col., 2003).

A nivell intestinal en les dues espècies el marcatge de ^{13}C i de ^{15}N en proteïna i fracció soluble era més elevat en animals alimentats amb les dietes experimentals que en els control. Els estudis ecofisiològics amb isòtops estables indiquen que el contingut de ^{15}N en els teixits incrementa quan incrementa el recanvi proteic (revisat per Gannes i col., 1998). Per tant a nivell intestinal, a igualtat de temps i condicions, un increment de marcatge indica un increment del reciclatge proteic (major substitució del ^{12}C i el ^{14}N de les proteïnes per les formes isotòpiques estables, ^{13}C i ^{15}N). En salmons alimentats amb soja es va observar enteritis i un increment la proliferació cel·lular intestinal per compensar el dany cel·lular causat per la soja de la dieta (Sanden i col., 2005). Truites alimentades amb un 30% de soja també mostraven alteracions en l'intestí distal, atribuïdes a l'elevada presència dels hidrats de carboni no digeribles de la soja (Refstie i col., 2000). També en truites alimentades amb un 30% de soja s'ha trobat que en el fetge s'expressaven algunes proteïnes de xoc tèrmic (*heat shock proteins*) que s'han relacionat amb la presència de factors antinutricionals presents a la soja (Martin i col., 2003). El major recanvi cel·lular trobat en els nostres animals podria ser doncs causat per la soja, bé per la seva composició en hidrats de carboni no digeribles o bé per algun factor antinutricional (inhibidors de tripsina, fitats).

Les alteracions produïdes en el fetge i l'intestí van influir sobre el múscul de forma diferent segons l'espècie. En la truita, com a efecte d'una sola menjada marcada, la deposició total d'ambdós marcadors tenia tendència a ser inferior en els animals

alimentats amb la dieta experimental, degut tant a una menor deposició en forma de proteïna com de la fracció soluble. Aquest menor marcatge indica una menor arribada de les proteïnes de la dieta cap al teixit muscular. El fet que les dietes experimentals continguessin soja pot haver fet disminuir la disponibilitat dels AA, com s'ha vist en altres estudis (Sandholm i col., 1976; Dabrowski i col., 1989; Krogdahl i col., 1994). D'altra banda, incrementar la quantitat d'un determinat AA, en aquest cas el glutàmic, pot fer disminuir la proporció relativa dels altres AA i provocar un desequilibri d'AA que repercutiria negativament sobre el creixement. A llarg termini, la menor deposició de proteïnes, en el cas de la truita, podria provocar un menor creixement dels animals, com indiquen els pesos finals assolits. A diferència de la truita, en l'orada no es van manifestar canvis a nivell muscular, per tant l'orada no es va mostrar tant afectada com la truita.

A nivell comparatiu entre espècies, es va observar una major deposició de marcatge en els teixits i en la proteïna plasmàtica en les orades en comparació amb les truites, 24 hores després de la ingesta. Aquestes diferències poden ser degudes a un metabolisme una mica més ràpid en l'orada, cultivada a 25°C, que en la truita, cultivada a 17°C. Així per exemple, a aquestes temperatures, el pic màxim d'excreció d'amoni ocorre en l'orada a 3 hores de la ingesta (Gómez-Requeni i col., 2003) i en la truita a 5-7 hores (Martin i col., 2003).

En relació a la composició corporal dels animals, es va observar una reducció de les reserves lipídiques en les truites i orades alimentades amb les dietes experimentals en comparació amb la situació control. En els mamífers, la naturalesa de la font proteica pot afectar als enzims de la via lipogènica. Així s'ha vist que rates alimentades amb soja mostraven una disminució de l'activitat dels enzims G6PD, ME i FAS en comparació amb rates alimentades amb caseïna i farina de peix (Herzberg i Rogerson, 1984; Iritani i col., 1986, 1996; Kayashita i col., 1996). En els peixos, concretament en el salmó, la inclusió d'un 28% i un 55% de soja en la dieta provoca una disminució lineal de la deposició de lípids en la carcassa (Opstvedt i col., 2003). En la truita s'ha observat que els nivells de colesterol en plasma disminueixen quan són alimentades amb concentrat de proteïna de soja, en comparació amb truites alimentades amb un 100% de farina de peix (Kaushik i col., 1995). El possible efecte de la font proteica sobre la lipogènesi en

peixos no ha estat estudiada, però en rates i hámsters s'ha identificat el contingut en isoflavones de la soja com a factor inhibidor de la lipogènesi (Balmir i col., 1996).

En conclusió, en les nostres condicions experimentals un 1% de ^{15}N i un 3% de ^{13}C són adients per estudiar les transformacions de la proteïna de la dieta. Aquestes dosis seran emprades en els futurs estudis de substitució. En relació al segon objectiu d'aquest capítol es pot concloure que l'addició d'àcid glutàmic a la dieta no va millorar el creixement i que les dietes experimentals van provocar una sèrie d'alteracions en la utilització de la proteïna de la dieta que estarien més relacionades amb el contingut de soja que amb la relació AAE/AANE de la dieta. D'altra banda, no es descarta que alguns efectes hagin estat causats per un menor contingut de carbohidrats en les dietes experimentals en relació a les dietes control. Els millors creixements es van obtenir amb les dietes RT i GSB, formulades amb una relació AAE/AANE de 1.03 i 1.13 respectivament. Aquestes dietes s'estableixen com a dietes de referència pels següents estudis de substitució.

BLOC EXPERIMENTAL II

Substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal en la truita irisada. Ús de la proteïna de la dieta

Quatre grups de truites irisades van ser alimentades durant dotze setmanes amb dietes (Taula 2.4) amb diferent percentatge de substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal. La dieta FM estava elaborada únicament a partir de farina de peix i es va establir com a dieta de referència. Les dietes PP50, PP75 i PP100 contenien quantitats creixents de proteïna vegetal, 50%, 75% i 100% respectivament. Les dietes vegetals es van suplementar amb aminoàcids essencials cristal·lins per reflectir la composició aminoacídica del múscul (Taula 2.7). En les quatre dietes la relació AAE/AANE era propera a 1, fruit de les conclusions extretes a partir del bloc experimental I. Totes les dietes eren isoenergètiques i isoproteiques (Taula 2.5) i cobrien els requeriments nutricionals establerts per truita pel National Research Council (1993).

L'objectiu d'aquest treball és estudiar l'efecte de la substitució sobre l'ús de la proteïna de la dieta, mesurant la incorporació de ^{13}C i ^{15}N en els components principals dels teixits, la incorporació de ^{13}C en els AA lliures de plasma i múscul (com a indicador de l'ús diari de la proteïna de la dieta), i, els nivells d'aquests AA després de quatre mesos d'adaptació a les dietes. Tanmateix es presenta la composició corporal i la glucèmia d'aquests animals després de quatre mesos d'alimentació.

Resultats

1. Creixement i composició corporal

El reemplaçament de la proteïna animal per proteïna vegetal en la dieta va tenir un efecte significatiu sobre el creixement dels animals. Per sobre d'un 50% de substitució es va observar una disminució del pes final i de la taxa de creixement específic, més accentuat en el grup PP100 (Taula 4.1). Durant tot el període de creixement les truites alimentades amb PP75 i PP100 van mostrar hiperfàgia.

Taula 4.1: Taxes de creixement i ingesta de truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Pes inicial (g)	19.2 0.2	19.2 0.2	19.2 0.2	19.2 0.1
Pes final (g)	147.1 1.8 a	142.4 2.6 a	135.6 4.9 b	111.1 2.5 c
Taxa de creixement específic (%)	2.6 0.02 a	2.6 0.01 a	2.5 0.03 b	2.2 0.01 c
Ingesta (g MS/kg PCP/dia)	14.9 0.2 b	14.8 0.3 b	15.4 0.2 a	15.4 0.1 a

Valors proporcionats per l'INRA. Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre dietes (prova Student Newman-Keuls; $P < 0.05$)
 Taxa de creixement específic = $[100 * [\ln(\text{pes corporal final}) - \ln(\text{pes corporal inicial})] / \text{dies}]$
 MS: matèria seca. PCP: pes corporal promig

A la Taula 4.2 es presenta la composició corporal dels quatre grups. De forma similar a com es descrivia en el bloc experimental I, el contingut de glicogen hepàtic va mostrar un ritme diari, presentant nivells més elevats a les 11 hores post-ingesta que a les 24 hores. En el grup PP100 els nivells de glicogen hepàtic i muscular, a 24 hores de la ingesta, eren significativament superiors als presents en els altres grups de reemplaçament (PP50 i PP75).

El percentatge de lípids de la carcassa dels animals alimentats amb les tres dietes vegetals, així com exclusivament en el fetge de PP50, era major ($P < 0.05$) que el dels animals alimentats amb FM. De forma oposada, a partir d'un 50% de substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal, el percentatge de lípids del paquet visceral disminuïa, encara que no de forma significativa.

Taula 4.2: Composició corporal de truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Fetge (11 h)				
IHS ¹	1.33 0.07	1.11 0.08	1.07 0.07	1.24 0.10
Lípid	3.81 0.15	3.81 0.25	3.60 0.09	3.58 0.07
Glicogen	2.47 0.78	0.85 0.25	2.25 0.38	2.24 0.69
Proteïna	15.05 0.60	16.29 0.29	15.68 0.38	14.64 0.47
Fetge (24 h)				
IHS ¹	1.16 0.10	1.05 0.05	1.15 0.13	1.17 0.06
Lípid	3.57 0.07 a	4.02 0.10 b	3.52 0.11 a	3.31 0.09 a
Glicogen	1.03 0.29 ab+	0.64 0.11 a	0.59 0.21 a	1.77 0.23 b+
Proteïna	15.98 0.46	16.84 0.13	16.79 0.18	15.77 0.16
Múscul (11 h)				
Lípid	4.04 0.63	4.06 0.47	5.26 0.83	3.84 0.71
Glicogen	0.29 0.05	0.23 0.02	0.33 0.03	0.39 0.08
Proteïna	19.58 0.49	18.56 0.58	18.77 0.97	18.31 0.42
Múscul (24 h)				
IMS ²	49.5 1.17	50.46 1.68	53.60 0.66	49.83 1.21
Lípid	3.08 0.36	3.53 0.33	3.51 0.55	4.42 0.42
Glicogen	0.15 0.04 a	0.18 0.03 a	0.19 0.03 a	0.41 0.04 b
Proteïna	19.58 0.77 ab	19.41 0.28 a	20.31 0.33 ab	20.51 0.55 b
Paquet visceral + greix peri-visceral (24 h)				
IVS ³	7.73 0.40	7.36 0.21	7.36 0.43	8.45 0.41
Lípid	46.1 5.79	44.00 3.03	37.15 2.61	36.43 2.88
Proteïna	4.12 0.49	7.63 0.95	7.12 1.68	5.46 1.21
Carcassa (24 h)				
Lípid	6.65 0.38 a	8.20 0.31 b	8.38 0.19 b	8.18 0.38 b
Proteïna	16.02 0.37 ab	15.37 0.36 a	16.51 0.24 ab	17.75 0.25 b

Es presenten els resultats dels animals mostrejats 11 i 24 hores després de la ingesta.

¹IHS = g fetge · 100 g⁻¹ pes corporal

²IMS = g múscul · 100 g⁻¹ pes corporal

³IVS = g vísceres · 100 g⁻¹ pes corporal

Els valors s'expressen com a percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de n=7 (6 experimentals + 1 control).

Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups (P<0.05). (+) indica diferències significatives entre 11 i 24 hores per un mateix grup (P < 0.05)

2. *Glucèmia*

Els nivells de glucosa plasmàtica (Figura 4.1) en els animals alimentats amb PP75 van disminuir ($P < 0.05$) de 11 a 24 hores, presentant aquest grup a 24 hores una concentració de glucosa plasmàtica significativament inferior que el grup FM.

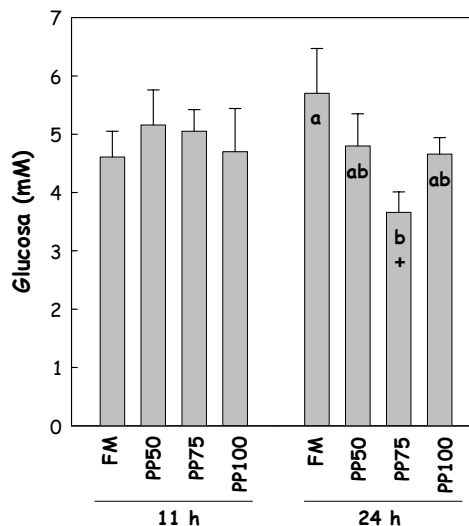


Figura 4.1: Nivells de glucosa plasmàtica 11 i 24 hores després de la ingesta en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors es presenten en mmols glucosa/L de plasma i corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana per $n=6$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P < 0.05$). (+) indica diferències significatives entre 11 i 24 hores per un mateix grup ($P < 0.05$)

3. *Destí de la proteïna de la dieta en teixits i components principals*

3.1. *Fetge*

La Figura 4.2 mostra el percentatge de ^{13}C i ^{15}N , en relació al total de marcatge ingerit, recuperat en el fetge i els seus components principals, 11 i 24 hores després de la ingesta forçada. Onze hores després de la ingesta, la recuperació total de ^{13}C i ^{15}N tendia a ser major en el grup FM i PP50 que en els altres grups. Vint-i-quatre hores després de la ingesta, la recuperació total de ^{13}C no mostrava el mateix perfil que la recuperació total de ^{15}N , degut a la transferència de carboni proteic a glicogen i lípids.

La incorporació total i la distribució en components principals de ^{13}C com a resultat de la utilització de la proteïna de la dieta d'una sola ingesta, resultats a 24 hores, va ser molt similar en FM i PP50 (Figura 4.2 A). A diferència de FM, en PP50 la incorporació de ^{13}C en lípids va incrementar ($P < 0.05$) de 11 a 24 hores, fet que indica un increment de la lipogènesi.

En el grup PP75, la recuperació total de ^{13}C , 24 hores després de la ingesta, era el 60% de la trobada en els altres grups, però la proporció relativa de ^{13}C en components principals en aquest grup era equivalent a la del grup FM (45% en proteïna, 11% en glicogen, 14 % en lípid i 30% en fracció soluble). En el grup PP100, la incorporació de

^{13}C a glicogen representava el 26% del total del marcatge del fetge, valor quatre vegades més elevat que a 11 hores i més del doble del que representava en els altres grups, evidenciant un activitat gluconeogènica més elevada en el grup PP100 que en els altres grups.

Vint-i-quatre hores després de la ingesta, la incorporació total de ^{15}N (Figura 4.2 B) era superior en el grup FM que en els grups alimentats amb proteïna vegetal, encara que no de forma significativa. La distribució del marcadore 24 hores després de la ingesta era similar en tots els grups (proteïna: 54-59% i fracció soluble: 41-46%).

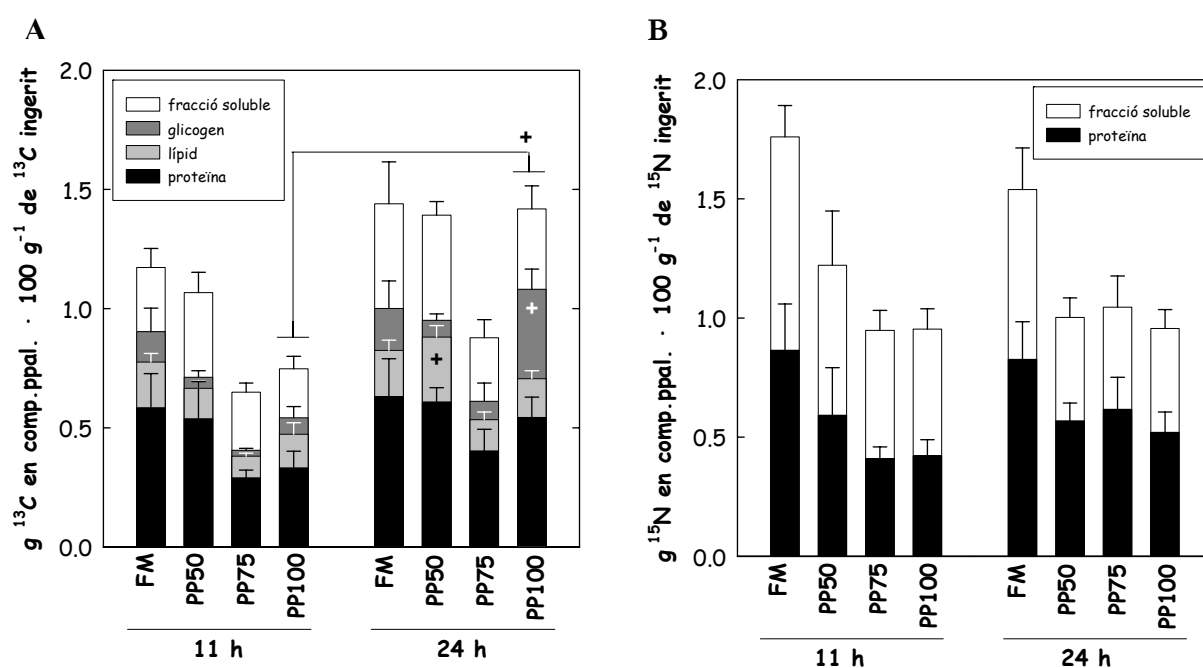


Figura 4.2: Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble de fetge i (B) ^{15}N en proteïna i fracció soluble de fetge, 11 i 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$. (+) indica diferència significativa entre 11 i 24 hores per un mateix grup ($P<0.05$). El símbol a l'interior d'una barra indica diferència significativa en compartiment específic. El símbol a la part superior de la barra indica diferència significativa en la recuperació total del marcadore.

3.2. Múscul blanc

La incorporació de ^{13}C i ^{15}N en el múscul blanc i els seus components principals es mostra a la Figura 4.3. Onze hores després de la ingesta es recuperava menys ^{13}C en PP100 (4%) que en FM (7.6%) i menys ^{15}N en tots els grups vegetals (7%) en relació a FM (11%). Tot i que els dos marcadors no mostren exactament el mateix perfil, es pot observar que a 11 hores l'arribada de la proteïna de la dieta als teixits era més lenta en el

grup PP100 que en FM. En canvi, a 24 hores, la recuperació de ^{13}C en el grup PP100 era el doble en relació a 11 hores i superior respecte a FM, principalment per un increment significatiu de ^{13}C en la fracció proteica. Aquest increment del marcatge en la fracció proteica també s'observa amb ^{15}N , tot i que en aquest cas no era significatiu.

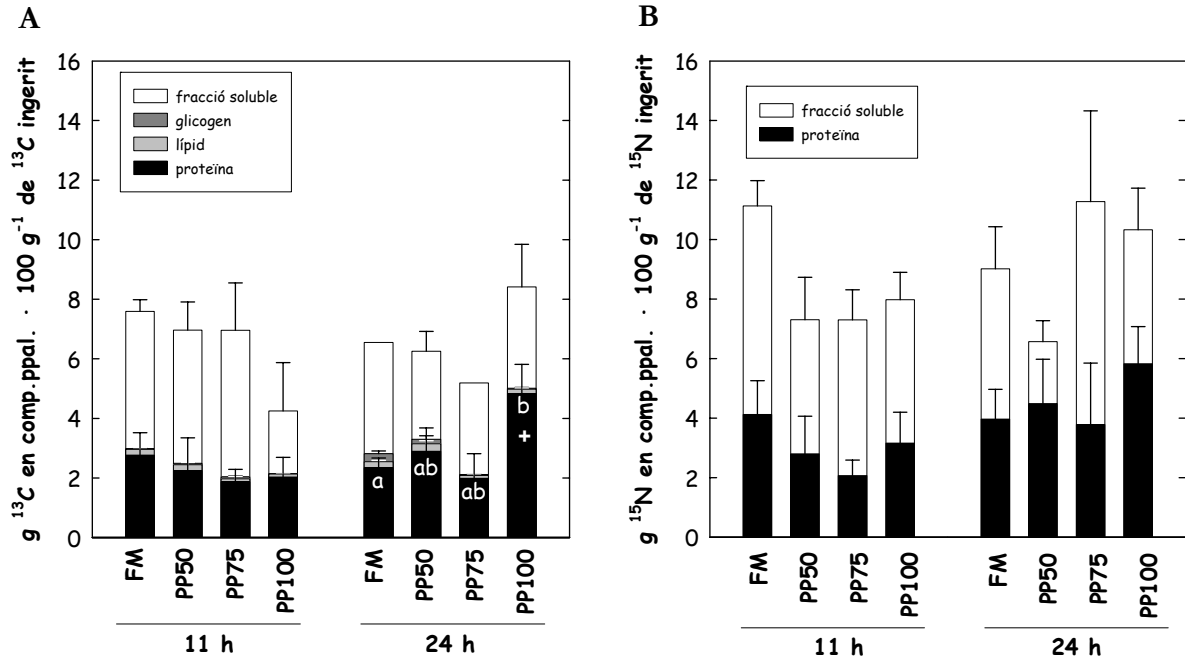


Figura 4.3 : Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble de múscul blanc i (B) ^{15}N en proteïna i fracció soluble de múscul blanc, 11 i 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$). (+) indica diferència significativa entre 11 i 24 hores per un mateix grup ($P<0.05$).

3.3. Paquet visceral + greix perivisceral

La font proteica de la dieta no va influir significativament en l'ús i destí de la proteïna de la dieta en el paquet visceral (+ greix perivisceral) (Figura 4.4), tot i que la recuperació total de ^{13}C tenia tendència a ser menor en les truites alimentades amb les dietes PP75 i PP100 en comparació amb els altres grups.

3.4. Carcassa

En la fracció corresponent a carcassa no es van trobar canvis significatius entre grups (Figura 4.5)

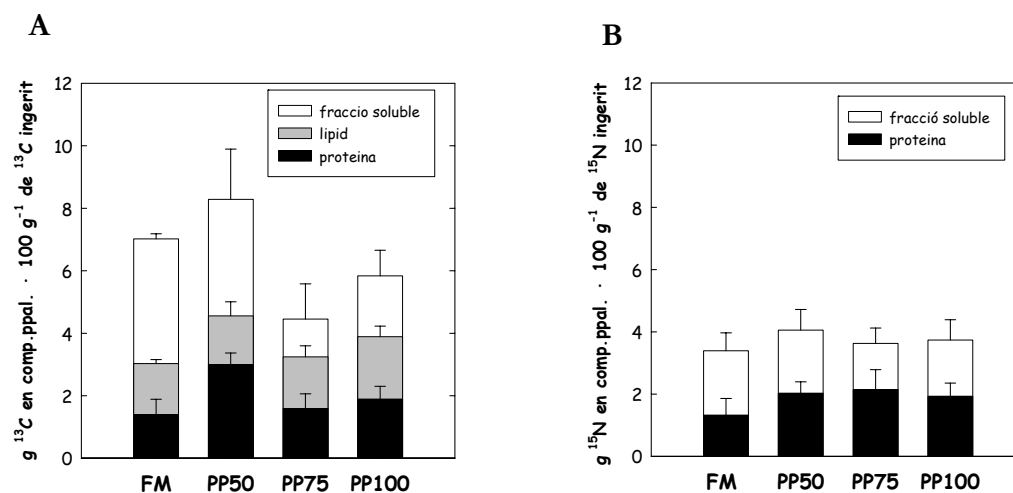


Figura 4.4: Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid i fracció soluble del paquet visceral + greix perivisceral i (B) ^{15}N en proteïna i fracció soluble del paquet visceral + greix perivisceral, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$.

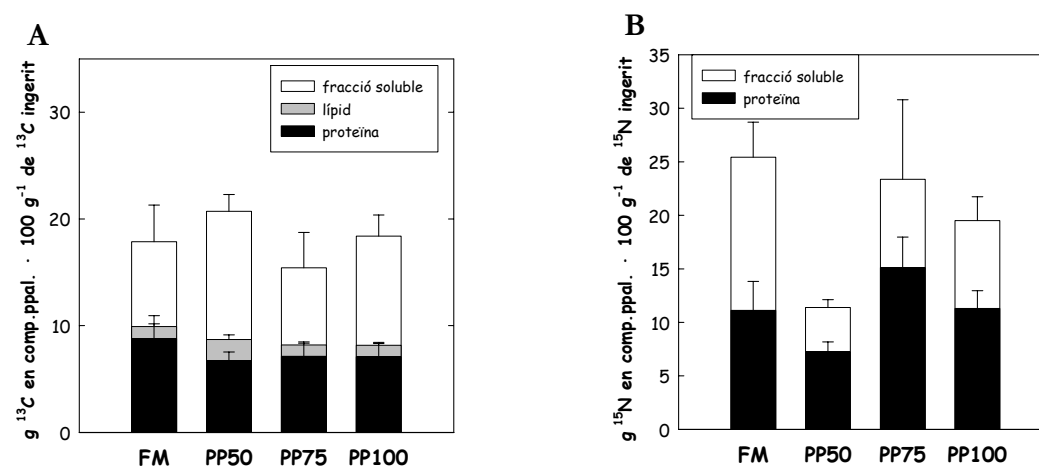


Figura 4.5: Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid i fracció soluble de carcassa i (B) ^{15}N en proteïna i fracció soluble de carcassa, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$.

3.5. Recuperació total de ^{13}C i ^{15}N en teixits

A la Figura 4.6 es mostra la recuperació total de ^{13}C i ^{15}N en tot el peix, 24 hores després de la ingesta, com a suma de les recuperacions totals de les fraccions analitzades. La diferència entre el total del marcatge administrat (100%) i el marcatge de ^{13}C i ^{15}N recuperat en l'organisme, permet establir, de forma aproximada, que 24 hores després de la ingesta entre un 67% i un 79% de l'esquelet de carboni de les proteïnes havia estat oxidat i que entre un 69% i un 80% del nitrogen de la proteïna de la dieta havia estat excretat, sense tenir en compte que una mínima part de la dieta que no hauria estat digerida. Tot i que s'han anat observant diferències en funció de la dieta en els diferents compartiments estudiats, la recuperació total de marcadors no va mostrar diferències significatives entre grups.

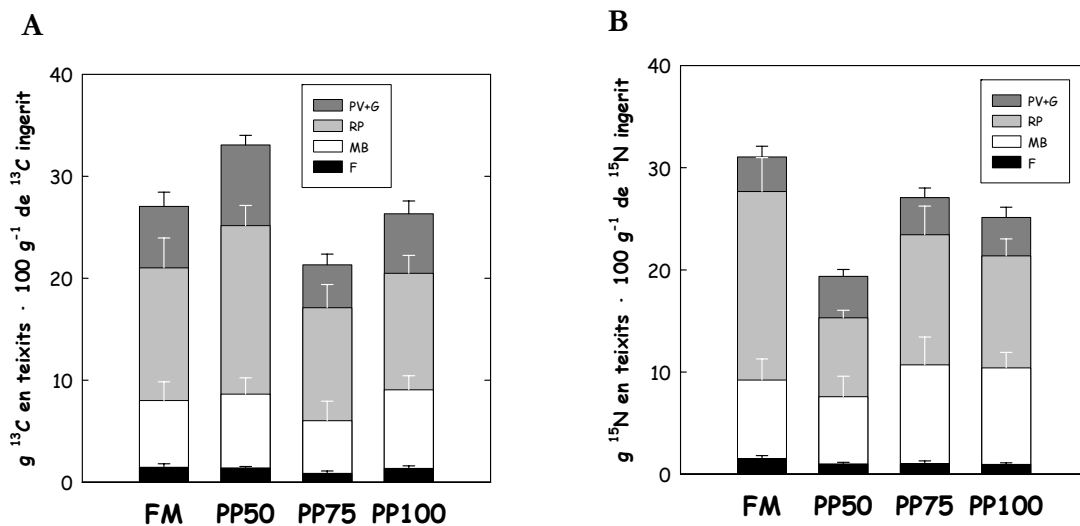


Figura 4.6: Recuperació total de ^{13}C (A) i ^{15}N (B) en teixits de truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal, 24 hores després de la ingesta. La recuperació total es calcula com la suma de les recuperacions totals en teixits (PV+G: paquet visceral més greix perivisceral, RP: resta de peix, calculat per diferència entre el marcatge total en carcassa menys el marcatge total en múscul blanc, MB: múscul blanc, F: fetge). Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana per $n=6$

4. Concentració i marcatge de ^{13}C dels AA lliures del plasma

La concentració total d'AA lliures en plasma 11 hores després de la ingesta no va diferir entre grups, encara que s'observa una menor concentració tant d'AAE com d' AANE en el grup PP100 en comparació amb FM (Taula 4.3). La concentració de Lys en els grups PP75 i PP100 i la concentració de Thr en el grup PP100 eren menors respecte a FM.

Taula 4.3: Concentració ($\mu\text{mols/L}$ plasma) dels AA lliures de plasma, 11 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM		PP50		PP75		PP100	
HISTIDINA	32.4	5.6 ab	47.2	8.4 a	44.6	12.3 ab	11.0	1.6 b
ISOLEUCINA	280.2	35.5	194.4	33.2	248.4	84.5	178.8	25.5
LEUCINA	460.4	54.2	502.8	114.5	549.4	160.8	433.6	15.5
LISINA	438.5	30.7 a	399.8	31.8 a	109.0	43.7 b	48.3	8.7 b
METIONINA	163.3	35.7	110.9	13.6	104.4	40.9	43.0	19.0
FENILALANINA	165.9	31.3	171.4	41.6	124.0	37.4	102.7	21.5
TIROSINA	49.3	12.3	68.8	8.5	72.1	16.1	63.9	15.3
TREONINA	490.8	78.3 a	463.7	51.5 ab	406.5	63.3 ab	220.8	21.1 b
VALINA	687.1	11.6	733.2	230.8	696.5	122.3	546.1	14.5
Alanina	812.9	151.1	585.6	58.5	520.8	44.0	671.7	84.4
Àcid Aspàrtic	22.9	0.0	16.0	0.0	10.5	0.0	11.8	0.0
Àcid Glutàmic	57.8	12.2	48.6	11.4	48.1	16.7	41.9	15.6
Glicina	899.9	149.7 ab	597.2	24.4 a	529.7	35.6 ab	364.0	40.2 b
Prolina	137.3	32.0	148.9	19.1	111.4	48.5	224.6	94.2
Serina	269.7	40.2 a	100.9	22.7 b	73.7	21.1 b	80.0	35.3 b
AA totals	4637.4	621.2	3907.0	514.0	3780.2	671.2	2807.1	223.3
AAE	2618.6	180.8	2413.5	446.3	2451.0	611.3	1539.9	94.9
AANE	2018.8	445.1	1493.5	67.8	1329.2	78.1	1202.5	140.4
AAE/AANE	1.38	0.20	1.61	0.23	1.81	0.41	1.35	0.09

Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de $n=4$ (3 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

En situació basal, 24 hores després de la ingesta, la concentració d'AA lliures totals en plasma era inferior ($P<0.05$) en els grups PP75 i PP100 respecte a FM (Taula 4.4) i la relació AAE/AANE era la meitat en el grup PP100 que en FM. Tal com s'observava a onze hores, la concentració de Lys era menor en PP100 que en FM.

Taula 4.4: Concentració ($\mu\text{mols/L}$ plasma) dels AA lliures de plasma, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM		PP50		PP75		PP100	
HISTIDINA	49.6	10.5	73.2	34.2	35.1	6.4	29.3	9.0
ISOLEUCINA	440.0	86.3	363.9	92.2	239.3	59.6	201.1	35.8
LEUCINA	696.3	124.8	675.8	173.6	431.1	87.2	370.5	59.0
LISINA	1068.9	336.4 ab	498.9	32.8 a	223.9	80.9 ab	166.9	44.0 b
METIONINA	102.2	19.9	75.9	16.4	71.7	8.6	83.2	24.3
FENILALANINA	191.4	57.9	168.1	17.6	143.4	13.6	134.1	24.8
TIROSINA	82.7	17.3	62.9	10.3	37.9	4.3	44.5	6.7
TREONINA	1026.7	275.9	592.9	108.5	299.0	74.9	407.4	143.3
VALINA	1217.8	161.5 a	1484.0	130.3 a	986.4	141.3 ab	532.0	147.1 b
Alanina	614.5	195.8	751.6	122.6	367.2	13.4	583.6	83.6
Àcid Aspàrtic	15.5	8.9	13.1	0.5	17.5		12.4	4.0
Àcid Glutàmic	102.2	27.8	75.0	18.3	27.3	2.1	35.9	8.8
Glicina	804.5	95.7 a	560.0	48.7 a	315.8	31.0 b	455.6	69.8 b
Prolina	123.8	42.9	91.2	18.2	70.4	16.5	47.1	9.4
Serina	205.6	48.5	78.0	26.3	57.3	9.3	77.2	17.8
AA totals	7586.6	1047.3 a	5831.2	654.6 ab	3560.9	379.1 b	3262.2	495.3 b
AAE	5627.1	1015.8 a	4181.5	542.2 ab	2682.7	397.5 ab	1985.3	517.2 b
AANE	1858.3	329.1 ab	1562.4	131.9 a	835.4	50.4 b	1204.4	110.4 ab
AAE/AANE	3.18	0.98	2.53	0.24	3.09	0.56	1.61	0.46

Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de $n=4$ (3 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

Les Figures 4.7, 4.8, 4.9 i 4.10 mostren l'enriquiment en ^{13}C dels AA, informant-nos de l'efecte que té una sola menjada sobre la fracció d'AA lliures. Vint-i-quatre hores després de la ingesta, el marcatge dels AAE i AANE (Figures 4.8 i 4.10) tendia a ser més baix en els grup PP75 i PP100 respecte a FM. En comparació amb FM, la menor concentració d'AA en plasma i el menor marcatge de ^{13}C observat 24 hores després de la ingesta en els grups PP75 i especialment en PP100 indiquen que en aquests grups l'arribada o la disponibilitat dels AA després dels processos de digestió, absorció i metabolisme, era més baixa que en FM. Tanmateix, la quantitat de Lys en plasma expressada com a $\mu\text{g }^{13}\text{C}/100 \text{ g de }^{13}\text{C}$ ingerit era menor ($P<0.05$) en PP100 que en FM tant a 11 com a 24 hores (FM: 1.5 ± 0.8 , PP100: 0.1 ± 0.03).

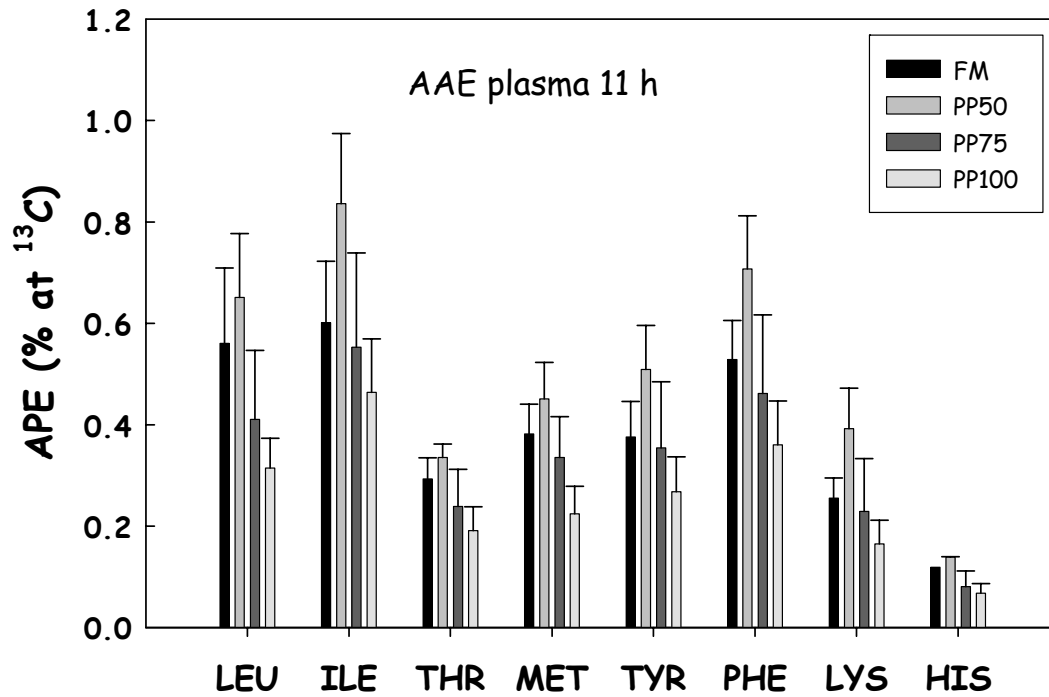


Figura 4.7: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE plasmàtics, 11 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$.

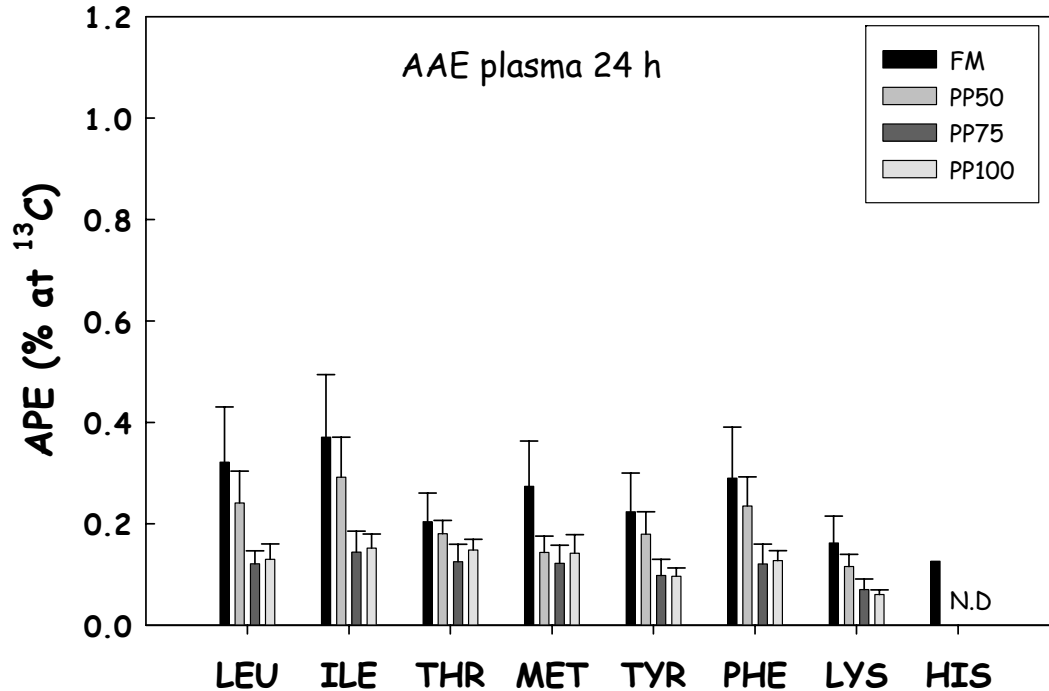


Figura 4.8: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE plasmàtics, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$.

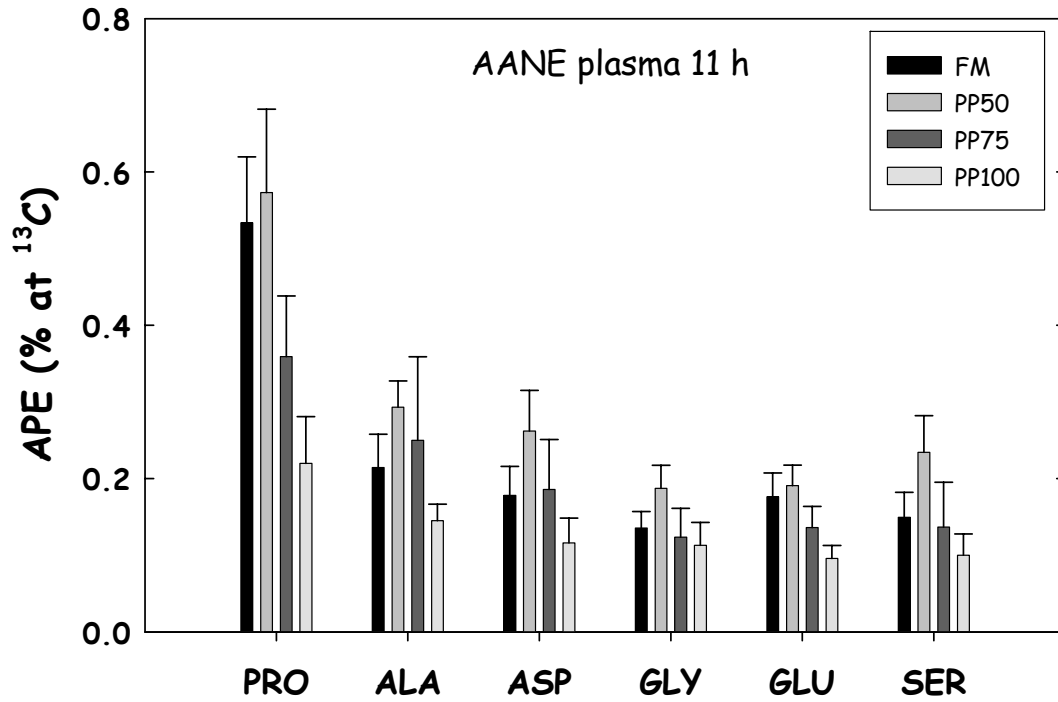


Figura 4.9: Marcatge (àtoms ¹³C/100 àtoms C) dels AANE plasmàtics, 11 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana de n=3.

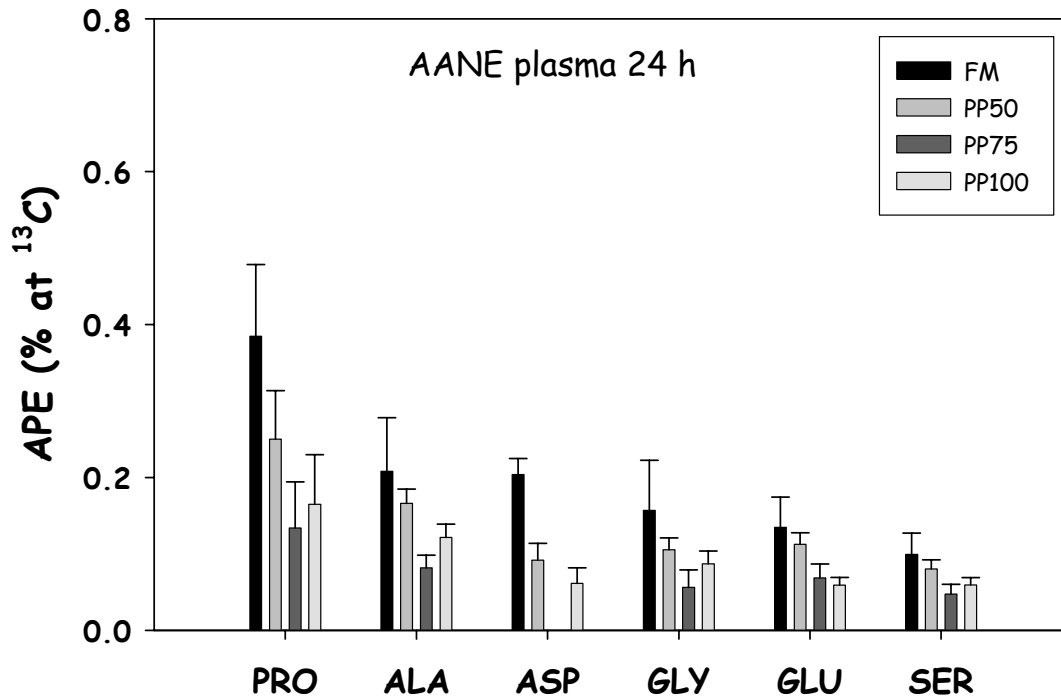


Figura 4.10: Marcatge (àtoms ¹³C/100 àtoms C) dels AANE plasmàtics, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana de n=3.

5. Concentració i marcatge de ^{13}C dels AA lliures del múscul blanc

La concentració total d'AA lliures en múscul (Taula 4.5) va incrementar de forma progressiva a mesura que incrementava el percentatge de proteïna vegetal de la dieta. Entre els AAE es va observar un increment d' His (23% del total d'AAE en FM i 56%, 80% i 76 % en PP50, PP75 i PP100 respectivament) i Thr. En canvi la resta d'AAE disminuïen, encara que no de forma significativa, a mesura que incrementava la substitució de la farina de peix. Entre els AANE, el grup PP100 presentava 6 vegades més Pro i 4 vegades més Ala que el grup FM. Descomptant els nivells d'His i Gly, es pot observar que la relació AAE/AANE era inferior en els grups PP75 i PP100 en comparació amb FM.

Taula 4.5: Concentració ($\mu\text{mols/g}$ múscul) dels AA lliures de múscul, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM		PP50		PP75		PP100	
HISTIDINA	0.49	0.15 a	1.68	0.23 ab	3.05	0.50 b	4.66	1.47 ab
ISOLEUCINA	0.10	0.03	0.08	0.01	0.03	0.002	0.05	0.09
LEUCINA	0.16	0.06	0.16	0.02	0.07	0.008	0.12	0.02
LISINA	0.34	0.1	0.5	0.2	0.12	0.03	0.29	0.08
METIONINA	0.05	0.01	0.06	0.003	0.03	0.003	0.04	0.009
FENILALANINA	0.06	0.01	0.05	0.006	0.04	0.01	0.03	0.003
TREONINA	0.45	0.08	0.38	0.03	0.67	0.21	0.75	0.13
VALINA	0.42	0.12	0.33	0.03	0.18	0.02	0.21	0.02
Alanina	0.38	0.1	0.78	0.24	1.12	0.38	1.57	0.62
Àcid Aspàrtic	0.03	0.01	0.03	0.003	0.06	0.17	0.07	0.14
Àcid Glutàmic	0.12	0.03	0.11	0.03	0.13	0.02	0.19	0.2
Glicina	6.26	1.91	7.63	0.16	9.51	1.71	16.14	3.18
Prolina	0.05	0.007	0.16	0.06	0.29	0.09	0.30	0.12
Serina	0.08	0.02	0.11	0.001	0.19	0.07	0.23	0.06
AA totals	9.0	1.6 a	11.7	0.1 ab	14.7	2.5 ab	24.7	2.8 b
AAE	2.1	0.2	2.9	0.2	3.8	0.9	6.2	1.5
AANE	6.9	1.8	8.8	0.4	10.9	1.9	18.5	3.9
AA totals -(His+Gly)	2.25	0.41	2.49	0.34	2.24	0.60	3.87	0.87
AAE (- His)	1.58	0.34	1.36	0.11	0.89	0.19	1.50	0.16
AANE (- Gly)	0.66	0.13	1.12	0.22	1.35	0.41	2.37	0.73
AAE/AANE - (His+Gly)	2.64	0.54 a	1.24	0.15 ab	0.70	0.06 b	0.82	0.21 b

Els valors s'expressen com a percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de n=4 (3 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P < 0.05$).

A diferència del que s'observava en plasma, el marcatge de ^{13}C dels AA del múscul, 24 hores després de la ingesta, no va mostrar diferències entre grups (Figures 4.11 i 4.12).

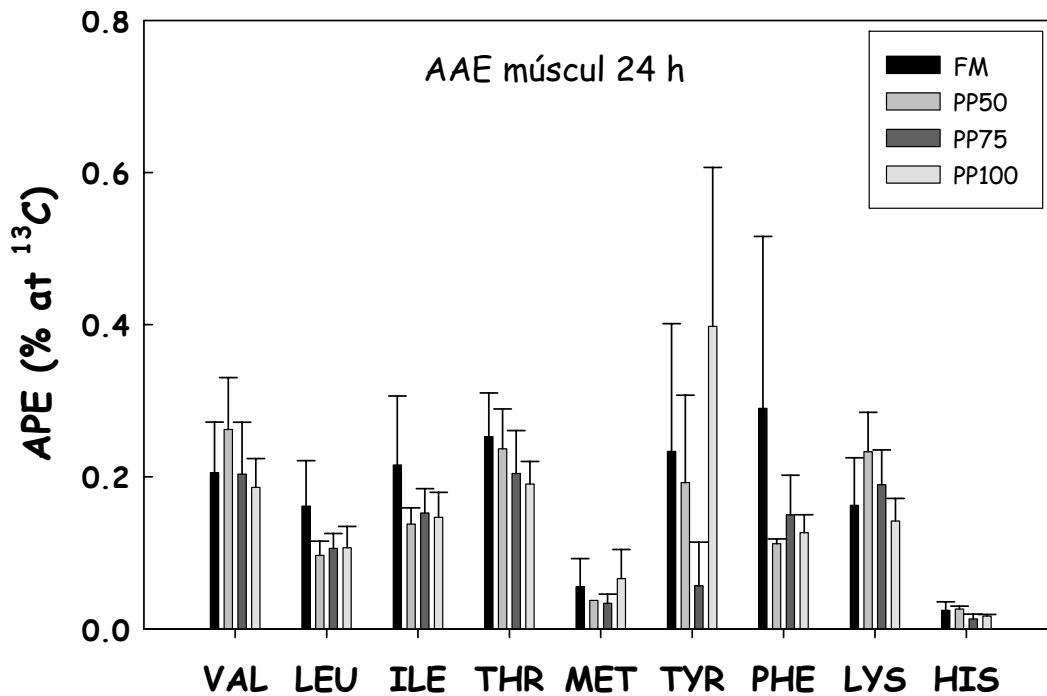


Figura 4.11: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE de múscul, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$.

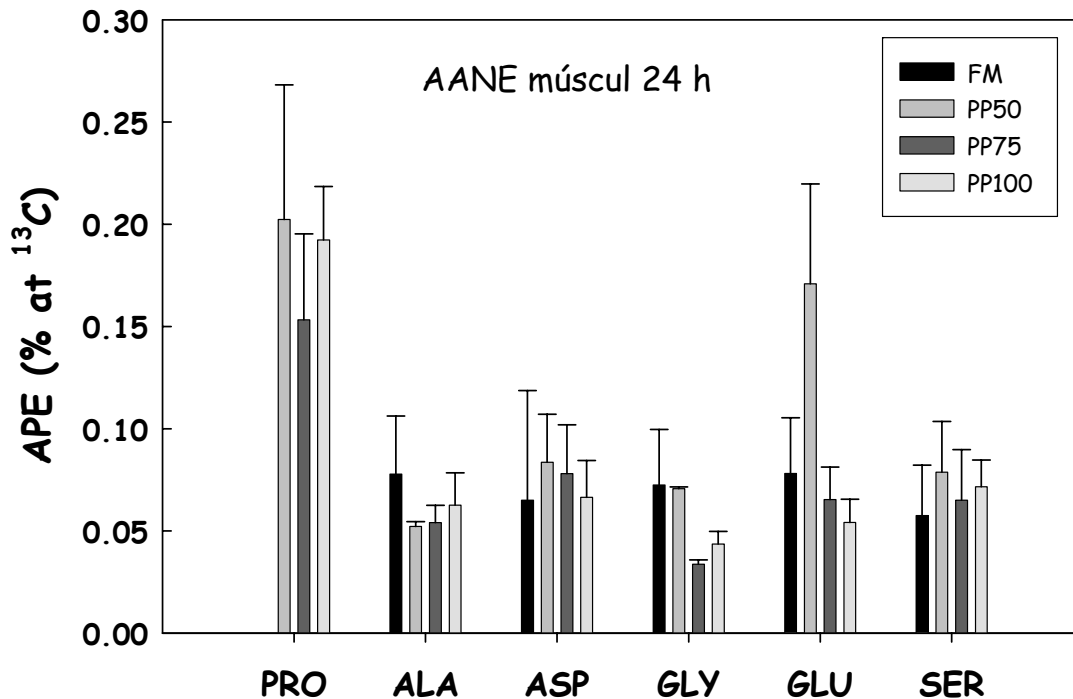


Figura 4.12: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AANE de múscul, 24 hores després de la ingesta, en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$.

La disponibilitat dels AA, calculada com a μg de ^{13}C presents en cada AA per cada g de ^{13}C ingerit, permet obviar la dilució que pugui haver patit el marcador com a efecte de la major o menor concentració dels AA entre grups. Expressant els resultats d'aquesta manera, l'elevada variabilitat no va permetre detectar canvis significatius entre grups, encara que el marcatge total dels AA ramificats (Val, Leu, Ile) i de Phe en els grups PP75 i PP100 tendien a ser inferiors que en FM i PP50 (Figura 4.13).

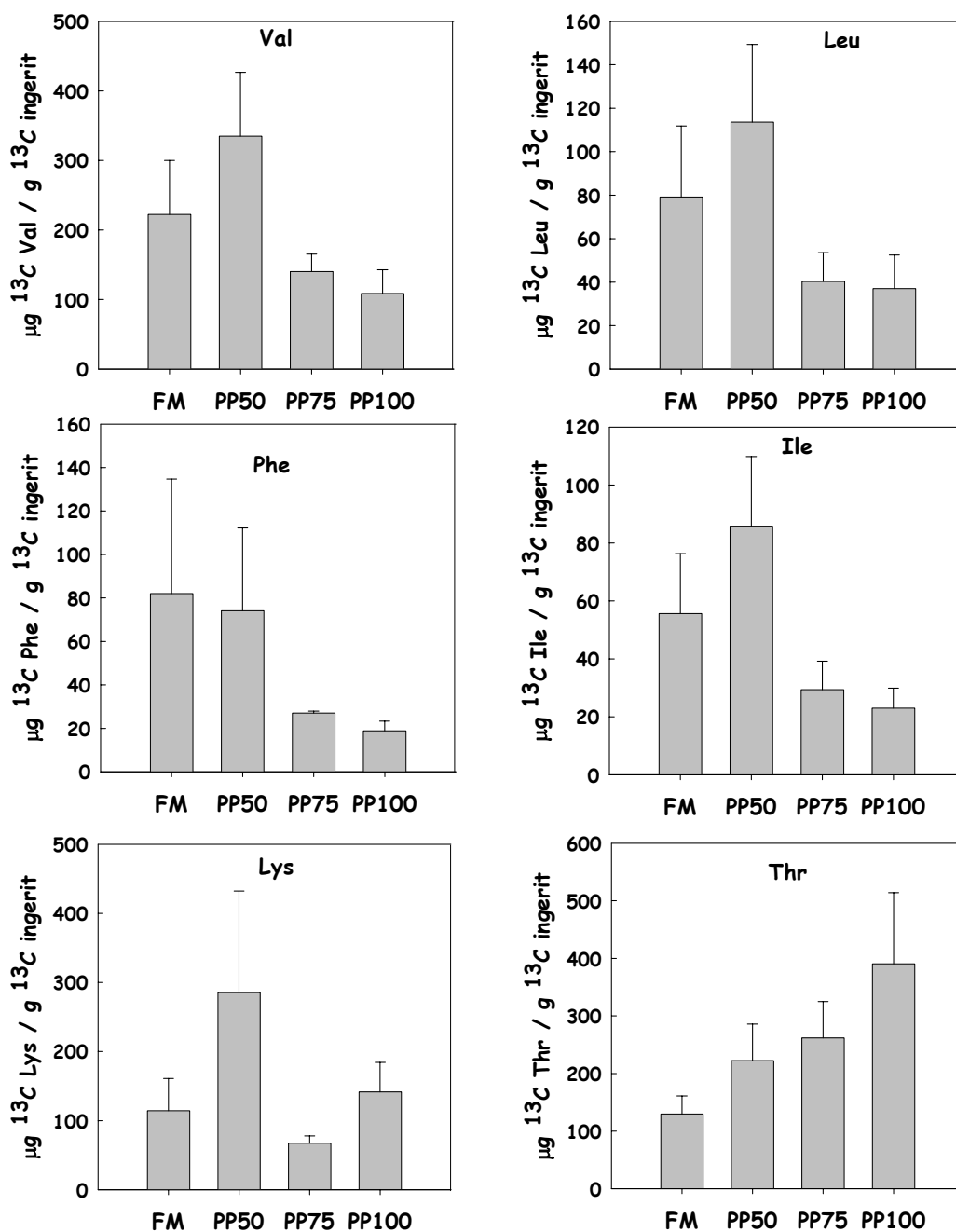


Figura 4.13: Enriquiment total dels AAE de múscul (24 h) en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$.

Respecte als AANE, el marcatge total de ^{13}C incrementava amb el percentatge de proteïna vegetal. Aquest increment va ser molt més acusat en el grup PP100, on el marcatge d'Ala va ser 4 vegades superior als valors de FM, més del doble en Ser i 6 vegades més en Pro, encara que en cap cas les diferències van ser significatives.

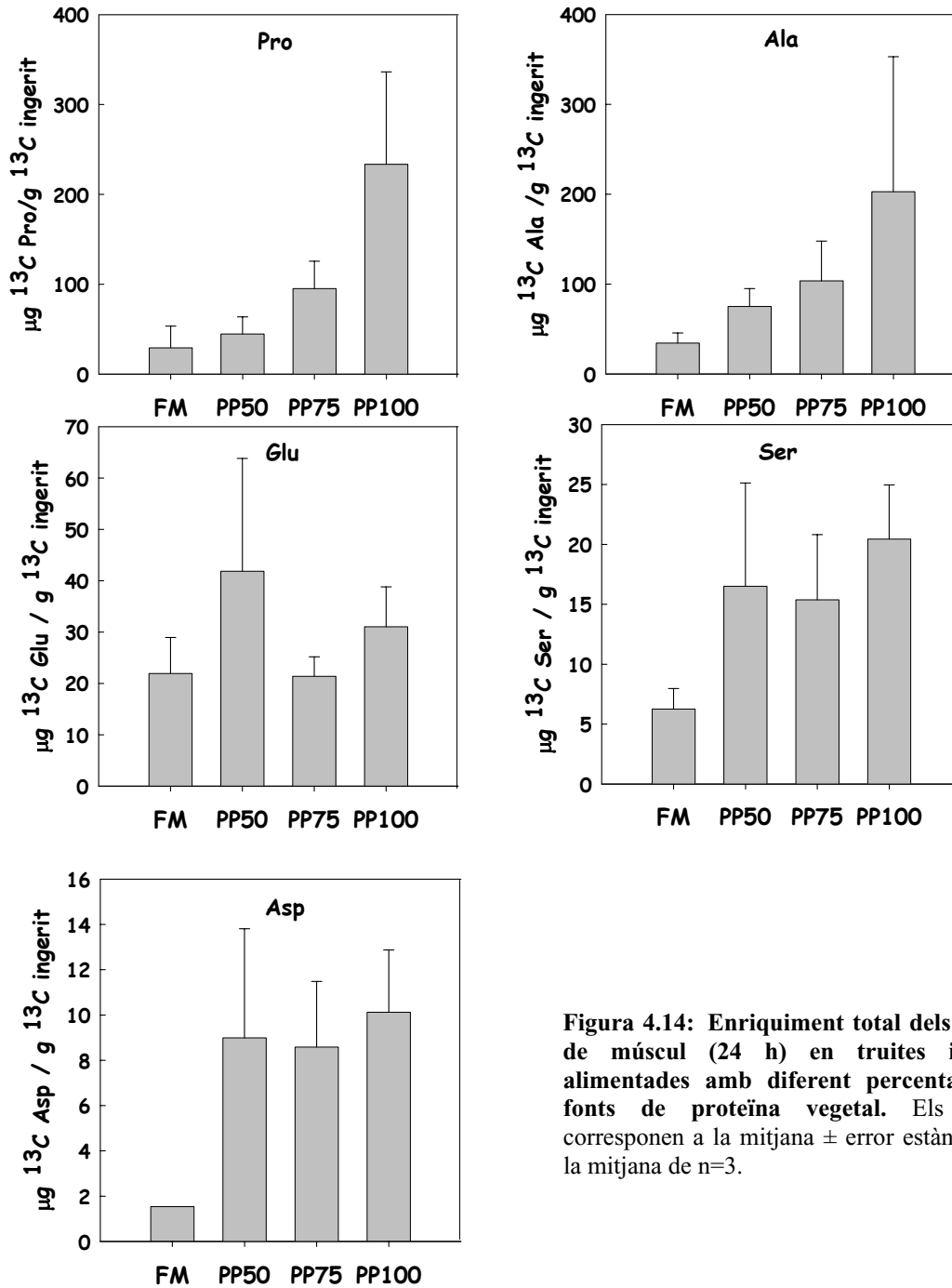
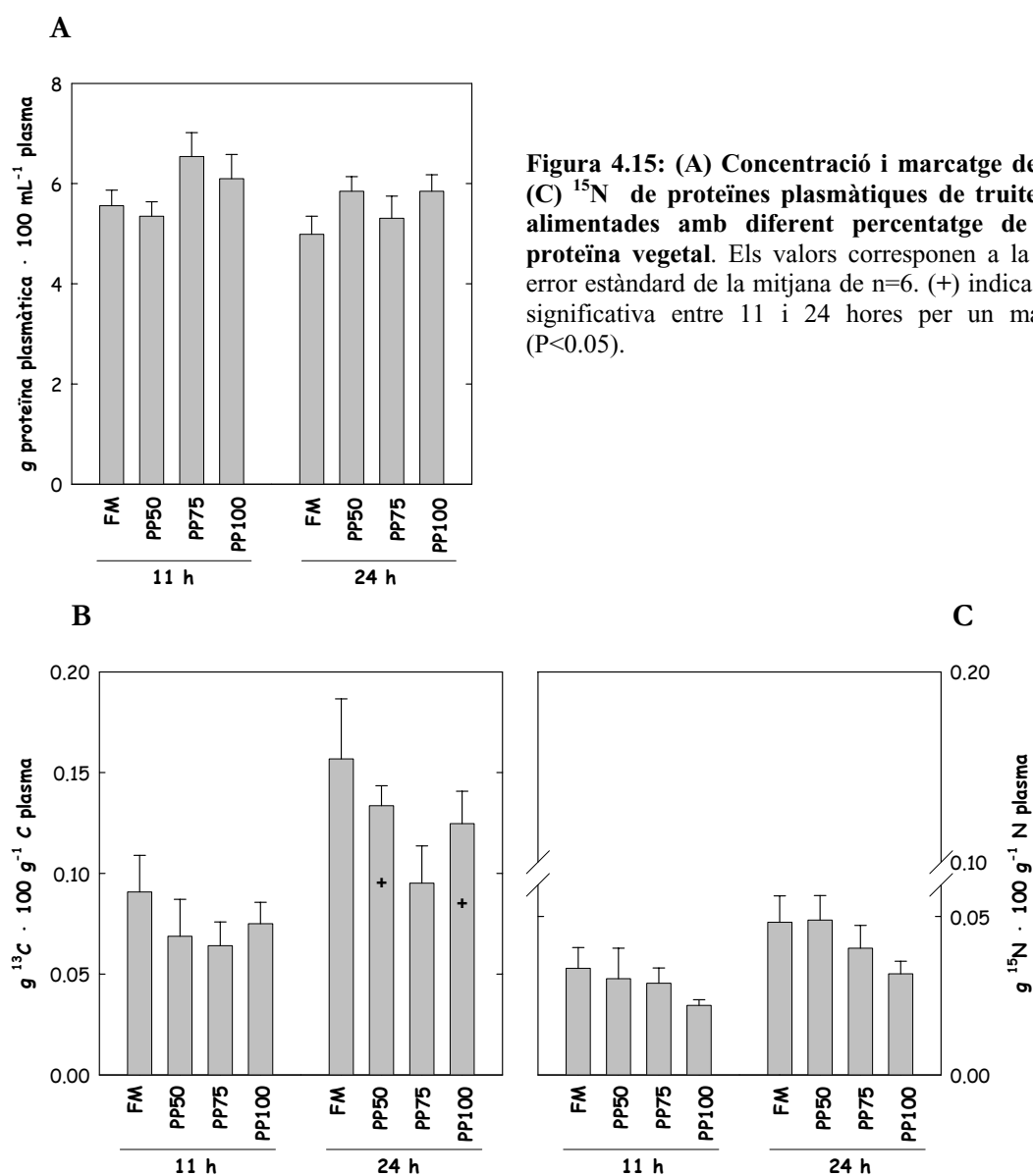


Figura 4.14: Enriquiment total dels AANE de múscul (24 h) en truites irisades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n=3.

6. Concentració i marcatge de ^{13}C i ^{15}N de les proteïnes plasmàtiques

La concentració de proteïnes plasmàtiques tant 11 com 24 hores després de la ingesta era molt similar en tots els grups (Figura 4.15 A). Tant l'enriquiment de ^{13}C (Figura 4.15 B) com de ^{15}N (Figura 4.15 C) va incrementar de 11 a 24 hores en tots els grups, de forma significativa l'enriquiment de ^{13}C dels grups PP50 i PP100. La relació d'enriquiment de $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ de les proteïnes plasmàtiques era propera a 3/1, reflectint el marcatge administrat per la dieta.



Discussió

La incorporació total de ^{13}C procedent de la proteïna de la dieta en tots els teixits estudiats i la seva conversió a components principals –proteïna, lípid i glicogen-, així com la concentració i marcatge dels AA lliures estudiats, demostra que és possible substituir un 50% de la farina de peix sense alterar l'ús i destí de la proteïna de la dieta. Això es reflexa en el pes final dels animals PP50, equivalent al del grup FM. La taxa de creixement del grup PP50 és similar a la obtinguda per Gomes i col. (1995) en truites alimentades amb un 33% i un 66% de proteïna vegetal. En canvi, les truites alimentades amb les dietes PP75 i PP100 van créixer menys i més lentament. Juntament amb un menor creixement, els animals PP75 i PP100 van mostrar hiperfàgia durant els quatre mesos d'adaptació a les dietes. Aquest increment de la ingesta estaria relacionat amb un baix contingut energètic de la dieta, ja que els nivells d'ingesta estan molt relacionats amb l'energia aportada per la dieta (Page i Andrews, 1973; Peter, 1979; Kentouri i col., 1995). L'energia digerible aportada per la proteïna i els lípids era comparable en les quatre dietes. En canvi, la digestibilitat dels carbohidrats disminuïa a mesura que incrementava el percentatge de substitució (digestibilitat del midó: FM 99%, PP50 81%, PP75 75%, PP100 56%), i el percentatge d'energia digerible de la dieta PP100 era un 10% inferior a la de FM, fet que podria explicar en part el major consum d'aliment. Tanmateix, en comparació amb els estudis presentats en el bloc experimental I, en tots els grups es va observar un nivell de glicogen hepàtic més baix que en les truites RT, que podria estar relacionat amb un baix percentatge d'hidrats de carboni en les dietes del present treball.

Els nivells d'AA en plasma són bons indicadors de l'estat nutritiu de l'animal i permeten avaluar la qualitat de la dieta (Nose, 1972). En el grup PP100, en comparació amb els altres grups, es va observar una menor disponibilitat d'AA en el plasma, especialment d'AAE, fet que limitaria el creixement dels animals. No es pot descartar, però, que el nivell màxim d'AA en plasma en el grup PP100 sigui posterior a les 24 hores, ja que en truites alimentades amb fonts vegetals, com la soja o la malta, el pic màxim d'AA en plasma es veu endarrerit en comparació amb truites alimentades amb farina de peix, degut a una alteració en els processos digestius (Yamamoto, 1988). De

fet, el seguiment del ^{13}C i del ^{15}N a diferents moments postprandials demostra que l'arribada de la proteïna als teixits era més lenta en el grup PP100 en comparació a FM. Un alentiment dels processos digestius o una disminució de l'activitat dels enzims proteolítics provocada pels ingredients vegetals, com s'ha vist en truites alimentades amb soja (Dabrowsky i col., 1989; Rumsey i col., 1993), podria ser doncs la causa de la baixa concentració d'AA en el plasma del grup PP100.

El nivell de Lys de les proteïnes vegetals és deficient pel cultiu de teleostis, fet que repercuteix sobre el creixement (Murai, 1992). Per això diversos estudis recomanen el suplement de la dieta amb Lys quan la proteïna és d'origen vegetal (Davies i Morris, 1997; Rodehutschord i col., 2000). En el present treball, les dietes vegetals van ser suplementades amb quantitats creixents de Lys, en forma d'AA cristal·lí. De fet la Lys era l'AA que s'havia suplementat en major quantitat. La proporció de Lys cristal·lina respecte al total de Lys era d'un 36% en PP50, un 52% en PP75 i un 75% en PP100. Tot i el suplement de la dieta, la concentració de Lys en plasma disminuïa a mesura que incrementava el percentatge de proteïna vegetal. La Lys cristal·lina s'absorbeix més ràpidament que la Lys que forma part d'una proteïna (Berge i col., 1994). Per tant, el diferent ritme d'absorció de la Lys en funció de la forma en que sigui presentada pot haver modificat la disponibilitat d'aquesta, de forma més acusada en el grup PP100. Aquest fet limitaria la síntesi de proteïnes o faria incrementar la taxa de reciclatge proteic incidint de forma negativa sobre el creixement.

Els estudis ecofisiològics amb isòtops estables indiquen que el ^{15}N incrementa en els teixits quan es mobilitza proteïna o quan incrementa la taxa de recanvi proteic (revisat per Gannes i col., 1998). En el grup PP100, el marcatge de ^{13}C en proteïna muscular era major que en FM i el ^{15}N mostrava la mateixa tendència. Aquest major marcatge no és degut a una major arribada de marcador procedent de la dieta al teixit, ja que, com s'ha dit anteriorment, l'arribada dels dos marcadors al múscul era més lenta en PP100 que en FM. L'increment del marcatge de la proteïna muscular és indicador d'un major recanvi proteic. El major marcatge dels AANE del múscul del grup PP100, en comparació amb FM, també és un indicador d'una major taxa de reciclatge proteic ja que demostra que part de l'esquelet de carboni d'altres AA, incloent els AAE, hauria estat transferit a AANE. De fet, s'ha observat que la substitució de la farina de peix per soja en la truita irisada provoca una menor eficiència de retenció de les proteïnes sintetitzades (Martin i col., 2003) i en d'altres espècies, com el llobarro (Langar i col.

1993), l'anguila (De la Higuera i col., 1999) i la gambeta (*Litopenaeus vannamei*) (Mente i col., 2002), la substitució amb diferents ingredients vegetals provoca un increment de la taxa de recanvi proteic i de la taxa de degradació proteica, juntament amb una menor eficiència de retenció de les proteïnes sintetitzades. Un increment de la taxa de reciclatge proteic porta associat un increment del consum d'energia (Waterlow i Millward, 1989; Houlihan, 1991; Lyndon i col., 1992), que no és desitjable des del punt de vista de maximitzar el creixement.

En el múscul, la concentració i marcatge dels tres AA ramificats (Val, Leu, Ile) era més baixa en els grups PP75 i PP100 en comparació amb FM i PP50. En canvi, l'Ala incrementava. De forma preferent, el múscul blanc oxida els AA ramificats amb finalitat energètica (Jürss i Bastrop, 1995). En situació de demanda energètica, com el dejuni, s'ha descrit que els AA ramificats del múscul s'oxiden, transferint-se part de l'esquelet de carboni a Ala (Blasco i col., 1991). Aquesta Ala s'utilitza en el fetge com a font d'energia i de glucosa (Cowey i col., 1977 a; Walton i Cowey, 1979 a,b; Renaud i Moon, 1980; French i col., 1981). L'increment del marcatge d'Ala en el múscul de les truites PP75, i de forma molt més acusada en les PP100, pot estar, doncs, relacionat amb l'oxidació dels AA ramificats. L'Ala alliberada pel múscul seria oxidada o utilitzada com a substrat gluconeogènic pel fetge, d'aquí que no s'observi un increment de la seva concentració en plasma. L'increment significatiu del marcatge de ^{13}C en glicogen en el fetge dels animals PP100 posa de manifest l'activació de la gluconeogènesi en aquest grup, que permet mantenir el nivells de glucosa circulants. A diferència del grup PP100, en el grup PP75 no es va observar una activació de la gluconeogènesi, tot i que també incrementava la concentració i marcatge d'Ala en el múscul. En PP75, els nivells de glicogen eren més baixos que en FM i no es va poder mantenir el nivell de glucosa circulant 24 hores després de la ingesta. El nivell de proteïna digerible de la dieta PP75 era comparable a la de FM i PP50 i per tant la major oxidació d'AA estaria relacionada o bé amb un menor aport d'energia no proteica (Cowey i Walton, 1989), o bé amb un desequilibri postprandial provocat pel diferent ritme d'absorció dels AA cristal·lins en relació als proteics.

L'anàlisi del percentatge de lípids en diferents teixits revela que en els grups alimentats amb proteïna vegetal el percentatge de lípids de la carcassa era superior que en els animals alimentats amb FM. En canvi, el percentatge de lípids en el paquet

visceral i greix perivisceral era més baix en les truites alimentades amb PP75 i PP100 que en les alimentades amb FM i PP50. Aquesta reducció del contingut de lípid està en consonància amb la sobreexpressió del ARNm del receptor de la hormona de creixement (GHR) en el teixit perivisceral de les truites PP75 i PP100 trobada per Gómez-Requeni i col. (2005) i està relacionat amb l'activitat lipolítica de l'hormona del creixement (GH). D'acord amb aquests autors, el present treball indica que quan el percentatge de proteïna vegetal incrementa per sobre del 50% la lipolisi del greix perivisceral estaria incrementada afavorint la mobilització dels substrats energètics. En el grup PP50, el percentatge de lípids en fetge, 24 hores després de la ingesta, era superior al percentatge mostrat pel grup FM. Aquest increment va coincidir amb un increment de activitat lipogènica a partir d'AA en aquest grup de 11 a 24 hores postprandials, tal i com indica l'increment significatiu de ^{13}C en lípids. Per tant, la dieta PP50 estaria aportant l'energia necessària pel bon creixement dels animals, fins i tot permetent que part de la proteïna dieta fos canalitzada cap a la síntesi de lípids.

En conclusió, en comparació amb FM, la dieta PP50 no va modificar ni el creixement, ni la ingesta ni la utilització de la proteïna de la dieta. Un desequilibri d'AA, causat per un diferent ritme d'absorció de la Lys, per una alteració en el patró d'arribada dels AA als teixits, per una major oxidació dels AA amb finalitat energètica (PP75), per la canalització dels AA cap a gluconeogènesi (PP100), o per tots aquests factors en conjunt, pot ser la causa de l'ús poc eficient de la proteïna de les dietes PP75 i PP100. En el grup PP75 no es van desencadenar els mecanismes descrits en el grup PP100 (increment de la gluconeogènesi i de la taxa de recanvi proteic), encara que van créixer menys que els FM. Per tant, un 75 % de substitució de farina de peix per proteïna vegetal representa un punt d'inflexió en la utilització de la proteïna de la dieta. Un major percentatge d'hidrats de carboni en la dieta PP75 podria millorar el creixement.

BLOC EXPERIMENTAL III

Substitució de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal en l'orada. Ús de la proteïna de la dieta

Quatre grups d'orades van ser alimentades durant dotze setmanes amb dietes amb diferent percentatge de substitució de farina de peix (FM) per fonts de proteïna vegetal (PP) (Taula 2.8). Les dietes PP50, PP75 i PP100 contenien quantitats creixents (50%, 75% i 100% respectivament) de fonts vegetals i es van suplementar amb AA cristal·lins per reflectir la composició aminoacídica del múscul (Taula 2.10). En les quatre dietes la relació AAE/AANE era propera a 1.1, fruit de les conclusions extretes a partir del bloc experimental I. Totes les dietes eren isoenergètiques i isoproteiques (Taula 2.9) i cobrien els requeriments nutricionals establerts per l'orada pel National Research Council (1993).

Aquest treball mostra l'efecte de la substitució de la farina de peix sobre l'ús de la proteïna de la dieta i la composició corporal i glucèmia de les orades adaptades a les quatre dietes. Mitjançant els isòtops estables es mesura la incorporació de la proteïna de la dieta als teixits i els seus components principals (proteïna, lípid i glicogen), així com als AA lliures de plasma i múscul blanc. Tanmateix es determinen els nivells d'aquests AA.

Resultats

1. Creixement i composició corporal

Les orades van menjar menys i van créixer menys de forma progressiva a mesura que incrementava el contingut de proteïna vegetal en la dieta (Taula 5.1). En canvi, l'índex musculósomàtic (Taula 5.2) no va diferir significativament entre grups, tot i que el del grup PP100 tendia a ser inferior al dels altres grups.

A la Taula 5.2 es mostra la composició corporal de les orades després de quatre mesos d'adaptació a les dietes. A mesura que incrementava el percentatge de proteïna vegetal en la dieta es produïa una acumulació de lípids en el fetge, presentant el grup PP100 el doble de lípid ($P < 0.05$) que el grup FM. En canvi, el percentatge de lípids en el paquet visceral dels animals PP100 era significativament inferior que el dels animals FM.

El contingut de glicogen hepàtic, 24 hores després de la ingesta, no va diferir entre grups (11%) encara que a 11 hores el grup PP50 presentava un major contingut ($P < 0.05$) que el grup PP100. En el múscul, el contingut de glicogen del grup PP100 era inferior al present en FM i PP50, de forma significativa 24 hores després de la ingesta.

Taula 5.1: Taxes de creixement i ingesta d'orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Pes inicial (g)	16.4 0.07	16.7 0.11	16.5 0.19	16.4 0.24
Pes final (g)	73.8 0.86 a	69.7 0.52 b	66.5 0.50 c	58.2 0.71 d
Taxa de creixement específic (%)	1.85 0.01 a	1.76 0.01 b	1.72 0.01 b	1.56 0.02 c
Ingesta (g MS/kg PCP/dia)	17.5 0.2 a	15.1 0.2 b	14.2 0.1 c	13.9 0.2 c

Valors proporcionats per l'Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal (IATS). Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre dietes (prova Student Newman-Keuls; $P < 0.05$)

Taxa de creixement específic = $[100 * [\ln(\text{pes corporal final}) - \ln(\text{pes corporal inicial})]] / \text{dies}$

MS: matèria seca. PCP: pes corporal promig

Taula 5.2: Composició corporal d'orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM	PP50	PP75	PP100
Fetge (11 h)				
IHS ¹	1.02 0.07	1.03 0.06	1.12 0.03	1.20 0.05
Lípid	5.82 0.26 a	7.57 0.88 ab	10.70 0.59 b	11.98 1.54 b
Glicogen	8.27 0.31 ab	9.78 0.27 a	8.77 0.47 ab	7.63 0.36 b
Proteïna	12.03 0.44	12.24 0.33	12.62 0.77	12.22 0.67
Fetge (24 h)				
IHS ¹	1.20 0.06	1.09 0.04	1.07 0.04	1.19 0.04
Lípid	5.37 0.36 a	7.73 0.47 b	10.37 0.87 b	12.29 1.41 c
Glicogen	11.28 0.46	10.73 0.33	10.53 0.78	10.93 0.57
Proteïna	13.23 0.65	11.35 0.65	11.03 0.30	11.67 0.81
Múscul (11 h)				
Lípid	2.54 0.17	2.98 0.23	2.70 0.17	2.75 0.26
Glicogen	0.52 0.06	0.41 0.06	0.45 0.05	0.34 0.03
Proteïna	19.96 0.29	19.74 0.32	20.14 0.39	18.85 0.58
Múscul (24 h)				
IMS ²	44.62 2.30	44.14 1.46	43.60 1.26	40.85 0.77
Lípid	1.99 0.30	2.24 0.20	2.17 0.17	2.29 0.09
Glicogen	0.46 0.08 ab	0.52 0.09 a	0.40 0.02 bc	0.35 0.07 c
Proteïna	19.73 0.36	19.31 0.27	19.64 0.31	19.57 0.53
Paquet visceral + greix peri-visceral (24 h)				
IVS ³	4.92 0.29	4.73 0.21	4.77 0.12	4.26 0.26
Lípid	41.90 1.92 a	33.40 1.54 ab	41.00 2.28 a	28.8 1.12 b
Proteïna	5.55 1.28	5.64 0.47	4.85 0.75	5.59 0.72
Carcassa (24 h)				
Lípid	10.34 0.31	10.96 0.39	10.51 0.40	11.69 0.47
Proteïna	16.62 0.21	16.44 0.39	16.56 0.39	17.46 0.41

Es presenten els resultats dels animals mostrejats 11 i 24 hores després de la ingesta.

¹IHS = g fetge · 100 g⁻¹ pes corporal

²IMS = g múscul · 100 g⁻¹ pes corporal

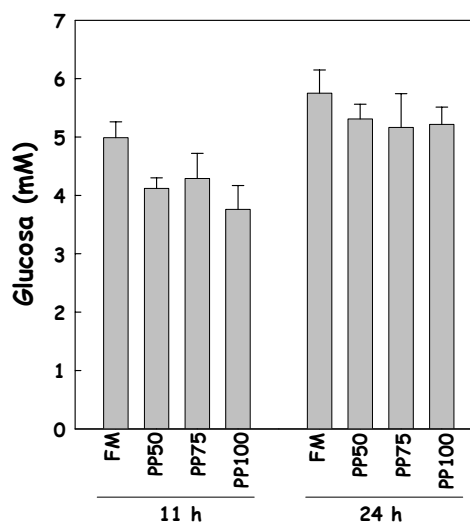
³IVS = g vísceres · 100 g⁻¹ pes corporal

Els valors s'expressen en percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de n=7 (6 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups (P<0.05).

2. *Glucèmia*

Els nivells de glucosa plasmàtica no es van veure afectats per l'origen de la proteïna de la dieta.

Figura 5.1: Nivells de glucosa plasmàtica 11 i 24 hores després de la ingesta en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors es presenten en mmols glucosa/L de plasma i corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n=6.



3. *Destí de la proteïna de la dieta en teixits i components principals*

3.1. *Fetge*

La recuperació total de ^{13}C en fetge 24 hores després de la ingesta va ser menor ($P < 0.05$) en els grups PP75 i PP100 en relació a FM (Figura 5.2 A). La mateixa tendència s'observa amb el ^{15}N (Figura 5.2 B), encara que el grup PP100 no diferia significativament de FM i PP50, i era el grup PP75 el que mostrava una menor recuperació de marcador. A 11 hores postingesta ni la recuperació de ^{13}C ni la de ^{15}N diferien entre grups, no trobant-se cap perfil relacionat amb el percentatge de proteïna vegetal en la dieta.

La síntesi de glicogen a partir de proteïna, gluconeogènesi i posterior gliconeogènesi, observada 24 hores després de la ingesta, era menor en els grups PP75 i PP100 que en FM i PP50, encara que no de forma significativa. Independentment de la dieta consumida, la capacitat gliconeogènica d'aquesta espècie era molt elevada, com indica el fet que a 11 hores postingesta entre el 40% i el 50% del total del marcatge en fetge es trobés en glicogen, incrementant aquests valors al 60-70% a les 24 hores.

Anteriorment s'ha destacat l'acumulació de lípids en fetge a mesura que incrementava el percentatge de reemplaçament de la farina de peix. Aquesta acumulació de lípids no provenia, però, de la síntesi a partir de proteïna, donat que la recuperació de ^{13}C en aquesta fracció no va diferir entre grups, situant-se en tots els casos entre un 6 i un 10% del total del marcatge del fetge.

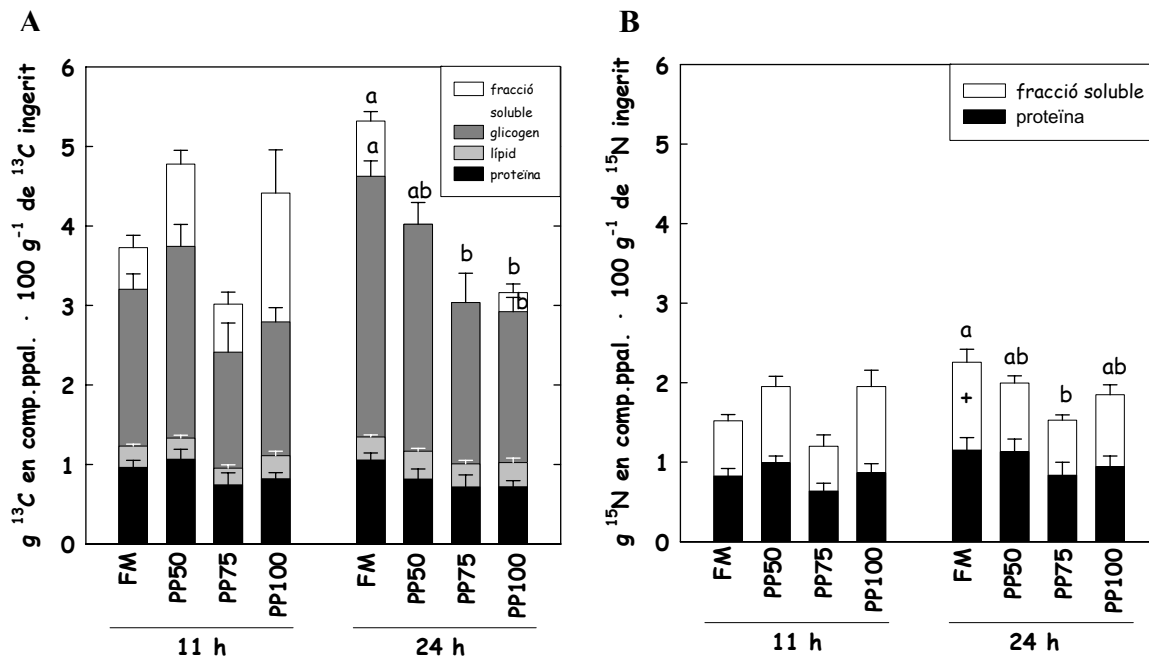


Figura 5.2: Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble de fetsge i (B) ^{15}N en proteïna i fracció soluble de fetsge, 11 i 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$). (+) indica diferència significativa entre 11 i 24 hores per un mateix grup ($P<0.05$). Lletra o símbol a l'interior d'una barra indica diferència significativa en un compartiment específic. Lletra a la part superior de la barra indica diferència significativa en la recuperació total del marcatge.

3.2. Múscul Blanc

La recuperació total de ^{13}C en el múscul, a 24 hores postingesta (Figura 5.3 A), va ser significativament menor en els grups PP75 i PP100 que en FM i PP50. En relació al ^{15}N (Figura 5.3 B), i coincidint amb els resultats observats en fetsge, la recuperació total de marcatge en el grup PP100 era inferior a la de FM i PP50 però no de forma significativa, i era en el grup PP75 on es recuperava menys marcatge ($P<0.05$). La recuperació de ^{13}C en lípids va ser menor ($P<0.05$) en els grups PP75 i PP100 en relació a FM i PP50, representant aquesta fracció com a promig un 2% del marcatge recuperat en múscul. La síntesi de glicogen a partir de proteïna en múscul representava en promig un 0.6% del marcatge recuperat i no va diferir entre grups.

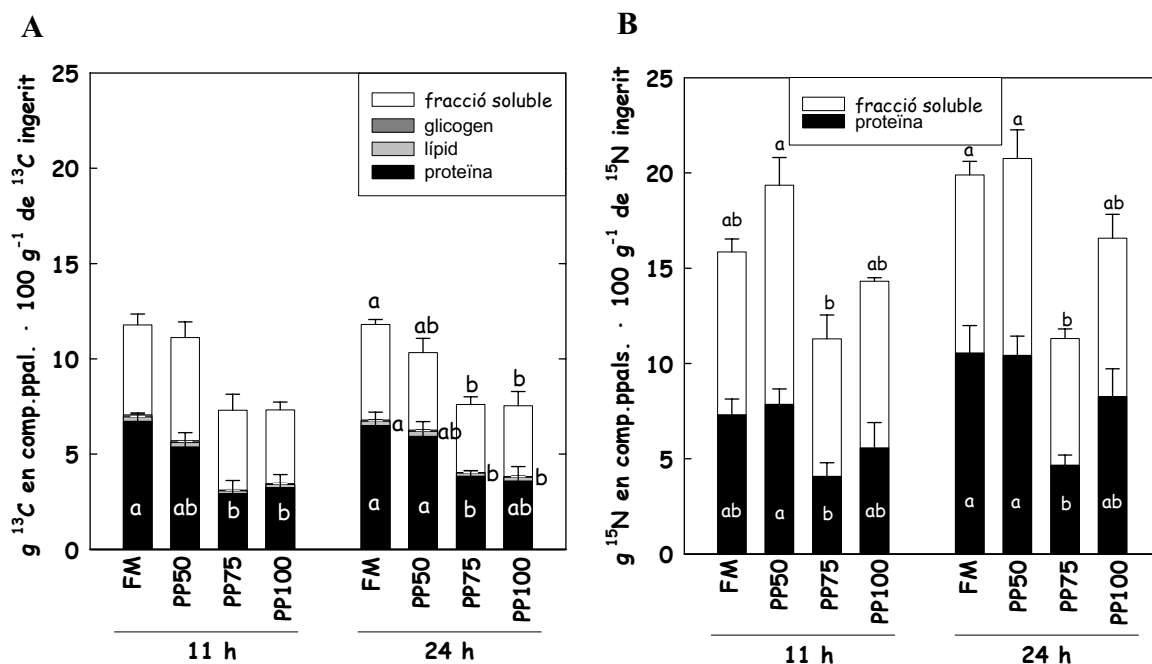


Figura 5.3 : Recuperació de (A) ¹³C en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble de múscul blanc i (B) ¹⁵N en proteïna i fracció soluble de múscul blanc, 11 i 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana de n=6. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups (P<0.05). Lletra a l'interior o a la dreta d'una barra indica diferència significativa en un compartiment específic. Lletra a la part superior de la barra indica diferència significativa en la recuperació total del marcador.

3.3. Paquet visceral + greix perivisceral

La incorporació total d'ambdós marcadors a nivell visceral no va diferir significativament per efecte de la font proteica, tot i que s'observa una tendència a una menor recuperació total en els grups PP75 i PP100 (Figura 5.4).

Entre un 51 i un 67% del marcatge de ¹³C recuperat en PV+G es trobava en forma de lípids. La síntesi de lípids a partir de proteïna va ser major (P<0.05) en el grup PP100 respecte a PP75.

3.4. Carcassa

Donat que una gran part de la carcassa està constituïda per múscul blanc, el perfil mostrat pels dos isòtops en aquest compartiment és molt similar al mostrat pel múscul.

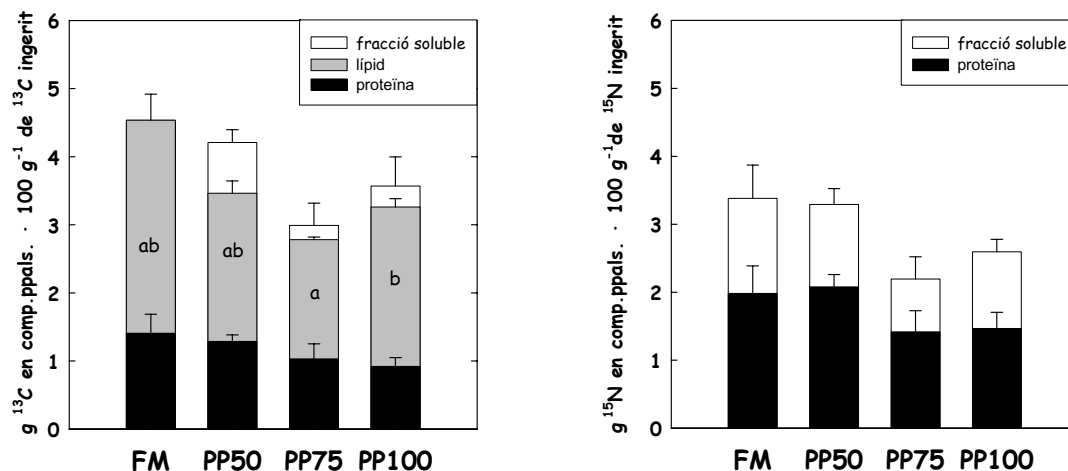


Figura 5.4: Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid i fracció soluble del paquet visceral + greix perivisceral i (B) ^{15}N en proteïna i fracció soluble del paquet visceral + greix perivisceral, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P < 0.05$).

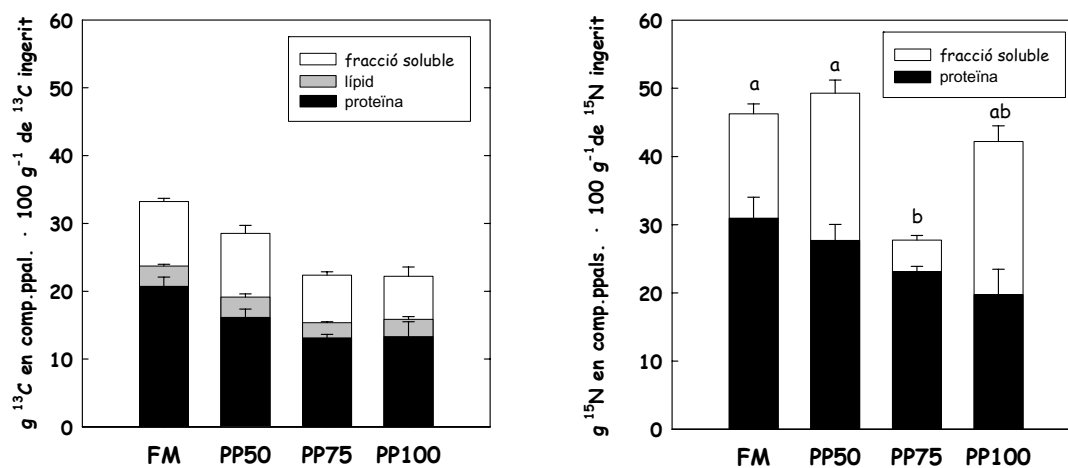


Figura 5.5: Recuperació de (A) ^{13}C en proteïna, lípid i fracció soluble i (B) de ^{15}N en proteïna i fracció soluble de la carcassa, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=6$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P < 0.05$).

3.5. Recuperació total de ^{13}C i ^{15}N en teixits

Com s'ha anat mostrant individualment en cadascun dels teixits i com a resultat d'una sola ingesta (24 hores), la recuperació total en el cos de ^{13}C -proteic va ser menor en els grups PP75 i PP100 en relació a FM i PP50 (Figura 5.6). Tanmateix, com ja s'havia descrit, la recuperació total de ^{15}N va ser menor en el grup PP75 en relació als altres grups.

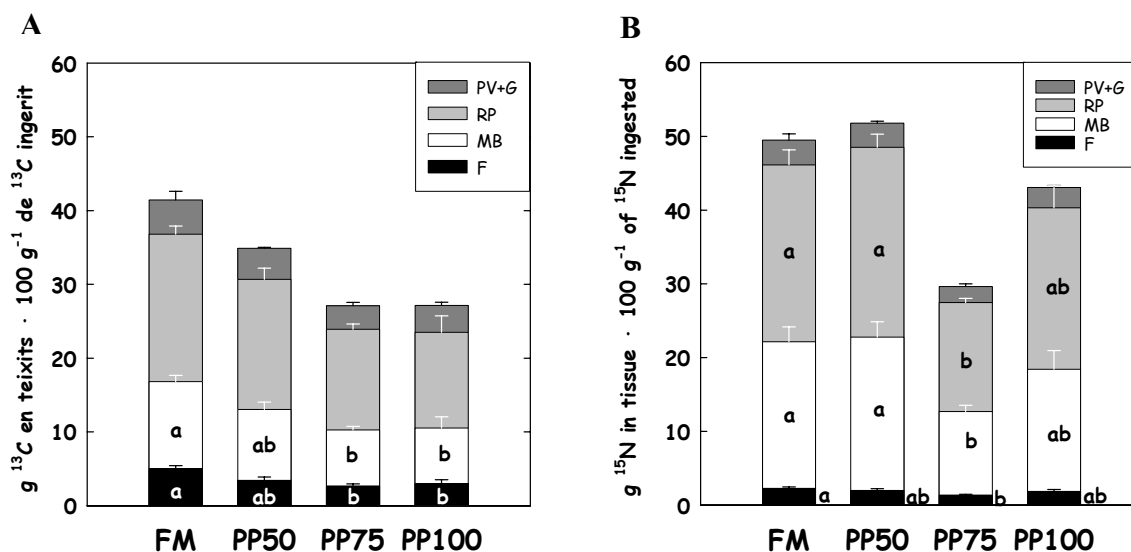


Figura 5.6: Recuperaçió de (A) ^{13}C en teixits i (B) ^{15}N en teixits, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n=6. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups (P<0.05).

4. Concentració i marcatge de ^{13}C dels AA lliures del plasma

Els nivells d'AA lliures essencials i totals, 11 hores després de la ingesta (Taula 5.3), eren inferiors (P<0.05) en les orades alimentades amb les dietes vegetals que en les orades alimentades amb FM, de forma més acusada en els grups PP75 i PP100 que en PP50. El nivell d'AANE no va diferir significativament entre grups, encara que la concentració d'Ala, Gly i Ser era inferior en els animals alimentats amb PP75 respecte a FM.

Taula 5.3: Concentració ($\mu\text{mols/L}$ plasma) dels AA lliures de plasma, 11 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM		PP50		PP75		PP100	
HISTIDINA	33.7	8.2	22.2	4.9	26.2	20.0	34.6	9.1
ISOLEUCINA	218.0	9.8 a	135.4	11.2 b	87.9	18.9 b	88.7	13.4 b
LEUCINA	305.6	22.7 ab	331.0	31.5 a	251.3	41.0 ab	191.4	19.9 b
LISINA	281.4	44.6 a	106.7	21.6 ab	68.8	27.7 b	86.4	14.5 ab
METIONINA	165.3	19.1 a	114.3	10.2 a	52.5	6.5 b	32.1	4.0 b
FENILALANINA	187.6	16.8	209.9	32.6	113.5	20.4	119.1	27.2
TIROSINA	79.0	11.4	97.7	21.1	53.3	8.6	92.5	20.2
TREONINA	304.0	22.9 a	188.5	7.7 b	101.3	15.6 b	136.4	20.5 b
VALINA	427.4	9.1 a	284.4	9.1 b	277.9	18.6 bc	212.2	18.7 c
Alanina	1033.2	115.1 a	728.1	57.9 ab	518.7	75.2 b	578.0	92.4 b
Àcid Aspàrtic	17.4	4.0	19.1	2.0	10.8	4.3	17.7	4.8
Àcid Glutàmic	96.4	12.1	122.9	41.4	56.3	17.1	93.9	21.2
Glicina	736.1	58.8 a	609.9	73.0 ab	408.0	30.3 b	621.0	68.7 ab
Prolina	103.4	15.8	104.4	9.7	106.5	25.7	158.4	3.3
Serina	115.5	6.1 a	92.8	10.5 a	47.0	8.5 b	88.5	12.5 a
AA totals	4104.1	129.0 a	3167.5	123.8 b	2465.0	18.8 b	2550.0	260.9 b
AAE	2002.1	85.3 a	1490.2	49.9 b	1184.0	62.7 bc	988.1	77.7 c
AANE	2102.0	142.7	1677.4	167.8	1281.0	81.5	1562.0	196.5
AAE/AANE	1.0	0.1	0.9	0.1	0.9	0.1	0.6	0.1

Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de $n=4$ (3 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

Després d'un període postprandial de 24 hores (Taula 5.4), no es van observar diferències significatives entre grups a nivell d'AA individuals. Ara bé, la suma de tots els AA indica que el nivell total d'AA lliures, essencials i no essencials, era més elevat en els grups alimentats amb proteïna vegetal. Lamentablement només es disposava d'una mostra del grup PP100, però la tendència sembla ser la mateixa que en el grup PP75.

L'enriquiment dels AA expressat com a percentatge d'àtoms de ^{13}C respecte al total de C (APE) permet estudiar l'ús dels AA que procedeixen d'una sola ingesta. Onze hores després de la ingesta (Figura 5.7), el marcatge dels AAE, era molt similar entre FM i PP50 i disminuïa en els grups PP75 i PP100, indicant que la disponibilitat dels AA

Taula 5.4: Concentració ($\mu\text{mols/L}$ plasma) dels AA lliures de plasma, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM		PP50		PP75		PP100
HISTIDINA	9.5		n.d		11.0		n.d
ISOLEUCINA	63.0	16.6	80.0	17.5	91.8	14.4	169.0
LEUCINA	96.3	24.4	133.0	34.5	180.5	23.7	267.5
LISINA	72.9	13.5	74.1	26.6	80.2	14.1	41.0
METIONINA	27.4	2.8	21.7	8.1	47.0	9.8	46.0
FENILALANINA	41.5	6.1	60.3	24.3	79.8	14.3	138.0
TIROSINA	15.7	3.0	31.5	12.3	48.6	8.4	87.5
TREONINA	93.6	23.6	120.0	30.5	173.8	41.5	184.0
VALINA	141.0	27.0	186.3	22.4	214.5	26.3	321.6
Alanina	457.6	125.9	673.8	150.3	579.2	121.3	486.0
Àcid Aspàrtic	15.1	0.5	19.5	1.0	21.8	4.0	34.5
Àcid Glutàmic	86.7	14.9	87.4	31.2	67.4	8.9	177.0
Glicina	445.5	60.4	760.6	148.6	864.4	120.8	677.5
Prolina	45.8	13.5	66.1	9.7	82.9	5.6	210.0
Serina	47.1	10.5	72.5	18.9	82.6	17.3	113.5
AA totals	1652.5	197.5 a	3055.8	429.0 b	3123.4	180.4 b	2953.1
AAE	554.6	52.9 a	923.5	156.0 ab	1060.6	101.1 b	1254.6
AANE	1097.9	149.5 a	2132.2	308.7 b	2062.8	98.3 b	1698.5
AAE/AANE	0.5	0.04	0.4	0.05	0.5	0.04	0.7

Els valors corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de $n=4$ (3 experimentals + 1 control) excepte per His i pel grup PP100 on només es disposa d'un valor. El grup PP100 no ha estat considerat en l'estadística. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

procedents de la dieta era menor quan la substitució de la farina de peix incrementava per sobre del 50%, però de forma significativa en el grup PP100. Vint-i-quatre hores després de la ingesta el marcatge dels AAE no diferia entre grups (Figura 5.8) i havia disminuït respecte a les 11 hores.

En relació als AANE, 11 hores després de la ingesta (Figura 5.9), el marcatge de la major part d'ells era menor en els grups PP75 i PP100 en comparació amb FM i PP50, mentre a 24 hores el marcatge era similar entre els quatre grups (Figura 5.10)

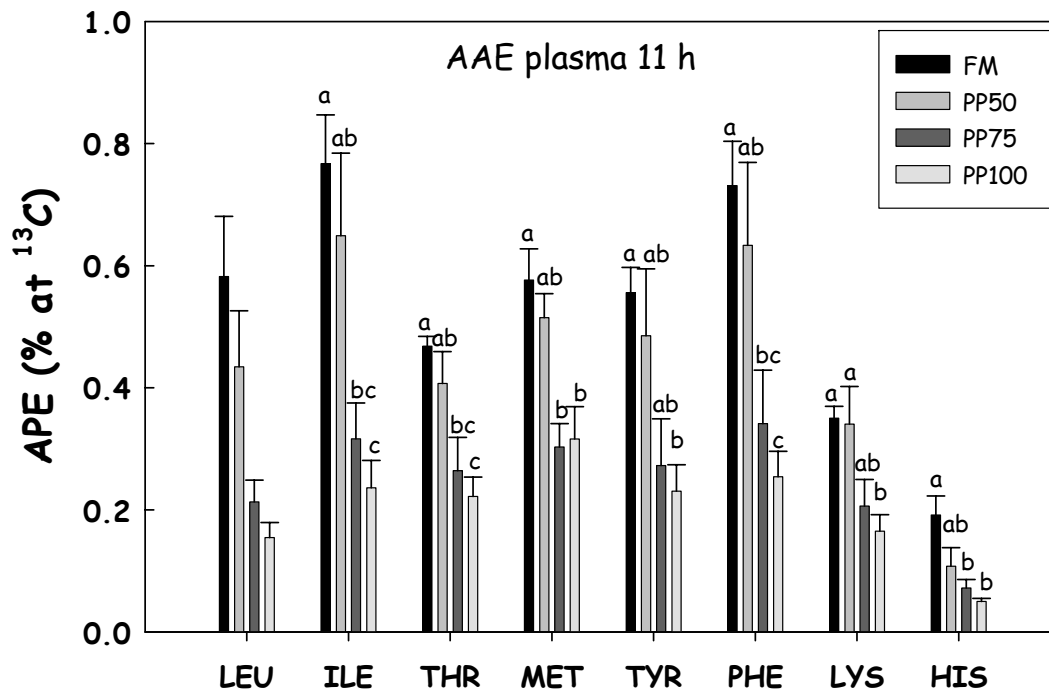


Figura 5.7: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE plasmàtics, 11 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

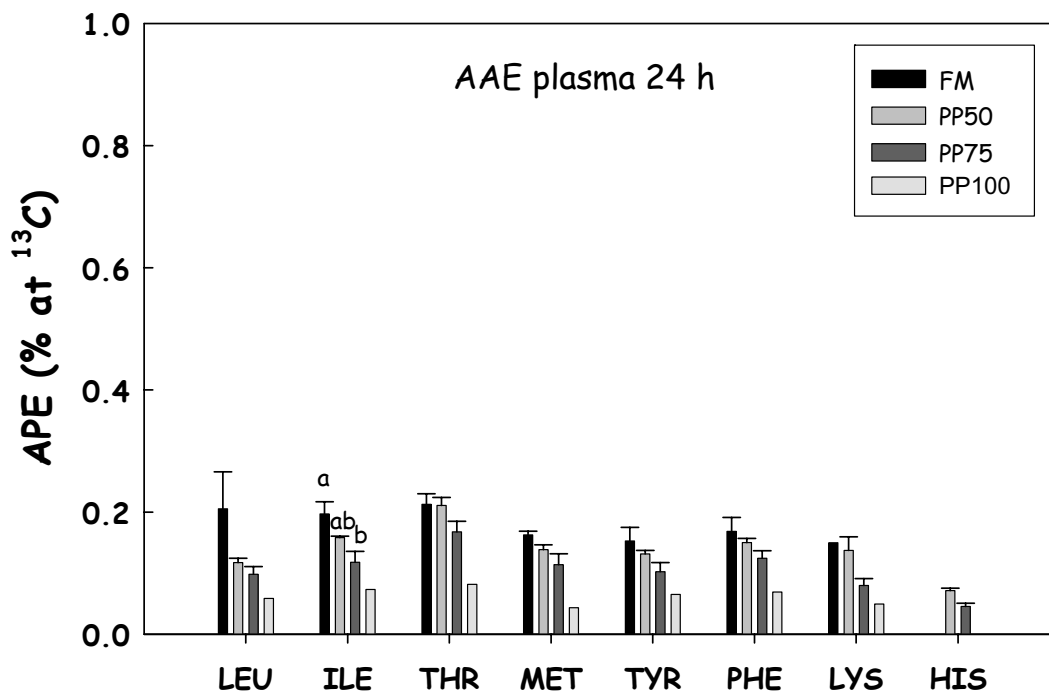


Figura 5.8: Enriquitament (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE plasmàtics, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$ excepte pel grup PP100 on només es disposa d'un valor. Aquest grup no s'ha considerat per realitzar l'estadística. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

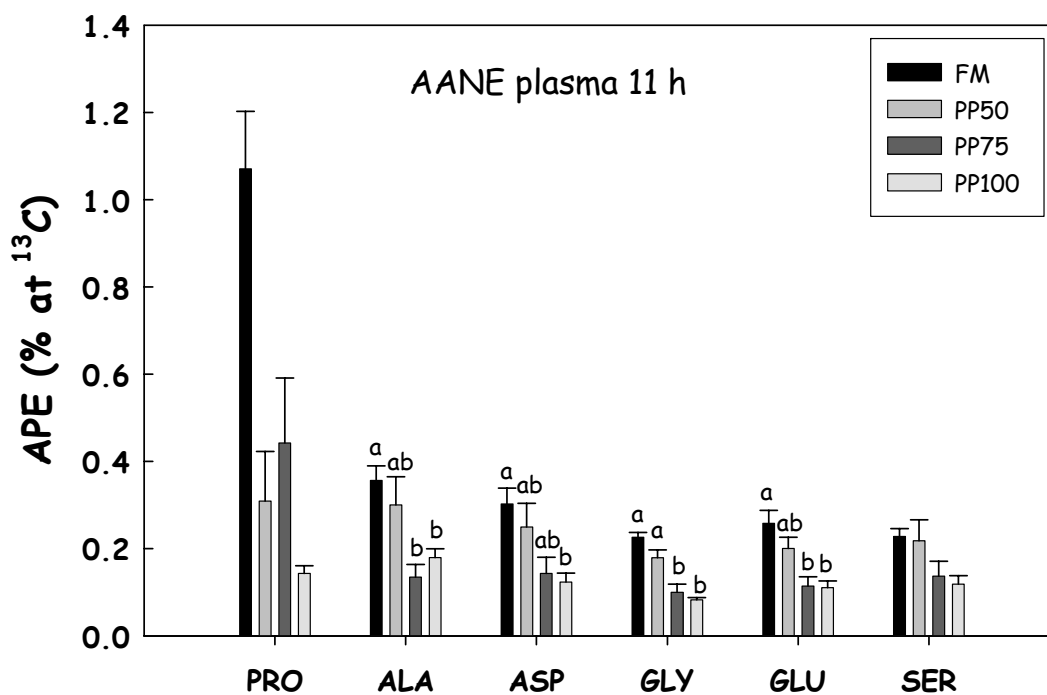


Figura 5.9: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AANE plasmàtics, 11 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

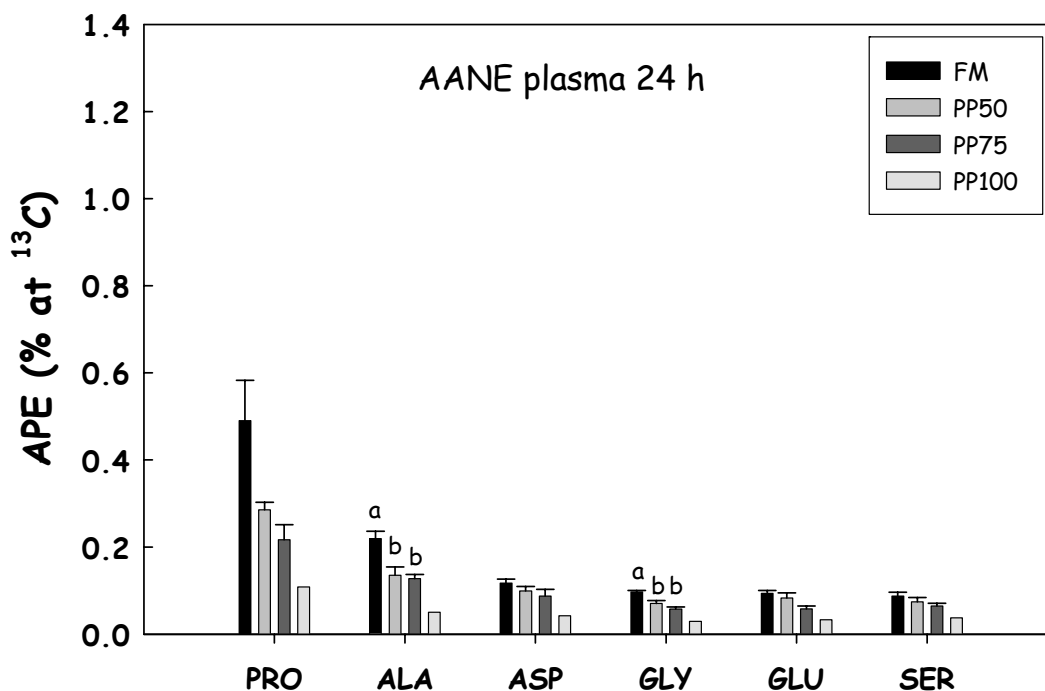


Figura 5.10: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AANE plasmàtics, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

5. Concentració i marcatge de ^{13}C dels AA lliures del múscul blanc

Onze hores després de la ingesta el nivell d'AA lliures en el múscul blanc (Taula 5.5) era major ($P < 0.05$) en els animals alimentats amb proteïna vegetal que en els alimentats amb FM, principalment degut a un increment dels AANE i especialment de la Gly, la qual representava un 88% del total dels AANE en el grup FM i un 95% en els altres grups. La His era l'AAE més abundant i representava en el grup FM un 44% del total de la fracció d'AA lliures essencials i en els grups PP75 i PP100 representava un 70% d'aquesta. Descomptant la His, la fracció d'AAE era major en PP75 que en la resta de grups.

Taula 5.5: Concentració ($\mu\text{mols/g}$ múscul) dels AA lliures de múscul, 11 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM			PP50			PP75			PP100		
HISTIDINA	1.19	0.35	a	2.42	0.51	a	6.75	1.02	b	6.81	0.81	b
ISOLEUCINA	0.02	0.00		0.03	0.00		0.04	0.00		0.04	0.01	
LEUCINA	0.04	0.00		0.08	0.00		0.11	0.01		0.11	0.03	
LISINA	0.54	0.08		0.40	0.02		0.45	0.03		0.28	0.09	
METIONINA	0.06	0.01		0.06	0.01		0.07	0.01		0.06	0.02	
FENILALANINA	0.03	0.01		0.05	0.01		0.07	0.02		0.05	0.01	
TREONINA	0.38	0.03	a	0.81	0.08	a	1.82	0.30	b	1.14	0.17	ab
VALINA	0.45	0.06		0.53	0.12		0.71	0.15		0.81	0.20	
Alanina	0.30	0.01	a	0.75	0.19	b	1.52	0.33	c	1.44	0.16	d
Àcid Aspàrtic	0.04	0.01	a	0.10	0.01	a	0.25	0.05	b	0.17	0.04	ab
Àcid Glutàmic	0.09	0.01	a	0.25	0.03	ab	0.41	0.02	b	0.42	0.08	b
Glicina	26.74	2.59	a	45.54	2.63	b	66.24	3.62	c	54.46	8.44	bc
Prolina	0.12	0.02	a	0.50	0.13	a	1.57	0.03	b	1.21	0.38	ab
Serina	0.20	0.00	a	0.46	0.08	a	0.74	0.16	b	0.64	0.10	ab
AA totals	30.2	2.9	a	52.0	3.0	b	79.8	4.7	c	65.9	7.3	bc
AAE	2.7	0.4	a	4.4	0.6	a	10.1	1.2	b	9.3	0.9	b
AANE	27.5	2.6	a	47.6	2.5	b	69.7	4.3	b	57.6	9.0	b
Total - (His+Gly)	2.27	0.15	a	4.04	0.02	b	6.76	0.60	b	4.83	0.77	ab
AAE (-His)	1.53	0.12	a	1.97	0.18	a	3.30	0.32	b	1.70	0.2	a
AANE (-Gly)	0.73	0.03	a	2.07	0.17	b	3.47	0.88	ab	3.15	0.55	ab
AAE/AANE - (His+Gly)	2.02	0.13		0.98	0.16		1.24	0.56		0.55	0.02	

Els valors s'expressen en percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de $n=4$ (3 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P < 0.05$).

En situació basal, 24 hores després de la ingesta, la concentració d'AA lliures de múscul era major en els grups alimentats amb proteïna vegetal que en el grup FM (Taula 5.6). El nivell d'His i Gly incrementava a mesura que incrementava la substitució. Descomptant la Gly i His, en el grup PP100 el nivell d'AAE i AANE era major ($P<0.05$) que en FM, però la relació EAA/NEAA era menor ($P<0.05$) respecte a FM.

Taula 5.6: Concentració ($\mu\text{mols/g}$ múscul) dels AA lliures de múscul, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal

	FM			PP50			PP75			PP100		
HISTIDINA	4.82	0.47	a	8.29	0.69	b	8.68	0.86	ab	18.27	2.83	ab
ISOLEUCINA	0.03	0.02		0.04	0.02		0.12	0.06		0.04	0.01	
LEUCINA	0.03	0.01	a	0.04	0.01	a	0.05	0.00	ab	0.07	0.01	b
LISINA	0.65	0.03		1.01	0.31		0.45	0.12		0.61	0.12	
METIONINA	0.01	0.01		0.02	0.01		0.02	0.00		0.02	0.01	
FENILALANINA	0.01	0.01	a	0.02	0.00	ab	0.02	0.00	ab	0.04	0.01	b
TREONINA	0.42	0.02	a	1.09	0.15	ab	1.39	0.15	b	2.14	0.29	b
VALINA	0.74	0.08		1.03	0.18		0.91	0.15		1.12	0.12	
Alanina	0.43	0.09	a	0.98	0.22	ab	0.83	0.09	a	1.54	0.11	b
Àcid Aspàrtic	0.05	0.01	a	0.17	0.02	b	0.20	0.02	b	0.37	0.04	c
Àcid Glutàmic	0.32	0.05	a	0.50	0.06	ab	0.41	0.02	a	0.71	0.06	b
Glicina	11.79	2.67	a	27.85	2.77	b	35.91	4.08	b	67.40	15.13	ab
Prolina	0.04	0.01	a	0.31	0.05	a	0.45	0.08	a	2.81	0.35	b
Serina	0.12	0.02	a	0.51	0.09	b	0.49	0.05	b	0.76	0.11	b
AA totals	19.29	2.76	a	41.84	3.45	b	49.61	4.77	b	95.05	18.56	ab
AAE	6.54	0.41	a	11.52	1.02	b	11.64	0.71	b	22.03	3.36	c
AANE	12.76	2.64	a	30.32	2.95	b	37.97	4.06	b	73.00	15.24	ab
Total - (His+Gly)	2.69	0.22	a	5.71	0.64	ab	5.02	0.18	b	9.39	0.74	c
AEE (-His)	1.72	0.09	a	3.23	0.35	ab	2.96	0.36	ab	3.76	0.64	b
AANE (-Gly)	0.97	0.15	a	2.47	0.32	b	2.06	0.20	ab	5.61	0.37	c
AAE/AANE - (His+Gly)	1.86	0.21	a	1.33	0.09	a	1.53	0.32	ab	0.68	0.13	b

Els valors s'expressen en percentatge de matèria fresca i corresponen a la mitjana i error estàndard de la mitjana de $n=4$ (3 experimentals + 1 control). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

Onze hores després de la ingesta, el marcatge dels AAE (expressat com a àtoms ^{13}C en l'AA/100 àtoms C de l'AA o APE) era inferior en el grup PP100 en comparació amb els altres grups (Figura 5.11). En canvi, 24 hores després (Figura 5.12), de la ingesta el marcatge dels AAE no diferia entre grups i era en tots els casos menor que a 11 hores, com a conseqüència de la utilització que fa el múscul dels AAE que provenen de la dieta.

Respecte als AANE, 11 hores després de la ingesta (Figura 5.13), el marcatge de Pro, Asp, Gly i Glu era inferior ($P < 0.05$) en el grup PP100 en comparació amb els altres tres grups. En canvi, 24 hores després de la ingesta (Figura 5.14), el marcatge d'Ala i Ser era significativament superior en PP100 que en FM.

A fi i efecte de quantificar la incorporació neta del carboni proteic de la dieta en els AA lliures del múscul es va calcular els μg de ^{13}C presents en cada AA per cada g de ^{13}C ingerit, corregint així la dilució que pugui haver patit el marcador com a efecte de la diferent concentració dels AA entre grups. Expressant els resultats d'aquesta manera, s'observa que l'enriquiment dels AAE (Figura 5.15) del grup FM és molt estable entre 11 i 24 hores. En tots els grups, encara que de forma quantitativament més important en els grups PP75 i PP100, el marcatge de Val i Leu disminuïa entre 11 i 24 hores. En canvi, el marcatge de la Lys i la Thr es preservava o incrementava de 11 a 24 hores. En relació als AANE (Figura 5.16), la incorporació total de ^{13}C a 24 hores en Ala, Asp i Pro era superior ($P < 0.05$) en el grup PP100 que en FM, indicant la transferència de l'esquelet de carboni d'altres AA cap a aquests.

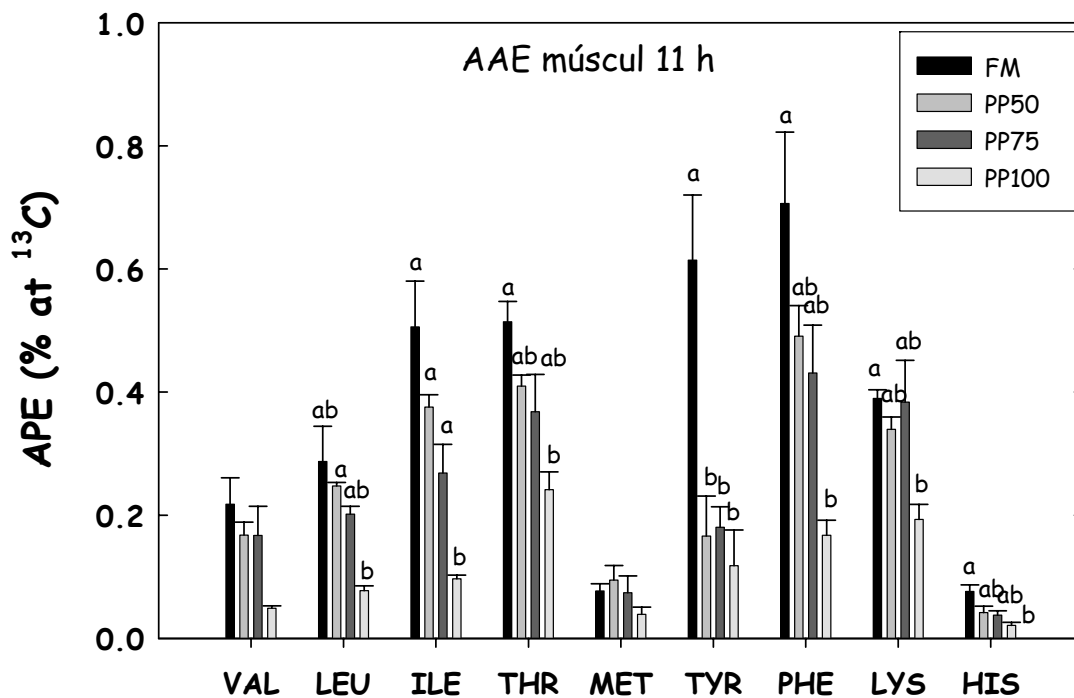


Figura 5.11: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE de múscul blanc, 11 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

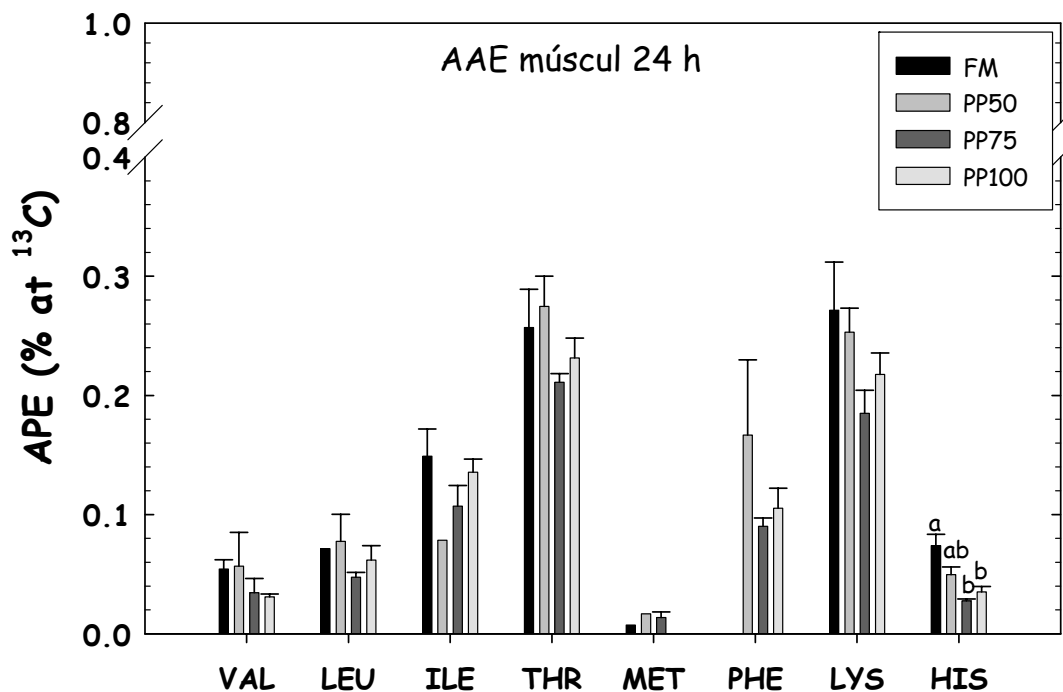


Figura 5.12: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AAE de múscul blanc, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$). El marcatge de Tyr era no detectable.

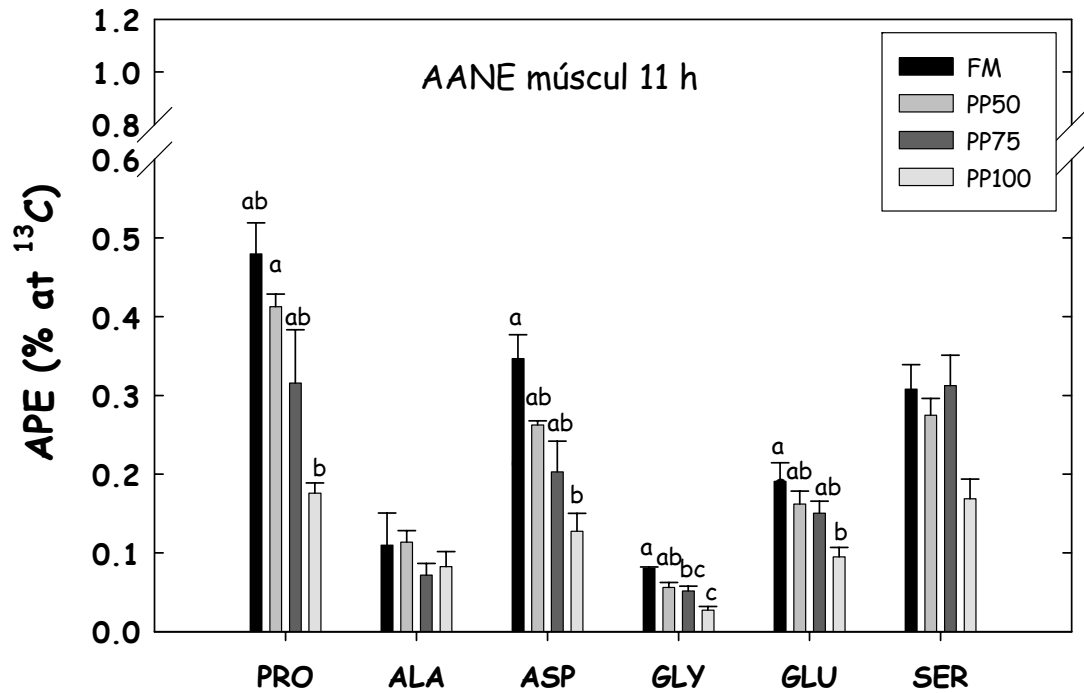


Figura 5.13: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AANE de múscul blanc, 11 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

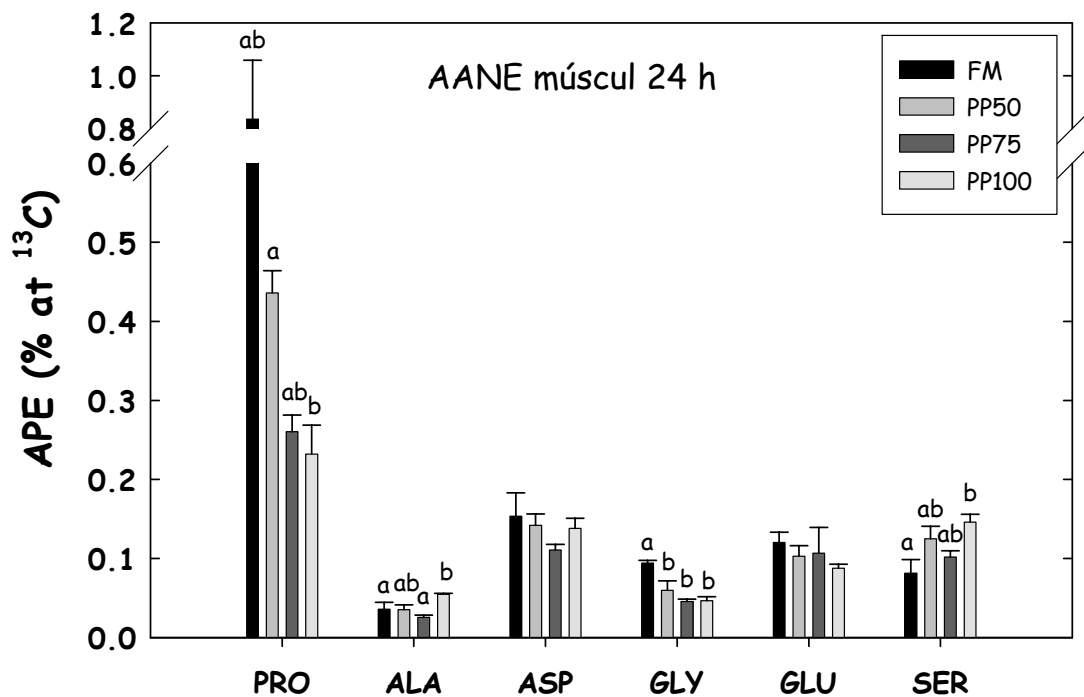


Figura 5.14: Marcatge (àtoms $^{13}\text{C}/100$ àtoms C) dels AANE de múscul blanc, 24 hores després de la ingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

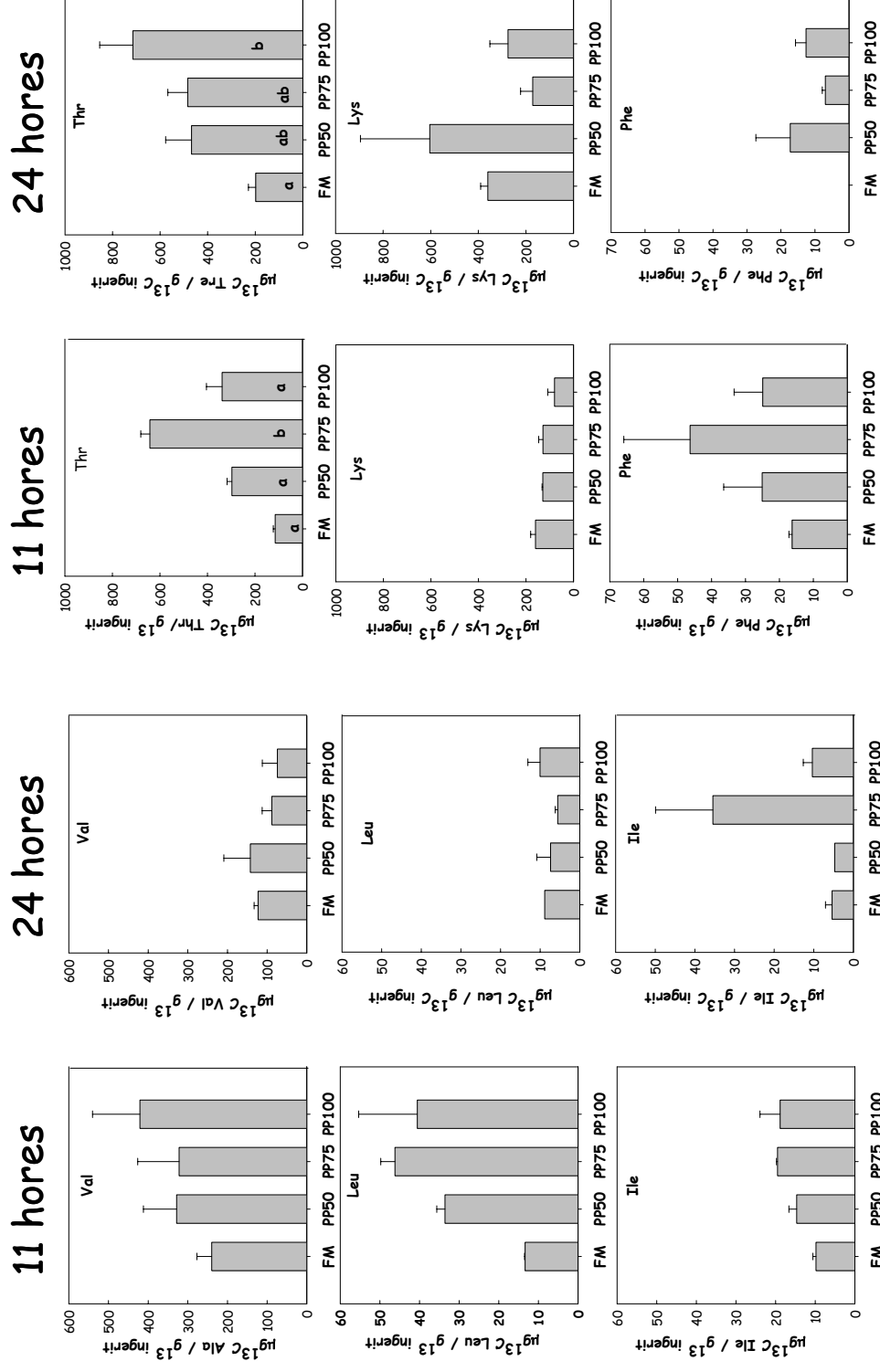


Figura 5.15: Marcatge de ^{13}C dels AAE lliures en múscul blanc, 11 i 24 hores postingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=3$ excepte per Leu (FM) i Ile (PP50) dels qual només es disposava d'un valor. La Phe del grup FM (24 h) era no detectable. Lletres diferents indiquen diferències significatives de entre grups ($P < 0.05$).

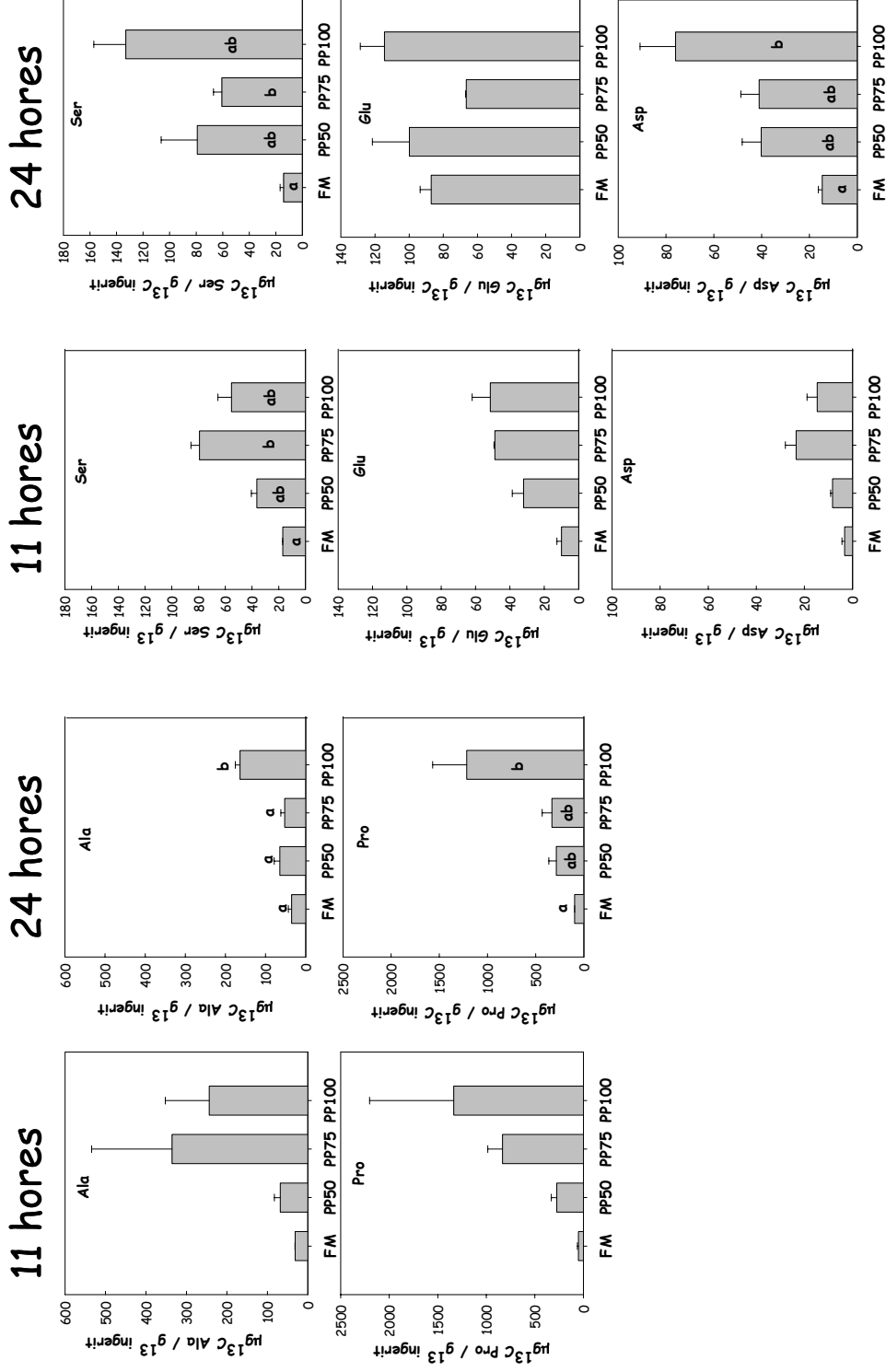
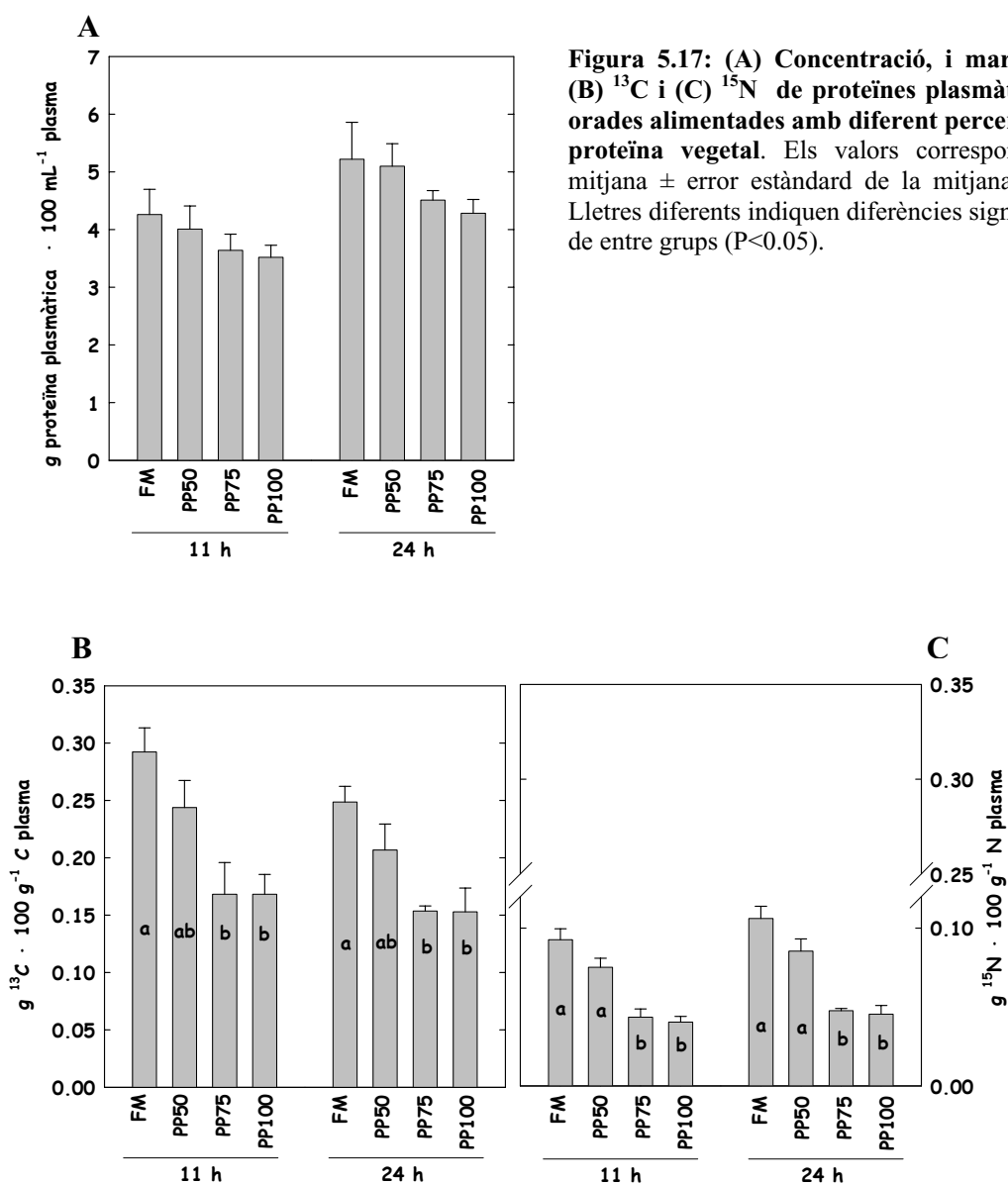


Figura 5.16: Marcatge de ¹³C dels AANE lliures en múscul blanc, 11 i 24 hores postingesta, en orades alimentades amb diferent percentatge de fonts de proteïna vegetal. Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana de n=3. Lletres diferents indiquen diferències significatives de entre grups (P<0.05).

6. Concentració i marcatge de ^{13}C i ^{15}N de les proteïnes plasmàtiques

La concentració de proteïnes plasmàtiques (Figura 5.17 A) va ser lleugerament menor, encara que sense mostrar un efecte significatiu, en els animals alimentat amb PP75 i PP100 en relació a FM i PP50. Sí que s'observen canvis significatius entre aquests grups en el marcatge d'aquestes proteïnes (Figures 5.17 B i 5.17 C), essent el marcatge menor en els grups PP75 i PP100 en relació a FM.



Discussió

En el present estudi el creixement i la ingesta van mostrar una relació inversa amb el percentatge de substitució de la farina de peix. En l'orada, la substitució d'un 10, 20 i 30% de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal no produïen canvis en el creixement (Robaina i col. 1995; Pereira i Oliva-Teles, 2002), mentre majors percentatges (60, 80 i 100%) afectaven al creixement i provocaven una reducció de la ingesta (Kissil i col., 2000, Pereira i Oliva-Teles, 2003). Hi ha diversos factors que poden influir sobre la ingesta. En el cas de l'orada, en concret, s'ha vist que el consum d'aliment es modifica en funció de la relació proteïna/energia de la dieta (Kentouri i col., 1995), però donat que les dietes eren isoproteïques i isoenergètiques és poc probable que la disminució de la ingesta estigui relacionada amb aquest paràmetre. Les propietats organolèptiques i físico-químiques de l'aliment també podrien ser les causants de la reducció de la ingesta. Així s'ha vist que en orades alimentades amb soja i amb colza hi ha una disminució de la ingesta relacionada amb la pitjor palatabilitat de les dietes vegetals en comparació amb les dietes basades en farina de peix (Kissil i col., 2000). Un altre factor que pot alterar la ingesta és la presència d'alguns factors antinutricionals, com els glicosinolats de la colza (Higgs i col., 1995) o altres factors intrínsecs de les proteïnes vegetals. La disminució de la ingesta també pot haver estat causada per una deficiència en algun AAE, com s'ha vist en la truita quan la dieta és deficient en arginina (Walton i col., 1986; Kim i col., 1992a), metionina (Kim i col., 1992b) o leucina (Choo i col., 1991) i en la carpa quan la dieta és deficient en lisina (De la Higuera i col., 1997). En els grups PP75 i PP100 la reducció de la ingesta va influir fortament no només en el pes final assolit pels animals, sinó també en la utilització de la proteïna de la dieta, com es discutirà a continuació. En el cas de les orades alimentades amb un 50% de fonts vegetals, malgrat la menor ingesta i els canvis observats en el nivell d'AA lliures en plasma i múscul en comparació amb FM, no es van observar canvis destacables en la incorporació dels marcadors en els teixits, components principals i AA lliures. Per tant, la utilització diària de la proteïna de la dieta no es veu modificada per un 50% de substitució i el menor creixement dels animals PP50, respecte a FM, estaria més relacionat amb una menor ingesta que amb un diferent ús de la proteïna de la dieta.

En els grups PP75 i PP100, la menor recuperació de marcatge en tots els teixits és indicador d'una major oxidació dels AA que provenen de la dieta. De fet, el menor marcatge de les proteïnes plasmàtiques en aquests grups demostra que el fetge ha oxidat una major quantitat d'AA procedents de la dieta. Hi ha dues possibles explicacions per aquest fenomen. D'una banda, el fet d'haver rebut una ingesta forçada corresponent a una ració de l'1% del pes corporal, quan aquests animals consumien en cada ingesta una menor quantitat de menjar (0.7%). Una major quantitat d'AA en els teixits estimularia l'activitat dels enzims catabòlics del fetge, ja que la Km d'aquests està molt per sobre de la concentració d'AA (Walton i Cowey, 1982). D'altra banda, el diferent nivell d'AA lliures en plasma a 11 i 24 hores entre FM i aquests grups és indicador d'un diferent ritme de captació dels AA. Aquest diferent ritme de captació pot estar relacionat amb el suplement de les dietes amb AA cristal·lins. Com ja s'ha discutit en el cas de la truita irisada, quan la dieta es suplementa amb AA cristal·lins, la més ràpida absorció d'aquests comparat amb els AA proteics (Murai i col., 1987; Cowey i Walton, 1988) fa incrementar la seva oxidació, de manera que es crea una deficiència d'AA que persisteix quan els AA proteics són absorbits, provocant també una major oxidació d'aquests últims. En l'orada, en concret, el suplement amb metionina de dietes basades en soja provoca la més ràpida absorció d'aquest AA, conduint a una situació d'imbalance postprandial (Sierra, 1995). En el grup PP100 la major oxidació de la proteïna de la dieta també queda reflectida en el menor APE dels AA lliures de plasma i múscul i en el menor marcatge del múscul. Per tant, els animals PP100 disposen diàriament de menys quantitat d'AA procedents de la dieta. Aquesta situació és comparable a la que provoquen dietes amb una concentració subòptima de proteïna o amb un perfil d'AA poc balancejat. En aquests casos s'observa un increment del reciclatge dels AA (Meyer-Burgdorf i Rosenow, 1995b; Fauconneau, 1985; Langar i Guillaume, 1994; Perera, 1995), com també s'observa en el grup PP100. En aquest grup, la disminució de la relació AAE/AANE en el múscul i l'increment de la concentració i el marcatge d'Ala, Asp (AA relacionats amb la transaminació) i Pro posen de manifest la transferència de l'esquelet de carboni d'altres AA a aquests. En el grup PP75 aquest increment de marcatge en els AANE no sembla ser quantitativament tan important com en el PP100. L'increment de ^{13}C en els AANE en PP100, i en menor quantitat en PP75, també pot procedir d'AA com la Val i Leu, els quals s'utilitzen amb finalitat energètica en el múscul (Jürss i Bastrop, 1995). En d'altres espècie, com l'anguila, la substitució de la farina de peix per fonts vegetals com la farina de gira-sol també provoca un increment

del reciclatge proteic (De la Higuera i col. 1999). En el llobarro, dietes de baixa qualitat provoquen igualment un increment del reciclatge proteic (Langar i col., 1993; Langar i Guillaume, 1994). En el salmó atlàntic també s'ha descrit una disminució de la relació AAE/AANE en múscul com a conseqüència de dietes de baixa qualitat (Sunde i col., 2004) i un increment de l'Ala, Asp i Pro quan són alimentats amb farina de blat (Mente i col., 2003). D'altra banda, l'increment de la His i la Gly en la fracció d'AA lliures a mesura que incrementa el percentatge de substitució suggereix un desajust en les proporcions dels AA per a la síntesi proteica. En la truita (bloc experimental II) també s'havia observat aquest fenomen, així com en el cas del salmó atlàntic alimentat amb dietes basades amb farina de blat (Mente i col., 2003).

A nivell de composició dels teixits es va observar que en les orades alimentades amb percentatges creixents de fonts de proteïna vegetal el contingut de lípids hepàtics incrementava, sense que s'alteressin els altres components hepàtics. Ara bé, aquests lípids no provenien de síntesi *de novo* a partir de proteïna, ja que el marcatge de ^{13}C dels lípids no va mostrar canvis entre grups, per tant, malgrat les dietes eren isolipídiques els lípids acumulats provindrien de la pròpia dieta. L'acumulació excessiva de lípids en el fetge s'ha associat, fins al moment, a problemes de malnutrició (Spisni i col., 1988), a dietes excessivament lipídiques (Caballero i col., 1999), o a l'efecte de l'estrès tèrmic (Ibarz i col., 2005, 2006). L'efecte de la font proteica sobre el metabolisme dels lípids és encara poc conegut, però s'ha vist que dietes riques en proteïna vegetal provoquen la disminució dels enzims lipogènics en el llobarro (Dias i col., 2005), tenen un efecte hipocolesterolèmic en l'orada (Gómez-Requeni i col., 2004) i que els adipòcits d'orades alimentades amb la dieta PP100 presenten una major lipòlisi basal que els d'orades alimentats amb la dieta FM (Albalat i col., 2005).

En conclusió, en l'orada és possible substituir un 50% de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal sense modificar l'ús diari de la proteïna de la dieta. Un 75% de substitució provoca una major oxidació de la proteïna de la dieta, mentre la substitució total provoca, a més a més, un increment de la fracció d'AA lliures del múscul i una disminució de la relació AAE/AANE, una menor disponibilitat dels AA de la dieta i un increment dels AANE que és indicador d'un increment del reciclatge proteic. Tots aquest factors indiquen que la substitució total de la farina de peix per fonts de proteïna

vegetal provoca un desequilibri postprandial d'AA que pot ser, en part, una de les causes del menor creixement dels animals. Millorar la palatabilitat de la dieta contribuiria a incrementar la ingesta i segurament a millorar el creixement. D'altra banda, el suplement de la dieta amb AAE en forma de petits pèptids o recoberts milloraria l'arribada simultània dels AA als llocs de síntesi proteica i per tant milloraria el creixement. Tanmateix, elevats percentatges de fonts de proteïna vegetal indueixen l'acumulació de lípids en el fetge.

BLOC EXPERIMENTAL IV

Influència dels ingredients vegetals en l'ús dels hidrats de carboni en la truita irisada i l'orada

Truites i orades van ser adaptades durant quatre mesos a dues dietes amb diferent font de proteïna, fet que comportava que l'origen dels hidrats de carboni també fos diferent (Taula 2.4). La dieta FM, per a cada espècie, contenia farina de peix i blat extrusionat. La font proteica de la dieta PP100 era barreja d'ingredients vegetals i com a principal font de midó contenia pèsol extrusionat.

En aquest capítol ens centrem en estudiar la captació i ús dels hidrats de carboni procedents de diferent origen. El destí del ^{13}C -midó incorporat a la dieta, en els teixits i els seus components principals 11 hores després de la ingesta, ens indicarà la capacitat d'assimilació i transformació dels hidrats de carboni.

Resultats

1. Destí del marcador ^{13}C -midó en teixits i components principals en la truita irisada

A la Figura 6.1 es mostra la incorporació de ^{13}C -midó en els diferents teixits estudiats i els seus components principals. La recuperació del marcador en fetge, múscul i carcassa en les truites FM va ser 6-7 vegades major que en les PP100; en canvi, la incorporació de ^{13}C en PV+G era 6 vegades major en els animals alimentats amb la dieta vegetal que en els alimentats amb farina de peix. La incorporació de marcador en glicogen hepàtic en el grup FM representava un 40% del total del marcatge en fetge ($0.65\text{g }^{13}\text{C}/100\text{g }^{13}\text{C}$ ingerit), mentre en PP100 representava el 18% ($0.04\text{g }^{13}\text{C}/100\text{g }^{13}\text{C}$ ingerit). En el múscul, la distribució del marcador va diferir entre grups, trobant-se en el grup PP100 pràcticament tot el marcador en fracció soluble (93%). En el grup FM, un 17% de tot el marcatge del múscul es va trobar en proteïna i un 5% en glicogen.

La recuperació total del ^{13}C -midó en tot el peix (Figura 6.2) va ser quasi el doble en els animals alimentats amb farina de peix (38.4%) que en els alimentats amb la dieta vegetal (18.3%). El patró de distribució del marcador en teixits també va ser diferent entre grups. En les truites adaptades a FM el marcatge es va trobar majoritàriament en múscul (36% de tot el marcatge) i resta de peix (51% de tot el marcatge), mentre que en les adaptades a la dieta vegetal pràcticament tot el marcatge es va recuperar en el paquet visceral (71% de tot el marcatge).

En els dos grups experimentals el principal destí del ^{13}C -midó va ser la fracció soluble dels teixits (80% de tot el marcatge, Figura 6.3).

La glucosa plasmàtica d'aquests animals no va diferir significativament entre grups (FM: 4.54 ± 0.44 , PP100: 4.26 ± 0.47 mM).

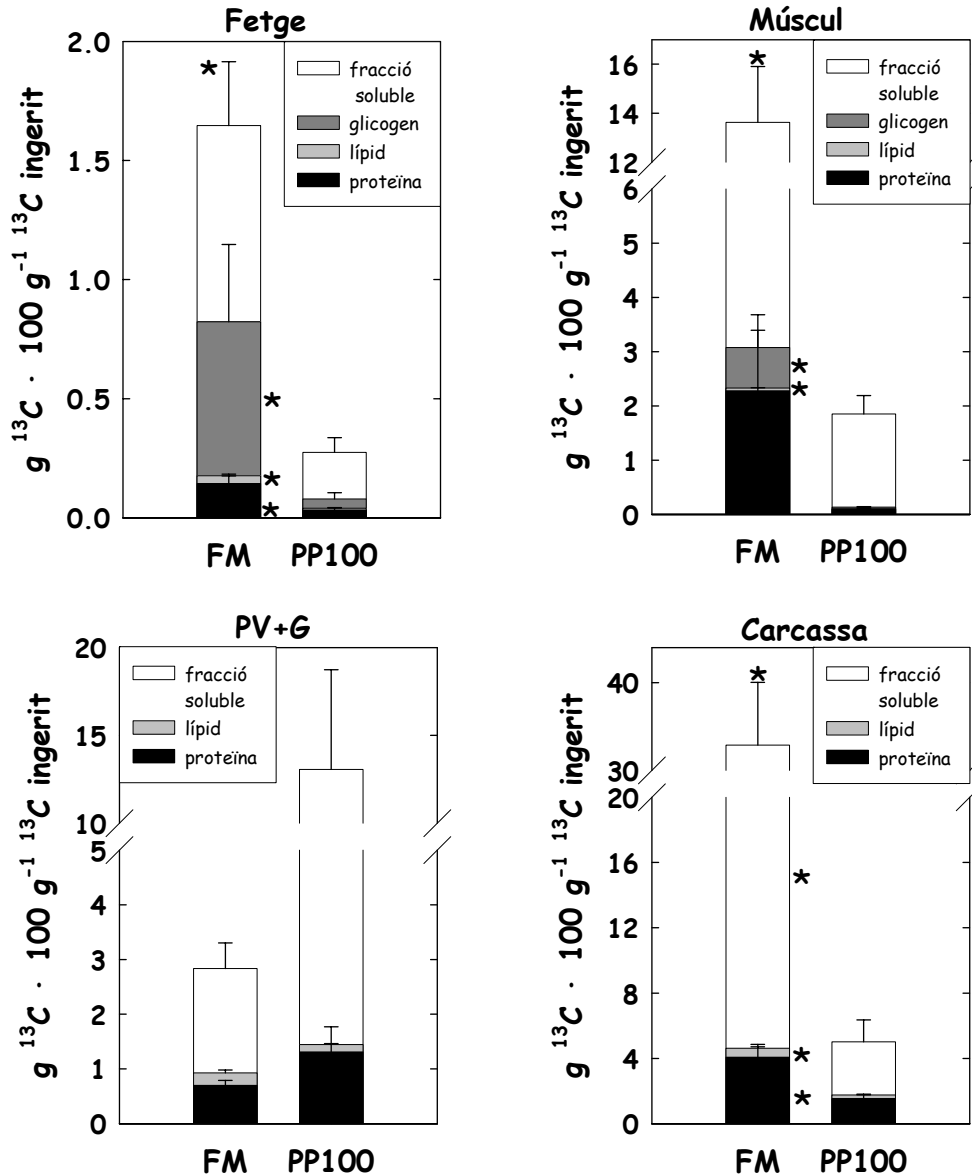


Figura 6.1: Recuperació de ^{13}C -midó en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble dels teixits, 11 hores després de la ingesta, de truites irisades alimentades amb farina de peix (FM) o amb fonts de proteïna vegetal (PP100). Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de $n=4$. (*) a la part superior de la barra indica que la recuperació total del marcador en el teixit diferia significativament ($p<0.05$) entre grups; (*) a la dreta d'una barra indica diferències significatives entre grups per aquell component específic, ($P<0.05$).

Figura 6.2: Recuperació total de ^{13}C -midó en teixits de truites irisades alimentades amb farina de peix (FM) o amb fonts de proteïna vegetal (PP100), 11 hores després de la ingesta. La recuperació total es va calcular com la suma de les recuperacions totals en teixits (la resta de peix s'ha calculat per diferència entre el marcatge total en carcassa menys el marcatge total en múscul blanc). Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana per $n=4$. (*) indica diferències significatives entre grups ($P<0.05$).

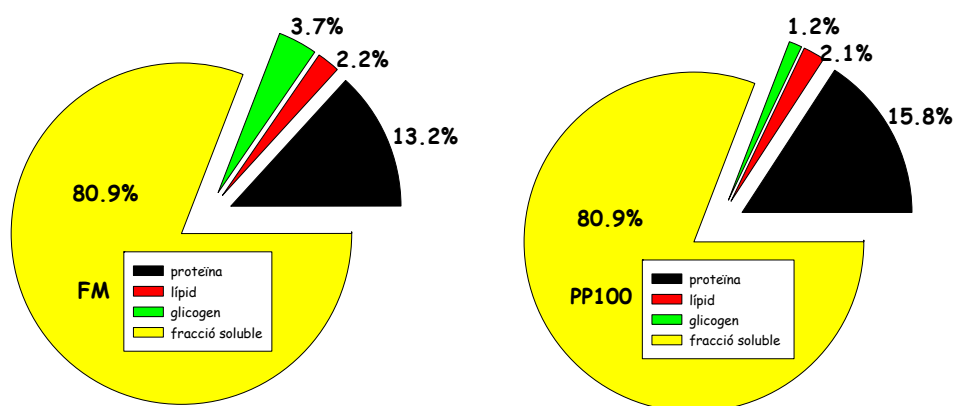
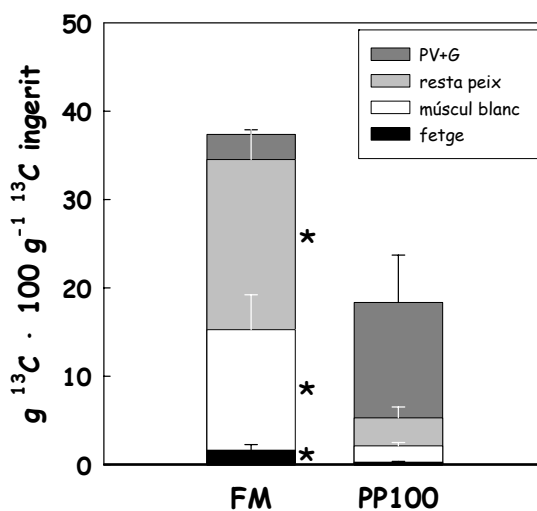


Figura 6.3: Distribució de ^{13}C -midó en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble en truites irisades alimentades amb farina de peix (FM) o amb fonts de proteïna vegetal (PP100). Els valor corresponen a la mitjana de $n=4$.

2. Destí del marcador ^{13}C -midó en teixits i components principals en l'orada

En aquesta espècie la incorporació de ^{13}C -midó en tots els teixits estudiats va ser major en els animals alimentats amb farina de peix (Figura 6.4) que amb proteïna vegetal, essent per tant, també major la recuperació total de ^{13}C en tot el peix (Figura 6.5). El nivell de glucosa plasmàtica també va ser major en el grup FM que en PP100 (4.36 ± 0.22 en FM i 3.49 ± 0.19 en PP100, $P<0.05$). En els dos grups, el principal destí del ^{13}C -midó en el fetge va ser en glicogen (77% en els dos casos), representant el marcatge d'aquest òrgan més de la meitat del total de marcatge recuperat en el cos. La incorporació total de marcador en múscul (Figura 6.4) va ser el doble en el grup FM que el PP100, encara que el patró de distribució del marcador era molt similar entre els dos grups (30-40 % del total de marcatge en proteïna i 60-54 % en fracció soluble, en FM i PP100 respectivament). També en la carcassa (Figura 6.4) el patró de distribució del

marcador va ser molt similar entre grups (24-30 % del total del marcatge en proteïna i 62-64% en fracció soluble, en FM i PP100 respectivament).

De forma global i per als dos grups, els principals destins del ^{13}C -midó (Figura 6.6) van ser la fracció soluble dels teixits (41-47% en FM i PP100 respectivament) i el glicogen (39-32% en FM i PP100 respectivament), majoritàriament hepàtic.

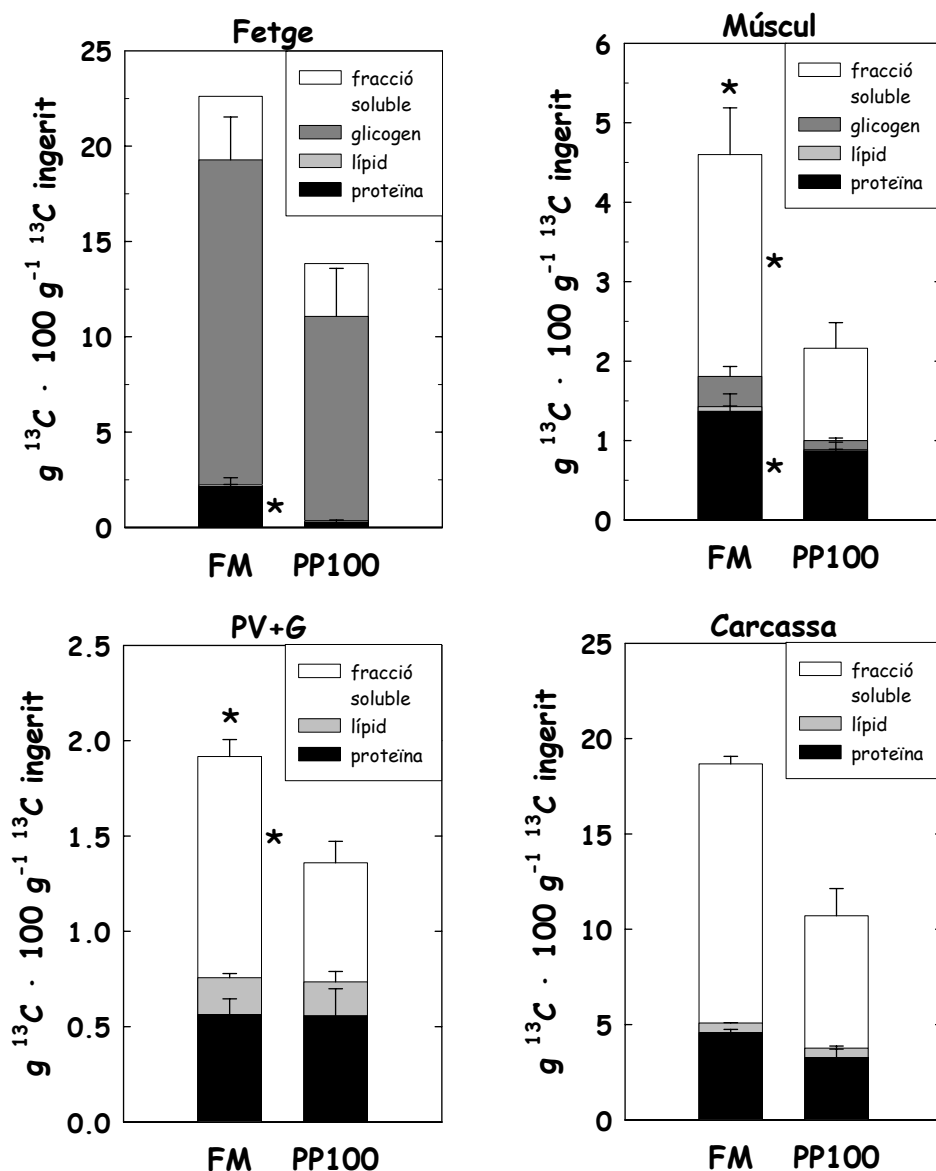


Figura 6.4: Recuperació de ^{13}C -midó en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble en teixits, 11 hores després de la ingesta, d'orades alimentades amb farina de peix (FM) o amb fonts de proteïna vegetal (PP100). Els valors corresponen a la mitjana \pm error estàndard de la mitjana de n=5. (*) a la part superior de la barra indica que la recuperació total del marcadore en el teixit diferia significativament ($P < 0.05$) entre grups; (*) a la dreta d'una barra indica diferències significatives entre grups per aquell component específic, ($P < 0.05$).

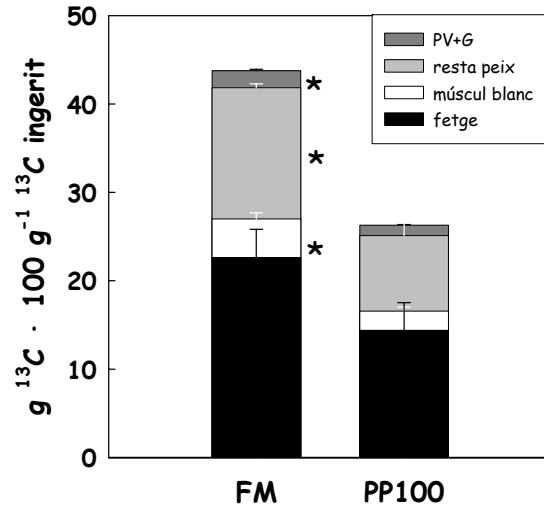


Figura 6.5: Recuperació total de ¹³C-midó en teixits d'orades alimentades amb farina de peix (FM) o amb fonts de proteïna vegetal (PP100), 11 hores després de la ingesta. La recuperació total es calcular com la suma de les recuperacions totals en teixits (la resta de peix s'ha calculat per diferència entre el marcatge total en carcassa menys el marcatge total en múscul blanc). Els valors corresponen a la mitjana ± error estàndard de la mitjana per n=5. (*) a la dreta d'una barra indica diferències significatives entre grups, (P<0.05).

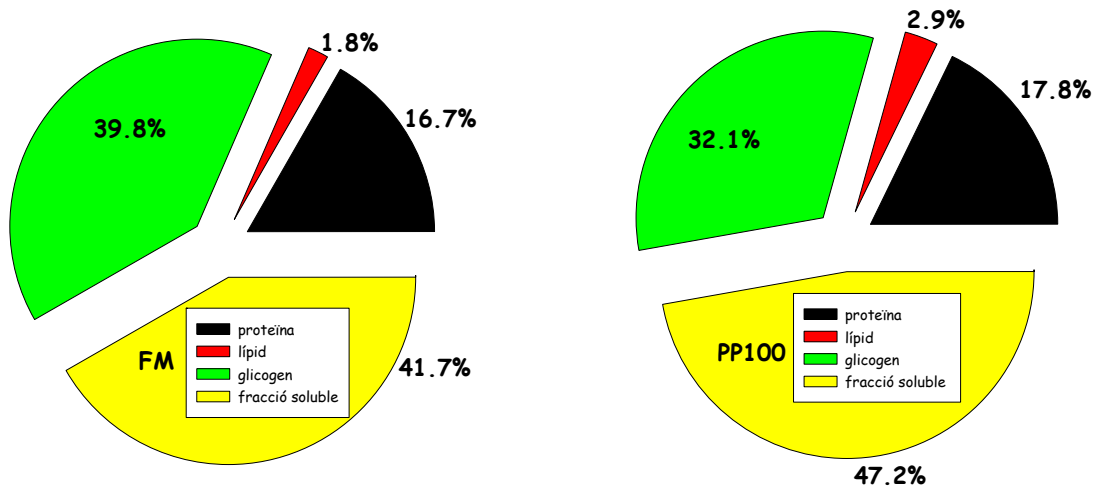


Figura 6.6: Distribució de ¹³C-midó en proteïna, lípid, glicogen i fracció soluble en orades alimentades amb farina de peix (FM) o amb fonts de proteïna vegetal (PP100). Els valor corresponen a la mitjana de n=5.

Discussió

En les dietes FM de truita i orada el midó procedia de blat extrusionat, mentre en les PP100, procedia principalment de pèsols extrusionats. L'elevada recuperació de marcador en el paquet visceral de les truites PP100 (70% de tot el marcatge recuperat) és indicador de la menor digestibilitat del midó en aquesta dieta (coeficient de digestibilitat aparent del midó, ADC: 56.2% en PP100 respecte a 99.2% en FM). De fet, si corregim la recuperació total de marcador en teixits per la digestibilitat dels carbohidrats no s'observen diferències entre grups (38 g $^{13}\text{C}/100\text{ g }^{13}\text{C}$ ingerit en FM i 33 g $^{13}\text{C}/100\text{ g }^{13}\text{C}$ ingerit en PP100). Una de les principals limitacions de l'ús dels hidrats de carboni en els peixos és la seva baixa digestibilitat (Wilson, 1994), que generalment limita la seva disponibilitat. La digestibilitat del midó varia en funció de l'activitat amilasa de cada espècie (Krogdahl i col. 2005), del percentatge de midó (Singh i Nose, 1967; Hemre i col., 1989; Wilson, 1994; Pfeffer, 1995), de la temperatura (Médale i col., 1991; Capilla i col., 2003), i també, en funció de la naturalesa del gra (revisat per Boujard, 1999). Els grans de midó del pèsol (dieta PP100) tenen un tamany més gran que els del blat (dieta FM), fet que dificulta la seva digestibilitat. La digestibilitat dels hidrats de carboni complexos, i per tant, l'aport d'energia digerible, millora substancialment quan són sotmesos a tractaments hidrotèrmics (gelatinització, cocció-extrusió) (Bergot i Brèque, 1983; Takeuchi i col., 1990). Truites cultivades a 18°C, alimentades amb farina de peix i amb un 20% de pèsols extrusionats o amb un 20% de blat extrusionat no van presentar diferències de digestibilitat del midó (ADC midó pèsols extrusionats: 84.8% ADC midó blat extrusionat: 82.2%; Capilla i col., 2003). En canvi, en el present treball, sembla que el procés d'extrusió dels pèsols de la dieta PP100 de truita no va ser suficient per millorar la digestibilitat del midó, fent que l'aport de carbohidrats digeribles de la dieta PP100 fos d'un 5.9%. Aquest valor és baix si el comparem amb el valor generalment recomanat per salmònids ($\geq 20\%$, revisat per Wilson, 1994). Encara que en l'habitat natural dels salmònids la dieta no aporta més d'un 5% de carbohidrats, un menor aport de sucres contribuiria a agreujar el dèficit energètic mostrat per les truites PP100 (bloc experimental II). D'altra banda, la glucèmia dels animals PP100 no diferia de la del

grup FM, això suggereix que amb un menor aport de carbohidrats la glucosa plasmàtica ha de ser mantinguda a expenses dels AA. De fet, en la truita s'ha demostrat que la falta de carbohidrats de la dieta provoca una major degradació de proteïna que s'utilitza o bé per sintetitzar glucosa o bé amb finalitat energètica (Peragón i col., 1999). Incrementar el percentatge de carbohidrats o millorar la seva digestibilitat, preservaria als AA de la oxidació i la gluconeogènesi i afavoriria l'estalvi proteic (Kaushik i Oliva-Teles, 1985; Kim i Kaushik, 1992; Brauge i col., 1995; Regost i col., 1999).

En el cas de l'orada, no disposem del coeficient de digestibilitat aparent del midó, però el fet que no s'observi una acumulació del marcador en el paquet visceral del grup PP100, com s'observava amb les truites, suggereix que no hi hauria problemes de digestibilitat dels carbohidrats. La menor recuperació de marcador en tots els teixits podria estar relacionada amb la major oxidació de la dieta PP100, com s'ha descrit en el bloc experimental III. De fet, la menor glucèmia i el menor contingut de glicogen dels teixits (valors al bloc experimental III) en aquest grup és indicador d'una menor disponibilitat de carbohidrats provocat per la major oxidació de la dieta. També és possible que el contingut de fibra de les fonts vegetals hagi accelerat el trànsit intestinal, fent disminuir el temps disponible per la digestió i absorció dels nutrients (Krogdahl i col., 2005), en aquest cas dels hidrats de carboni, i afectant per tant, també, a l'absorció del marcador.

El present treball permet comparar de manera directa la utilització metabòlica dels carbohidrats entre la truita i l'orada (ambdues alimentades amb dietes FM), així com mesurar quines són les vies més actives per a cada espècie. En les truites FM, el 80% del marcador es trobava formant part de la fracció soluble (compostos intermediaris o glucosa), principalment del múscul i la carcassa, reflectint la baixa capacitat de la truita d'emmagatzemar els carbohidrats exògens en forma de glicogen. Aquesta inhabilitat queda reflectida en una hiperglicèmia prolongada quan s'administra una càrrega oral de glucosa o quan les dietes són riques en carbohidrats (Palmer i Ryman, 1972; Bergot, 1979; Brauge i col., 1995). En canvi, en l'orada, el 40% del ¹³C-midó es va trobar en glicogen, principalment hepàtic, indicant que aquesta espècie és capaç d'utilitzar els carbohidrats exògens, com també demostren els estudis de Peres i

col. (1999) en administrar una càrrega de glucosa, i l'increment de l'activitat dels enzims glicolítics i de la via de les pentoses fosfat en resposta a una dieta rica en carbohidrats (Metón i col., 1999).

La recuperació total de ^{13}C en els teixits de la truita FM (38%) i l'orada FM (43%) és comparable a l'obtinguda amb glucosa- ^{14}C en el peix gat (48%) (Saad, 1989), el salmó atlàntic (30-38%) (Hemre i Storebakken, 2000) i la truita (33%) (Mannerström i col., 2001), malgrat la més ràpida absorció de la glucosa que la del midó i malgrat els diferents temps de mostreig (11 hores en el nostre cas i 24, 16 i 8 hores en els treballs citats, respectivament). La síntesi de lípids a partir de carbohidrats en la truita (2.2%) i l'orada (1.8%) també es troba en el rang descrit pel peix gat (2.5%, Saad, 1989) i el salmó (1%, Hemre i Storebakken, 2000). Si comparem la recuperació de marcatge en forma de glicogen en la truita (3.7%), en el peix gat (13.4%, Saad, 1989) i en l'orada (40%) es pot observar el gran impacte dels carbohidrats sobre el fetge de l'orada en comparació amb aquestes dues espècies.

En resum, l'acumulació del marcador ^{13}C -midó en el PV+G de les truites PP100 indica una menor digestibilitat dels carbohidrats d'aquesta dieta. Aquest fenomen no es va observar en l'orada. A més, aquest espàrid emmagatzema gran part dels carbohidrats de la dieta en forma de glicogen, mentre la truita irisada no presenta aquesta capacitat.

BLOC EXPERIMENTAL V

Isòtops estables (^{15}N i ^{13}C) en la truita irisada i l'orada: variacions de l'abundància natural

En els estudis precedents s'havien pres mostres dels teixit dels animals emprats com a blancs de cada dieta, així com també s'havia analitzat l'abundància natural en cada component principal de totes les combinacions experimentals. L'interès d'aquest capítol es centra en analitzar totes aquestes dades en conjunt per estudiar si en aquestes dues espècies de peix la dieta consumida i el tipus de teixit determinen canvis en l'abundància natural d'ambdós isòtops i si existeixen canvis en el fraccionament isotòpic en funció de la dieta i el teixit. En l'actualitat es sap que l'abundància natural d'aquests dos isòtops varia entre teixits en la truita irisada. En canvi no es disposa de dades per orada.

Resultats

La Figura 6.1 mostra la $\delta^{15}\text{N}$ de les dietes d'ambdues espècies i el corresponent valor corporal dels peixos després de quatre mesos d'adaptació a les dietes. La $\delta^{15}\text{N}$ de les dietes per les dues espècies disminuïa a mesura que incrementava el percentatge de proteïna vegetal, alhora que també ho feia la $\delta^{15}\text{N}$ dels peixos (truita $r = 0.97$, orada $r = 0.84$; $P < 0.05$), essent sempre major la $\delta^{15}\text{N}$ del peix que el de la seva corresponent dieta. Aquesta distància entre la $\delta^{15}\text{N}$ del peix i de la dieta, anomenada fraccionament isotòpic, es situava en el cas de la truita en un rang entre 1.0-3.16 ‰, presentant les truites alimentades amb RTglu major distància respecte a la dieta (3.16 ‰) que els altres grups (1.75 ± 0.08 ‰ mitjana dels altres cinc grups). Per orada, els valors de fraccionament es trobaven entre 1.6–5.7 ‰, presentant les orades alimentades amb FM, PP50, PP75 i PP100 major fraccionament (4.5 ± 0.23 ‰) que les orades alimentades amb GSB i GSBglu (1.8 ± 0.14 ‰).

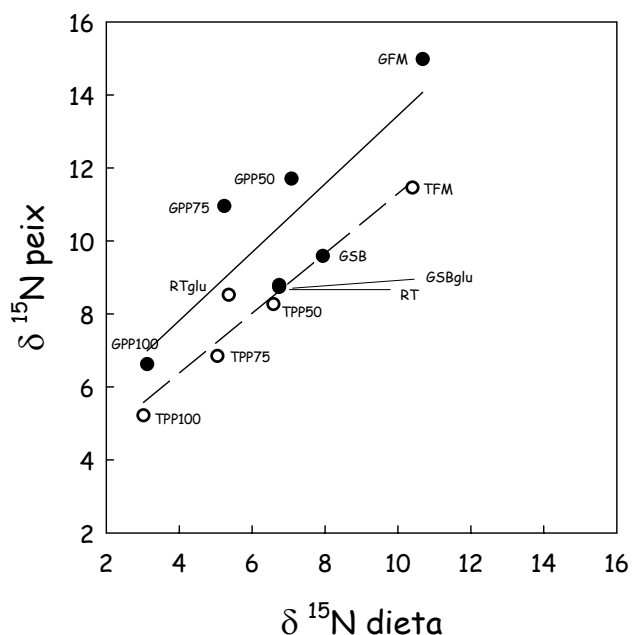
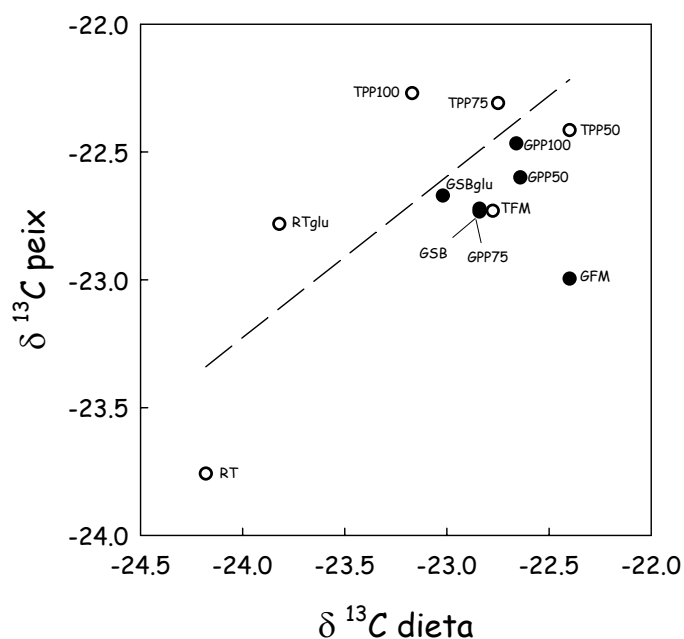


Figura 6.1: Relació entre la $\delta^{15}\text{N}$ de la dieta i la $\delta^{15}\text{N}$ corporal de truites irisades (T) i orades (G) adaptades a les sis dietes experimentals. Truita: $y = 0.82x + 3.10$; Orada: $y = 0.93x + 4.07$.

Les $\delta^{13}\text{C}$ de les diferents dietes van ser molt similars entre elles, diferint com a màxim en 1.7 ‰ entre les dietes de truita i 0.2 ‰ entre les dietes d'orada (Figura 6.2). La diferència de $\delta^{13}\text{C}$ entre la composició corporal i la dieta, fraccionament isotòpic, va variar entre -0.60 i 1.04 ‰ per les dues espècies. En la truita es va trobar una correlació

positiva ($r = 0.78$, $P < 0.05$) entre la $\delta^{13}\text{C}$ de la dieta i la $\delta^{13}\text{C}$ corporal; en canvi, no es va trobar per l'orada.

Figura 6.2: Relació entre la $\delta^{13}\text{C}$ de la dieta i la $\delta^{13}\text{C}$ corporal de truites irisades (T) i orades (G) adaptades a les sis dietes experimentals. Truita: $y = 0.63x - 8.09$.



La figura 6.3 mostra la relació entre l'SGR de truites i orades i el fraccionament del ^{15}N (fraccionament entre la dieta i l'animal). En el cas de la truita (Fig 6.3 A) es va trobar una relació inversa ($r = -0.873$, $P < 0.05$). En l'orada (Fig. 6.3 B) no existia correlació degut a que el grup PP100 presentava un comportament diferent a la resta de grups. Si s'exclou el grup PP100 de l'anàlisi aleshores sí es troba una relació inversa entre l'SGR i el fraccionament ($r = -0.957$, $P < 0.05$).

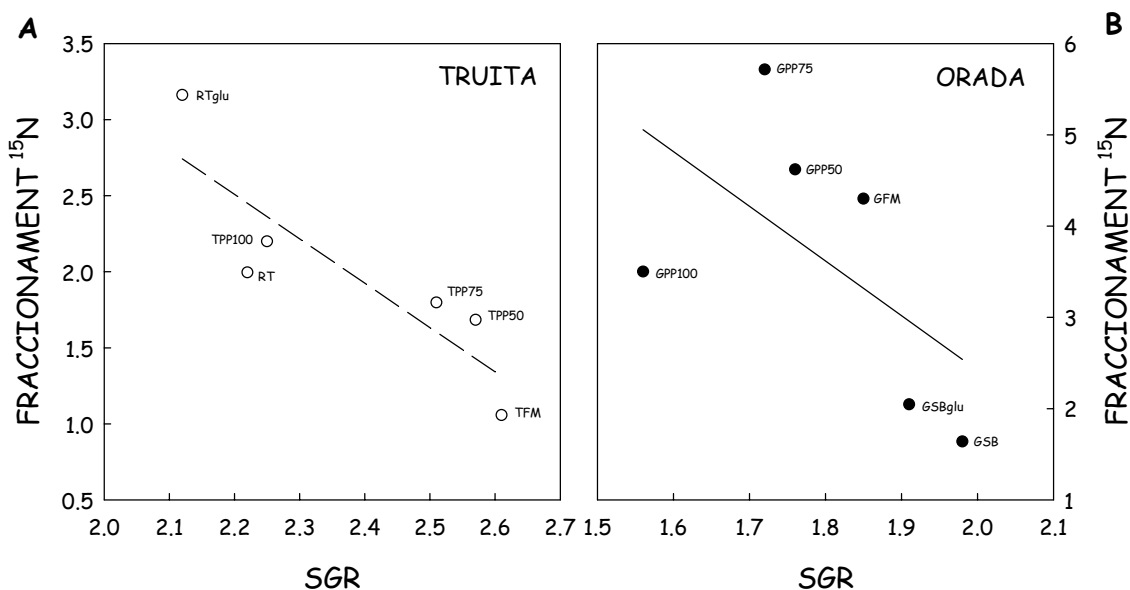


Figura 6.3: Relació entre la taxa de creixement específic (SGR) i el fraccionament del $\delta^{15}\text{N}$ en truites (T) i orades (G) adaptades a les sis dietes experimentals. Truita: $y = -2.91x + 8.92$. Els valors de SGR van ser proporcionats per l'INRA i per l'IATS.

En les dues espècies, el contingut de $\delta^{15}\text{N}$ dels teixits (Taula 6.1) era menor en els animals alimentats amb PP100 que en els alimentats amb FM ($P<0.05$) i, en el cas de la truita, existia una gradació decreixent a mesura que incrementava el percentatge de substitució. També en les dues espècies el contingut de $\delta^{15}\text{N}$ dels teixits diferia entre teixits ($P<0.05$). En truita, la $\delta^{15}\text{N}$ va ser similar per múscul, carcassa i fetge. En l'orada, la $\delta^{15}\text{N}$ del múscul i la carcassa així com la $\delta^{15}\text{N}$ de la proteïna muscular i de la carcassa eren majors ($P<0.05$) que la $\delta^{15}\text{N}$ del fetge. En les dues espècies, els valors més baixos de $\delta^{15}\text{N}$ es van trobar en el paquet visceral + greix perivisceral (PV+G) ($P<0.05$).

La dieta també va determinar canvis en el contingut de ^{13}C en la truita (Taula 6.2). Així les truites alimentades amb la dieta RT van presentar un menor contingut en ^{13}C en els seus teixits ($P<0.05$) que les truites alimentades amb les dietes PP50, PP75 i PP100. Per les dues espècies, els valors més baixos de $\delta^{13}\text{C}$ es van trobar en el PV+G ($P<0.05$). Com es pot observar en aquesta taula, el PV+G de les dues espècies estava empobrit en ^{13}C en relació amb la dieta.

Com mostra la figura 6.4, en les dues espècies el contingut de ^{15}N dels teixits estava positivament correlacionat (truita: $r=0.42$, orada: $r=0.48$; $P<0.01$) amb el contingut de proteïna d'aquests.

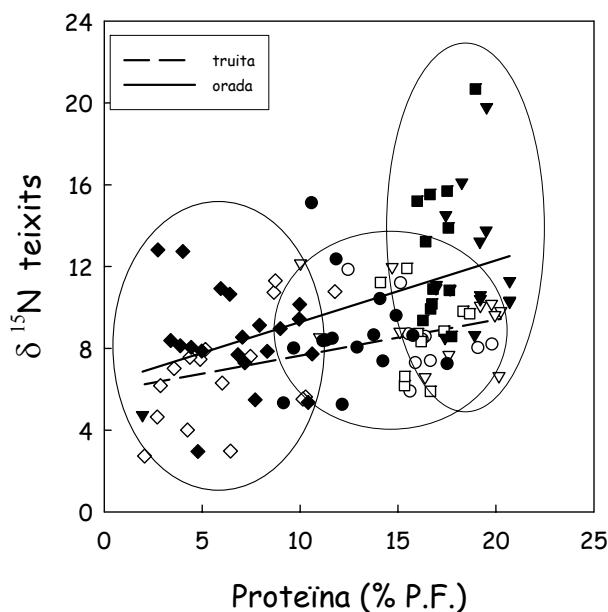


Figura 6.4: Relació entre la $\delta^{15}\text{N}$ dels teixits i el percentatge de proteïna tissular de truites irisades i orades adaptades a les sis dietes experimentals. Els símbols blancs corresponen a truita i els negres a orada. Els teixits es representen amb els següents símbols: fetge ($\circ \bullet$), paquet visceral ($\diamond \blacklozenge$), múscul ($\blacktriangledown \triangledown$) i carcassa ($\square \blacksquare$). Amb els cercles es vol remarcar la classificació dels teixits en funció d'aquestes dues variables.

Taula 6.1 : $\delta^{15}\text{N}$ de teixits i proteïna tissular de truites irisades i orades adaptades a les sis dietes experimentals

<i>TRUITA</i>	FM	RT	RTglu	PP50	PP75	PP100	
	$\delta^{15}\text{N}$ de la dieta						
	10.4	6.74	5.36	6.58	5.05	3.02	
	$\delta^{15}\text{N}$ del teixit						Factor 1(teixit)
Fetge	11.53	8.72	8.13	8.52	7.36	6.01	1,2
Múscul	12.08	10.08	9.73	9.51	8.12	6.60	1
Carcassa	11.56	9.81	9.70	8.76	7.47	6.04	1,2
PV+G	10.93	7.54	7.13	6.93	5.25	3.23	2
Factor 2 (dieta)	a	b	b	b	bc	c	
	$\delta^{15}\text{N}$ de la proteïna						
Fetge	11.81	8.02	5.42	8.68	7.68	6.46	
Múscul	13.18	9.99	10.05	9.24	10.43	7.62	
Carcassa	10.76	7.79	7.10	6.99	10.69	8.79	
PV+G	11.75	8.76	7.52	8.12	9.75	7.42	
Factor 2 (dieta)	a	ab	ab	ab	ab	b	

<i>ORADA</i>	FM	GSB	GSBglu	PP50	PP75	PP100	
	$\delta^{15}\text{N}$ de la dieta						
	10.68	7.94	6.74	7.08	5.24	3.12	
	$\delta^{15}\text{N}$ del teixit						Factor 1(teixit)
Fetge	13.76	8.47	7.68	10.02	9.38	5.32	1
Múscul	19.79	11.06	10.41	14.16	14.66	8.58	2
Carcassa	18.19	10.87	10.05	14.20	14.70	8.98	2
PV+G	12.05	8.60	7.64	9.52	7.04	4.62	1
Factor 2 (dieta)	a	b	bc	ab	abc	c	interacció=0.009
	$\delta^{15}\text{N}$ de la proteïna						<i>teixit</i>
Fetge	13,56	8.97	8.20	10.30	9.95	6.13	1
Múscul	20.16	11.45	10.75	15.50	15.26	9.94	2
Carcassa	18.51		9.90	14.48	14.89	9.38	2,3
PV+G	14.20	7.75	7.70	10.63	10.35	6.44	1,3
Factor 2 (dieta)	a	bc	bc	ab	ab	c	interacció=0.001

Els valors de $\delta^{15}\text{N}$ de les dietes són la mitjana de sis valors. Els valors de $\delta^{15}\text{N}$ dels animals de cada condició experimental són la mitjana de dos valors. Números diferents indiquen diferències significatives entre teixits ($P < 0.05$). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre animals alimentats amb diferent dietes ($P < 0.05$).

Taula 6.2 : $\delta^{13}\text{C}$ de teixits i proteïna tissular de truites irisades i orades adaptades a les sis dietes experimentals

<i>TRUITA</i>	FM	RT	RTglu	PP50	PP75	PP100	
	$\delta^{13}\text{C}$ de la dieta						
	-22.78	-24.18	-23.82	-22.40	-22.75	-23.17	
	$\delta^{13}\text{C}$ del teixit						Factor 1(teixit)
Fetge	-21.0	-22.23	-21.63	-20.7	-20.47	-20.66	1
Múscul	-22.36	-21.23	-21.1	-20.87	-21.6	-20.8	1,2
Carcassa	-21.92	-23.0	-22.25	-21.93	-21.93	-22.0	2
PV+G	-24.69	-26.15	-25.89	-24.92	-24.26	-24.53	3
Factor 2 (dieta)	ab	a	ab	b	b	b	

<i>ORADA</i>	FM	GSB	GSBglu	PP50	PP75	PP100	
	$\delta^{13}\text{C}$ de la dieta						
	-22.4	-22.84	-23.02	-22.64	-22.84	-22.66	
	$\delta^{13}\text{C}$ del teixit						Factor 1(teixit)
Fetge	-22.1	-21.72	-21.78	-21.77	-22.28	-22.55	1
Múscul	-19.3	-20.92	-20.55	-20.25	-20.05	-20.17	2
Carcassa	-22.5	-22.9	-23.0	-22.67	-22.67	-22.16	3
PV+G	-25.1	-25.48	-25.51	-24.68	-24.84	-24.15	4

Els valors de $\delta^{13}\text{C}$ de la dieta són la mitjana de sis valors i els valors de $\delta^{13}\text{C}$ dels animals per a cada condició experimental són la mitjana de dos valors. Números diferents indiquen diferències significatives entre teixits ($P < 0.05$). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre animals alimentats amb diferent dietes ($P < 0.05$).

Tal com s'ha descrit per la $\delta^{15}\text{N}$, també la $\delta^{13}\text{C}$ dels teixits (figura 6.5.A) i la $\delta^{13}\text{C}$ de les proteïnes (figura 6.6.A) de les dues espècies estava positivament correlacionada amb el contingut en proteïna dels teixits (figura 6.5.A, truita $r = 0.89$, orada $r = 0.78$, $P < 0.01$; figura 6.6.A: truita $r = 0.36$, orada $r = 0.33$, $P < 0.05$). Com es pot observar a la figura 6.6.A, la $\delta^{13}\text{C}$ de la proteïna del múscul de l'orada i del múscul i la carcassa de la truita eren majors ($P < 0.05$ en els tres casos) que la $\delta^{13}\text{C}$ de les proteïnes dels altres teixits. D'altra banda, la $\delta^{13}\text{C}$ dels teixits de les dues espècies estava negativament correlacionada amb el contingut en lípids dels teixits (figura 6.5.B, truita $r = -0.76$, orada $r = -0.83$; $P < 0.01$), però la $\delta^{13}\text{C}$ dels lípids només estava positivament correlacionada amb el percentatge de lípid del teixit en el cas de l'orada (figura 6.6.B: orada $r = 0.39$; $P < 0.01$).

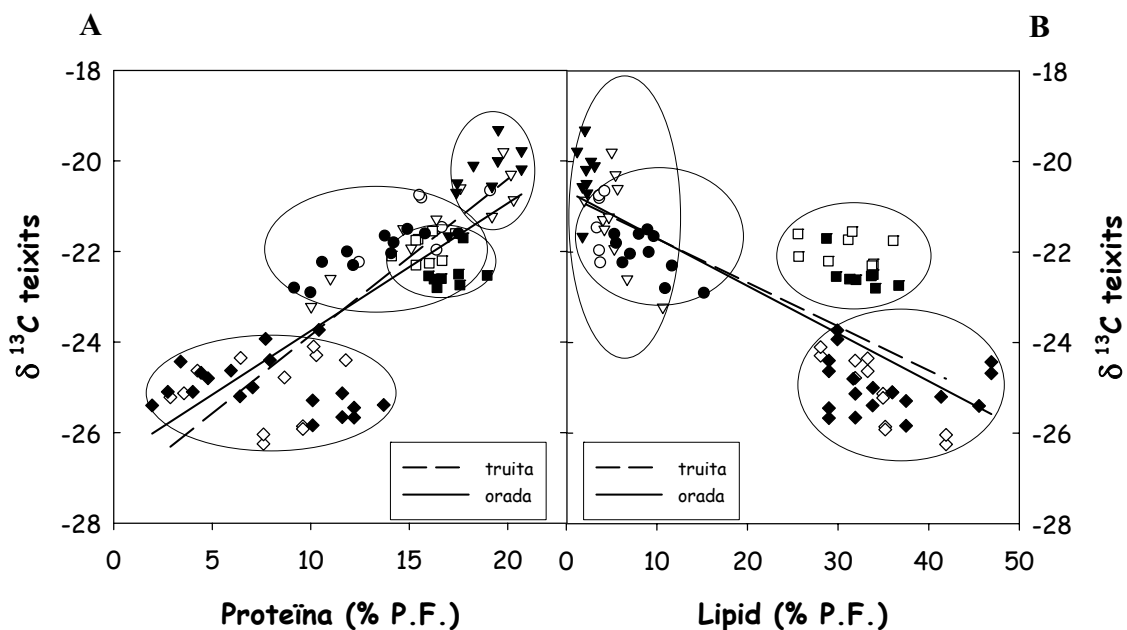


Figura 6.5. Relació entre la $\delta^{13}\text{C}$ dels teixits i el percentatge de proteïna i lípid tissular de truites irisades i orades adaptades a les sis dietes experimentals. Els símbols blancs representen els valors per truita i els negres per orada. Els teixits es representen amb els següents símbols: fetge ($\circ \bullet$), paquet visceral ($\diamond \blacklozenge$), múscul ($\blacktriangledown \blacktriangledown$) i carcassa ($\square \blacksquare$). Amb els cercles es vol ressaltar la diferent classificació dels teixits en funció de les correlacions estudiades.

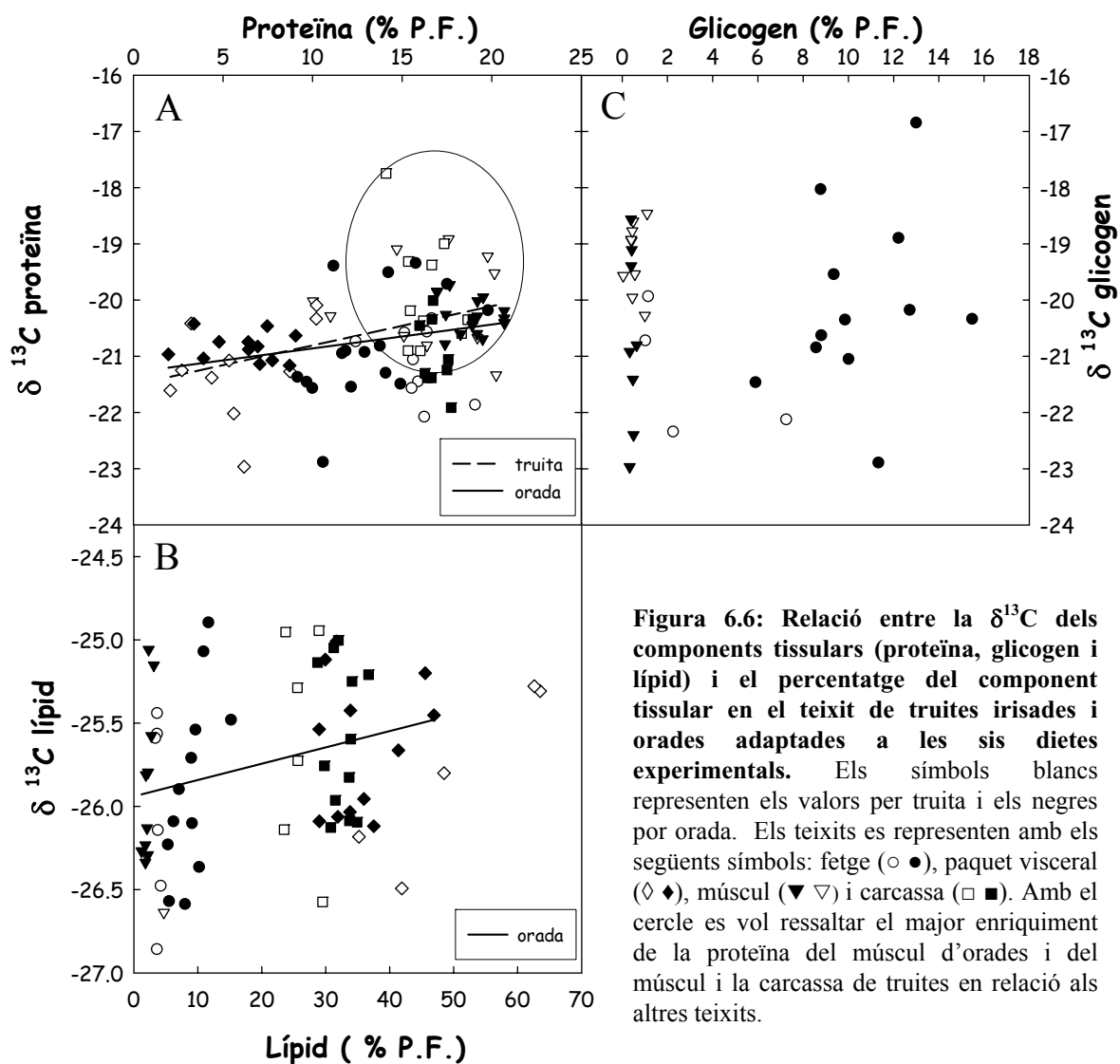


Figura 6.6: Relació entre la $\delta^{13}\text{C}$ dels components tissulars (proteïna, glicogen i lípid) i el percentatge del component tissular en el teixit de truites irisades i orades adaptades a les sis dietes experimentals. Els símbols blancs representen els valors per truita i els negres per orada. Els teixits es representen amb els següents símbols: fetge ($\circ \bullet$), paquet visceral ($\diamond \blacklozenge$), múscul ($\blacktriangledown \blacktriangledown$) i carcassa ($\square \blacksquare$). Amb el cercle es vol ressaltar el major enriquitment de la proteïna del múscul d'orades i del múscul i la carcassa de truites en relació als altres teixits.

La $\delta^{13}\text{C}$ del glicogen tissular es va mostrar molt variable en les dues espècies (Fig. 6.6.C). Els resultats de la Figura 6.6 demostren que els lípids contenen menor quantitat de ^{13}C (en un rang de -27 a -25) que les proteïnes (rang $-23/-18$) i el glicogen (rang $-23/-17$).

Discussió

Ha estat àmpliament descrit que els animals tenen un major contingut de ^{15}N que els vegetals (Minagawa i Wada, 1984; DeNiro i Epstein, 1981). S'ha demostrat que a mesura que incrementa l'escala tròfica, el ^{15}N es concentra en el consumidor degut a la discriminació isotòpica durant els processos de desaminació i transaminació (DeNiro i Epstein, 1981; Ambrose i DeNiro, 1986; Macko i col., 1986, 1987). Aquest fenomen queda també constatat en el present estudi, on les dietes, els animals en conjunt i els seus teixits, presenten un major contingut de ^{15}N a mesura que pugen en l'escala tròfica. Per tant, tal i com ja s'ha vist en altres animals (DeNiro i Epstein, 1981), l'abundància natural del ^{15}N en aquestes dues espècies varia en funció de la composició de la dieta. Això suggereix que la mesura del ^{15}N en els peixos podria ser un bon indicador de la font proteica.

A diferència del ^{15}N , percentatges majors de proteïna vegetal no van modificar el contingut de ^{13}C de les dietes. Únicament es va observar un distanciament de les dietes RT i RTglu respecte a les altres dietes. Aquest distanciament podria estar relacionat amb el fet que estaven formulades només amb ingredients C3 i no contenien blat (C4). Els vegetals C4 tenen un major contingut de ^{13}C que els C3 (O'Leary i col., 1988). Però aquesta raó no deu ser la única, ja que les dietes d'orada GSB i GSBglu estaven formulades amb els mateixos ingredients i en canvi no mostraven aquesta diferència. El fet que el ^{13}C d'una dieta provingui de diferents fonts (proteïnes, lípids i sucres), pot justificar no veure diferències en relació a la font proteica. A més a més, el ^{13}C de l'organisme no seria un bon indicador de la font proteica donada la varietat de transformacions que pot patir en l'animal (*isotopic routing*).

En les dues espècies estudiades, la distància entre la $\delta^{15}\text{N}$ de les dietes i la dels animals, fraccionament isotòpic, es trobava en el rang de 1 a 5.7 unitats δ , coincidint amb els rang descrit per a altres animals (DeNiro i Epstein, 1981; Gannes i col., 1998). El rang de fraccionament del ^{13}C era molt més petit que el del ^{15}N i coincideix amb els valors que ja havien estat publicats (DeNiro i Epstein, 1978; Fry i Sherr, 1984). És molt interessant, però, destacar que en el cas de la truita el fraccionament del ^{15}N es correlacionava negativament amb l'SGR. En el salmó atlàntic s'ha demostrat recentment que el fraccionament del ^{15}N entre la dieta i els teixits està inversament relacionat amb la taxa de creixement (Trueman i col., 2005). Més encara, el major fraccionament del ^{15}N també s'ha relacionat amb un menor creixement i una major mobilització proteica en corbs alimentats amb una dieta vegetal en comparació amb els alimentats amb una dieta animal (Hobson i Clark, 1992) i en oques en dejuni (Hobson i col., 1993), indicant que situacions d'estrès nutritiu provoquen un major fraccionament del ^{15}N . En el nostre estudi, el major fraccionament del ^{15}N del grup RTglu podria indicar una major taxa de reciclatge proteic en comparació amb els altres grups. En el cas de l'orada, la relació entre el fraccionament del ^{15}N i l'SGR no està tan clara. Ara bé, si excloem el grup PP100 de l'anàlisi aleshores en aquesta espècie també es troba aquesta relació inversa. El fet que els animals PP100 mengessin menys o la diferent resposta que pot tenir aquesta espècie als diferents ingredients vegetals pot haver influït sobre la taxa de fraccionament isotòpic.

Pinnegar i Polunin (1999) van descriure que el múscul de truita estava enriquit en ^{15}N en relació als altres teixits i ho van relacionar amb la proporció d'AAE i AANE dels teixits. Tieszen i col. (1983) i Lorrain i col. (2002) van descriure l'empobriment en ^{13}C del teixit adipós de jèrbus i de la glàndula digestiva de vieira, respectivament, en relació a altres teixits. Ambdós autors van relacionar aquest fet amb l'elevat contingut de lípids d'aquests òrgans. És molt conegut que durant el procés de síntesi de lípids hi ha una discriminació enzimàtica a favor del ^{12}C , de manera que els lípids estan empobrits en ^{13}C respecte a altres compostos (DeNiro i Epstein, 1977). En el present treball hem volgut relacionar la composició isotòpica dels teixits i dels components principals (proteïnes i lípids) amb el percentatge de proteïnes i lípids dels teixits d'animals que havien estat alimentats amb dietes diferents. Fos quina fos la dieta i per les dues espècies, quan el percentatge de proteïna en els teixits incrementava també ho feia la $\delta^{13}\text{C}$ i la $\delta^{15}\text{N}$ del teixit, mentre que a mesura que incrementava el contingut

lipídic els teixits s'empobrien en ^{13}C . També hem pogut establir que el percentatge de proteïna es relaciona amb la $\delta^{13}\text{C}$ de les proteïnes, en canvi la relació entre la $\delta^{13}\text{C}$ dels lípids i el percentatge de lípids i la $\delta^{13}\text{C}$ de glicogen i el percentatge de glicogen no està tan clara. A la llum d'aquests resultats, la composició isotòpica d'un teixit vindria determinada per les proporcions relatives dels diferents components principals del teixit. El diferent contingut en lípids i proteïnes també explicarien l'empobriment del PV+G respecte a la dieta, mentre els altres teixits, especialment múscul i carcassa, estaven enriquits respecte a la dieta.

El present treball aporta les primeres dades de composició isotòpica tissular i de fraccionament per orada. Tot i que no s'ha fet una comparativa entre espècies, el rang de fraccionament isotòpic del ^{15}N en el peix sencer mostrat per l'orada era major que el de truita. Gaston i Suthers (2004) van suggerir que el fraccionament isotòpic del ^{15}N podria ser específic d'espècie. Els nostres resultats també ho suggereixen, però caldria un estudi més concret per comprovar-ho.

És important destacar que aquest treball aporta les primeres dades de composició isotòpica del glicogen hepàtic i muscular en peixos i, com es pot observar, el glicogen presenta un nivell de ^{13}C similar al de la proteïna i superior al dels lípids. Els resultats, però, són molt variables degut probablement a que és una reserva molt làbil. La baixa capacitat de la truita de sintetitzar glicogen a partir de proteïnes (blocs experimentals I i II) juntament amb l'elevada variabilitat a nivell d'abundància natural del ^{13}C -glicogen fa necessari que per estudis d'enriquiment es disposi sempre del valor blanc de glicogen (control) per tal de determinar de forma precisa la gliconeogènesi.

En conclusió, l'abundància natural del ^{15}N i el ^{13}C en un organisme varia entre teixits degut al diferent percentatge de reserves d'aquests. En el cas del ^{15}N , la composició isotòpica de la dieta i l'ús que l'animal fa de la proteïna de la dieta (fraccionament) determinen la composició en ^{15}N de l'organisme. D'altra banda, l'efecte de la composició de ^{13}C de la dieta sobre la composició dels teixits no és tan evident com la del ^{15}N degut als canvis fisico-químics (fraccionament) de les diferents espècies químiques durant els processos de transferència del carboni a diferents components principals.

- i. S'ha establert la metodologia per fer el seguiment de la proteïna de la dieta amb ^{15}N i ^{13}C en els teixits, els seus components principals i als aminoàcids lliures de plasma i múscul. Les dosis establertes per ambdós isòtops permeten mesurar la transformació de la proteïna de la dieta en proteïna corporal de forma equivalent, i en el cas del ^{13}C -proteic, la transferència a lípids en les dues espècies i a glicogen en l'orada. En el cas del glicogen de la truita és necessari disposar de mostres blanques per determinar de forma precisa la transferència de carboni proteic de la dieta.
- ii. La capacitat de sintetitzar i emmagatzemar glicogen a partir de proteïnes, així com el seu recanvi, és major en l'orada que en la truita.
- iii. L'increment dels aminoàcids no essencials en la dieta no va millorar el creixement ni de la truita ni de l'orada. Aquest augment va provocar un increment de la gluconeogènesi i del recanvi proteic a nivell intestinal en les dues espècies i una menor deposició de proteïna en el múscul de la truita. Aquests canvis estarien més relacionats amb el contingut de soja de la dieta, especialment en truita, que amb la relació essencials/no essencials.
- iv. En les dues espècies la incorporació de marcadors procedent de la proteïna de la dieta en tots els teixits i en els seus components principals, així com el marcatge dels aminoàcids lliures de múscul i plasma demostren que la substitució d'un 50% de la farina de peix no altera l'ús de la proteïna de la dieta.
- v. Les truites irisades alimentades amb un 75% de substitució van mostrar un patró de deposició i conversió de la proteïna de la dieta en els components principals de teixits similar al de les truites alimentades amb farina de peix, però, la menor concentració d'aminoàcids lliures en plasma, la major oxidació de la proteïna de la dieta, el menor contingut de glicogen i la menor glucèmia indiquen una situació de demanda energètica, que es reflecteix en un menor creixement.

- vi. La substitució total de la farina de peix per fonts vegetals provoca en la truita irisada un major reciclatge dels aminoàcids en múscul, una disminució de la relació aminoàcids essencials/no essencials en plasma i múscul i una activació de la gluconeogènesi hepàtica, indicant una situació d'ímbalànç d'aminoàcids i de dèficit energètic. L'increment d'ingesta observat no pal·lia aquesta situació, repercutint sobre el creixement.
- vii. En l'orada, un 75% de substitució provoca una major oxidació de la proteïna de la dieta. Amb la substitució total de la farina de peix la disponibilitat dels aminoàcids de la dieta es redueix, provocant un increment del reciclatge proteic en el múscul, evidenciat per l'augment d'enriquiment isotòpic de l'alanina, l'aspartat i la prolina i per la disminució de la relació essencials/no essencials. Tots aquests factors indiquen que la substitució total de la farina de peix provoca també un ímbalànç d'aminoàcids en aquesta espècie.
- viii. La truita irisada no va digerir de forma adequada els hidrats de carboni de la dieta 100% vegetal, però sí l'orada. L'orada emmagatzema gran part dels hidrats de carboni de la dieta en glicogen hepàtic mentre la truita ho fa en menor proporció.
- ix. La substitució total de la farina de peix per fonts de proteïna vegetal indueix una menor acumulació de greix perivisceral en ambdues espècies. En el cas de l'orada, a mesura que incrementa el percentatge de substitució l'acumulació de lípids hepàtics és major.
- x. L'abundància natural del ^{15}N en aquestes dues espècies disminueix quan són alimentades amb una major quantitat d'ingredients vegetals, suggerint que la mesura del ^{15}N en els peixos pot ser un bon indicador de la font proteica. Tanmateix, l'abundància natural del ^{15}N i del ^{13}C en els teixits incrementa amb

el percentatge de proteïna del teixit i el contingut de ^{13}C disminueix a mesura que incrementa el percentatge de lípids.

- xi. En les nostres condicions experimentals el fraccionament del ^{15}N de la truita es relaciona de forma inversa amb la taxa de creixement específic. Aquesta relació és certa fins a un 75% de substitució en el cas de l'orada.

Referències

- Adams, T.S. i R.W. Sterner, 2000.** The effect of dietary nitrogen content on trophic level N-15 enrichment. *Limnology and Oceanography* 45: 601-607.
- Akiyama, D.M., 1988.** Soybean meal utilisation by marine Shrimp. *ACCS. World congress on vegetal protein utilisation in Human Food and animal Feedstuffs*. pp.127. Singapore: American Soybean Association.
- Akiyama, T., I. Oohara i T. Yamamoto, 1997.** Comparison of essential amino acid requirements with A/E ratio among fish species. *Fisheries Science* 63: 963-970.
- Alarcon, F.J., F.J. Moyano i M. Diaz, 1999.** Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* 12: 233-238.
- Albalat, A., P. Gomez-Requeni, P. Rojas, F. Medale, S. Kaushik, G.J. Vianen, G. Van den Thillart, J. Gutierrez, J. Perez-Sanchez i I. Navarro, 2005.** Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289(1): 259-265
- Aleman, M., 1973.** Algunos aspectos del metabolismo del glucógeno del mejillón (*Mytilus edulis L.*). *Tesi Doctoral*. Universitat de Barcelona.
- Ambrose, S.H. i M.J. De Niro, 1986.** The isotopic ecology of East African mammals. *Oecologia* 69: 395-406.
- Anderson, R.L. i W.J. Wolf, 1995.** Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *Journal of Nutrition* 125: 581S-588S.
- Arndt, R.E., R.W. Hardy, S.H. Sugiura, i F.M. Dong, 1999.** Effects of heat treatment and substitution level on palatability and nutritional value of soy defatted flour in feeds for Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* 180: 129-145.
- Arzel, J., R. Metailler, P. Le Gall, i J. Guillaume, 1998.** Relationship between ration size and dietary protein level varying at the expense of carbohydrate and lipid in triploid brown trout fry, *Salmo trutta*. *Aquaculture* 162: 259-268.

- Atherton, W. D. i A. Aitken, 1970.** Growth, Nitrogen Metabolism and Fat Metabolism in *Salmo gairdneri*, Rich. 4. *Comparative Biochemistry and Physiology* 36: 719
- Balmir, F., R. Staack, E. Jeffrey, M.D.B. Jimenez, L. Wang, i S.M. Potter, 1996.** An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *Journal of Nutrition* 126: 3046-3053
- Ballestrazzi, R., D. Lanari, E. Dagaro, i A. Mion, 1994.** The Effect of Dietary-Protein Level and Source on Growth, Body-Composition, Total Ammonia and Reactive Phosphate Excretion of Growing Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*).2. *Aquaculture* 127: 197-206.
- Barroso, J. B., L. Garcia-Salguero, J. Peragon, M. De la Higuera, i J. A. Lupianez, 1994.** The Influence of Dietary-Protein on the Kinetics of NADPH Production Systems in Various Tissues of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).12. *Aquaculture* 124: 47-59.
- Batty, R. S. i C. S. Wardle. 1979.** Restoration of glycogen from lactic acid in the anaerobic swimming muscle of plaice. *Journal of Fish Biology* 15: 509-519.
- Bell, G. R., 1968.** Distribution of Transaminases (Aminotransferases) in Tissues of Pacific Salmon (*Oncorhynchus*) with Emphasis on Properties and Diagnostic Use of Glutamic-Oxalacetic Transaminase. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 25: 1247.
- Berge G.E., Lied E. i Espe E., 1994.** Absorption and incorporation of dietary free and protein bound (U-C-14)-lysine in Atlantic Cod (*Gadus morua*). *Comparative Biochemistry and Physiology A- Physiology* 109: 681-688.
- Bergot, F., 1979.** Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comparative Biochemistry and Physiology* 64: 543-547.
- Bergot, F. i J. Breque, 1983.** Digestibility of Starch by Rainbow trout - Effects of the Physical State of Starch and of the Intake Level. *Aquaculture* 34: 203-212.
- Blasco J., F. Fernández i J. Gutiérrez, 1991.** The effects of starvation and refeeding on plasma amino acid levels in carp, *Cyprinus carpio* L., 1758. *Journal of Fish Biology* 38: 587-598.

- Boujard, T, 1999.** Comportement alimentaire et régulation de l'ingestion. *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*, pp 43-50. Editat per Guillaume J., Kaushik S.J., Bergot P., Metailler R. Edicions INRA, França
- Brauge, C., F. Medale i G. Corraze, 1994.** Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123: 109-120.
- Brauge, C., G. Corraze, i F. Medale, 1995.** Effect of Dietary Levels of Lipid and Carbohydrate on Growth-Performance, Body-Composition, Nitrogen-Excretion and Plasma-Glucose Levels in Rainbow trout Reared at 8-Degrees-C Or 18-Degrees-C. *Reproduction Nutrition Development* 35: 277-290.
- Bureau, D.P., A.M. Harris, i C.Y. Cho, 1998.** The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 161: 27-43.
- Burel, C., T. Boujard, S. J. Kaushik, G. Boeuf, S. Van der Geyten, K. A. Mol, E. R. Kuhn, A. Quinsac, M. Krouti, i D. Ribailier, 2000a.** Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 188: 363-382.
- Burel, C., T. Boujard, F. Tulli, i S. J. Kaushik, 2000b.** Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188: 285-298.
- Caballero, M., J. López-Calero, J. Socorro, F.J. Roo, M.S. Izquierdo i A.J. Fernández, 1999.** Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179: 277-290.
- Capilla, E., F. Medale, I. Navarro, S. Panserat, C. Vachot, S. Kaushik, i J. Gutierrez, 2003.** Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regulatory Peptides* 110: 123-132.
- Carter, C.G., D.F. Houlihan, B. Buchanan, i A.I. Mitchell, 1993.** Protein-Nitrogen Flux and Protein-Growth Efficiency of Individual Atlantic Salmon (*Salmo salar* L). *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 305-315.

- Carter, C.G., S.F. Owen, Z.Y. He, P.W. Watt, C. Scrimgeour, D.F. Houlihan, i M.J. Rennie, 1994.** Determination of Protein-Synthesis in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Using A Stable-Isotope. *Journal of Experimental Biology* 189: 279-284.
- Carter, C.G., Z.Y. He, D.F. Houlihan, I.D. McCarthy, i I. Davidson, 1995.** Effect of feeding on tissue free amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry* 14: 153-164.
- Carter, C.G., D.F. Houlihan, i S.F. Owen, 1998.** Protein synthesis, nitrogen excretion and long-term growth of juvenile *Pleuronectes flesus*. *Journal of Fish Biology* 53: 272-284.
- Casey, C.A., D.F. Perlman, J.E. Vorhaben, i J.W. Campbell. 1983.** Hepatic Ammoniogenesis in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*.5. *Molecular Physiology* 3: 107-126.
- Cho, C.Y. i S.J. Kaushik, 1985.** Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. *Nutrition and Feeding in Fish*, pp. 95-117. Editat per C.B. Cowey, A.M. Mackie i J. Bell. Academic Press, Londres.
- Cho, C.Y. i S.J. Kaushik, 1990.** Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.* 61: 132-172.
- Choo P.S., T.K. Smith, C.Y. Cho i H.W. Ferguson, 1991.** Dietary excesses of leucine influences growth and body-composition of Rainbow trout. *Journal of Nutrition* 121(12): 1932-1939.
- Coloso, R.M., L.V. Benitez, i L.B. Tiro, 1988.** The Effect of Dietary Protein-Energy Levels on Growth and Metabolism of Milkfish (*Chanos-Chanos forsskal*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 89: 11-17.
- Company, R., J. A. Calduch-Giner, J. Perez-Sanchez, i S. J. Kaushik, 1999.** Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 12: 23-30.

- Conceição, L.E.C., H. Grasdalen, i M.T. Dinis, 2003.** A new method to estimate the relative bioavailability of individual amino acids in fish larvae using C-13-NMR spectroscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 134: 103-109.
- Cowey, C.B., 1975.** Aspects of Protein Utilization by Fish. 77. *Proceedings of the Nutrition Society* 34: 57-63.
- Cowey, C.B., M. Delahiguera, i J. W. Adron, 1977a.** Effect of Dietary Composition and of Insulin on Gluconeogenesis in Rainbow-Trout (*Salmo gairdneri*). 65. *British Journal of Nutrition* 38: 385-395.
- Cowey, C.B., D. Knox, M.J. Walton, i J.W. Adron, 1977b.** Regulation of Gluconeogenesis by Diet and Insulin in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) 66. *British Journal of Nutrition* 38: 463-470.
- Cowey, C.B., 1979.** Protein and amino acid requirements of finfish. *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Vol. I, pp. 3-16. Editat per Halver J.E. i Tiews K., Heeneman, Berlin.
- Cowey, C.B. i J.R. Sargent, 1979.** Nutrition. *Fish Physiology. Bioenergetics and growth* (8), pp 1-77. Editat per W.S. Hoar, D.J. Randall i J.R. Brett, Academic Press, New York and London.
- Cowey, C.B. i J.P. Stevenson, 1979.** Advances in Fish Nutrition. *Span* 22: 84-87.
- Cowey, C.B. i P. Luquet, 1983.** Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowances. *Protein Metabolism and Nutrition*, pp. 365-384. Editat per Arnal, M., Pion, R, i Bonin D. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
- Cowey, C.B. i M.J. Walton, 1988.** Studies on the Uptake of (C-14) Amino-Acids Derived from Both Dietary (C-14) Protein and Dietary (C-14) Amino-Acids by Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 33: 293-305.
- Cowey, C.B. i M.J. Walton, 1989.** Intermediary metabolism. *Fish Nutrition*, pp. 259-329. Editat per Halver E. New York: Academic.
- Cowey, C.B. 1994.** Amino-Acid-Requirements of Fish - A Critical-Appraisal of Present Values. *Aquaculture* 124: 1-11.

- Dabrowski ,K., P. Poczyczynski, G. Kock i B. Berger, 1989.** Effect of Partially Or Totally Replacing Fish-Meal Protein by Soybean-Meal Protein on Growth, Food Utilization and Proteolytic-Enzyme Activities in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - New In vivo Test for Exocrine Pancreatic-Secretion. *Aquaculture* 77: 29-49.
- Dabrowski, K., K.J. Lee, i J. Rinchar, 2003.** The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *Journal of Nutrition* 133: 4225-4229.
- Davies, S.J. i P.C. Morris, 1997.** Influence of multiple amino acid supplementation on the performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed soya based diets. *Aquaculture Research* 28: 65-74.
- De la Higuera, M. i P. Cárdenas, 1985.** Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U¹⁴C)-glutamate in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81 A: 391-395.
- De la Higuera, M., Garzon A., M. C. Hidalgo, J. Peragon, G. Cardenete, i J. A. Lupianez, 1997.** Influence of temperature and dietary protein supplementation either with free or coated lysine on the fractional protein-turnover rates in the white muscle of carp. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 85-95.
- De la Higuera, M., H. Akharbach, M.C. Hidalgo, J. Peragon, J.A. Lupianez, i M. Garcia-Gallego, 1999.** Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. *Aquaculture* 179: 203-216.
- De Niro, M.J. i S. Epstein, 1977.** Mechanism of Carbon Isotope Fractionation Associated with Lipid-Synthesis. *Science* 197: 261-263.
- De Niro, M.J. i S. Epstein, 1978.** Influence of Diet on Distribution of Carbon Isotopes in Animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42: 495-506.
- De Niro, M.J. i S. Epstein, 1981.** Influence of Diet on the Distribution of Nitrogen Isotopes in Animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45: 341-351.
- Dias, J., J. Arzel, P. Aguirre, G. Corraze, i S. Kaushik, 2003.** Growth and hepatic acetyl coenzyme-A carboxylase activity are affected by dietary protein level in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 135: 183-196.

- Dias, J., M. J. Alvarez, J. Arzel, G. Corraze, A. Diez, J. M. Bautista, i S. J. Kaushik, 2005.** Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 142: 19-31.
- Early, R.J., J.R. Thompson, G.W. Sedgwick, J.M. Kelly, i R.J. Christopherson, 1987.** Capillary Gas-Chromatographic Analysis of Amino-Acids in Blood and Protein Hydrolysates As Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 416: 15-23.
- Espe M. i E. Lied, 1994.** Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixture of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis?. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 107: 249-254.
- Farhangi, M. i C.G. Carter, 2001.** Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Research* 32: 329-340.
- Farquhar, G.D., J.R. Ehleringer, i K.T. Hubick, 1989.** Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.
- Fauconneau, B., 1985.** Protein synthesis and protein deposition in fish. *Nutrition and Feeding in Fish*, pp. 17-45. Editat per C.B. Cowey, A.M. Mackie i J.G. Bell. London Academic Press.
- Figuroa, R.I., R. Rodriguez-Sabaris, M. Aldegunde, i J.L. Soengas, 2000.** Effects of food deprivation on 24 h-changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 57: 631-646.
- Folch, J., M. Lees, i G.H.S. Stanley, 1957.** A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Food and Agriculture Organization, 2004.** Review of the state of world aquaculture.

- Foster, R.P. i L. Goldstein, 1969.** Formation of excretory products. *Fish Physiology*, Vol. I, pp. 313-50. Editat per W.S. Hoar i D.J. Randall. Academic Press, London.
- Foster, G.D. i T.W. Moon, 1991.** Hypometabolism with Fasting in the Yellow Perch (*Perca-Flavescens*) - A Study of Enzymes, Hepatocyte Metabolism, and Tissue Size.1. *Physiological Zoology* 64: 259-275.
- Fournier, V., M.F. Guillo-Coustans, R. Metailler, C. Vachot, M.J. Guedes, F. Tulli, A. Oliva-Teles, E. Tibaldi, i S.J. Kaushik, 2002.** Protein and arginine requirements for maintenance and nitrogen gain in four teleosts. *British Journal of Nutrition* 87: 459-469.
- Fraga, F., 1956.** Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona. *Investigaciones Pesqueras* 3: 69.
- Francis, G., H.P.S. Makkar, i K. Becker, 2001.** Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197-227.
- French, C.J., T.P. Mommsen, i P.W. Hochachka, 1981.** Amino-Acid Utilization in Isolated Hepatocytes from Rainbow trout.1. *European Journal of Biochemistry* 113: 311-317.
- French, C.J., P.W. Hochachka, i T.P. Mommsen, 1983.** Metabolic Organization of Liver During Spawning Migration of Sockeye Salmon.1. *American Journal of Physiology* 245: R827-R830.
- Friedman, M., 1996.** Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 44: 6-29.
- Fromm, P.O., 1963.** Studies on Renal and Extra-Renal Excretion in A Freshwater Teleost, *Salmo gairdneri*.1. *Comparative Biochemistry and Physiology* 10: 121.
- Fry, B. i E.B. Sherr, 1984.** Delta-C-13 Measurements As Indicators of Carbon Flow in Marine and Fresh-Water Ecosystems. *Contributions in Marine Science* 27: 13-47.
- Furuichi, M. i Y. Yone, 1981.** The Utilization of Carbohydrate by Fishes .3. Change of Blood-Sugar and Plasma-Insulin Levels of Fishes in Glucose-Tolerance Test. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47: 761-764.

- Gannes, L.Z., C.M. del Rio, i P. Koch, 1998.** Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology A -Molecular & Integrative Physiology* 119: 725-737.
- Gaye-Siessegger, J., U. Focken, H. Abel, i K. Becker, 2004.** Individual protein balance strongly influences delta N-15 and delta C-13 values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* 91: 90-93.
- Garzon A., 1995.** Influencia de la encapsulación de la lisina sobre la utilización nutritiva de la proteína de gluten y recambio proteico tisular en la trucha (*O. mykiss*) y en la carpa (*C. carpio*). *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- Gaston, T.F. i L.M. Suthers, 2004.** Spatial variation in delta C-13 and delta N-15 of liver, muscle and bone in a rocky reef planktivorous fish: the relative contribution of sewage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 304: 17-33.
- Good B.C.A., H. Cramer i M. Somogy, 1933.** The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.*, 100: 491.
- Gomes, E.F., G. Corraze i S. Kaushik, 1993.** Effects of Dietary Incorporation of A Coextruded Plant Protein (Rapeseed and Peas) on Growth, Nutrient Utilization and Muscle Fatty-Acid Composition of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 113: 339-353
- Gomes, E.F., P. Rema, i S.J. Kaushik, 1995.** Replacement of Fish-Meal by Plant-Proteins in the Diet of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - Digestibility and Growth-Performance. *Aquaculture* 130: 177-186.
- Gomez-Requeni, P., M.Mingarro, S. Kirchner, J.A. Calduch-Giner, F. Medale, G. Corraze, S. Panserat, S.A.M. Martin, D.F. Houlihan, S.J. Kaushik i J. Perez-Sanchez, 2003.** Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220: 749-767.
- Gomez-Requeni, P., M. Mingarro, J.A. Calduch-Giner, F. Medale, S.A.M. Martin, D.F. Houlihan, S. Kaushik i J. Perez-Sanchez, 2004.** Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish

meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232: 493-510.

Gomez-Requeni, P., J. Caldach-Giner, S.V.R. de Celis, F. Medale, S.J. Kaushik, i J. Perez-Sanchez, 2005. Regulation of the somatotropic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 94: 353-361.

Green, J.A., R.W. Hardy, i E.L. Brannon, 2002. The optimum dietary essential: nonessential amino acid ratio for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which maximizes nitrogen retention and minimizes nitrogen excretion. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 109-115.

Hayashi, S. i Z. Ooshiro, 1977. Gluconeogenesis in perfused eel liver. Effect of starvation, aminooxyacetate, D-malate and hormones. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 26: 89-95.

Hayashi, S. i Z. Ooshiro, 1979. Gluconeogenesis in Isolated Liver-Cells of the Eel, *Anguilla japonica*.13. *Journal of Comparative Physiology* 132: 343-350.

Hayes, J.M., 1993. Factors Controlling C-13 Contents of Sedimentary Organic-Compounds - Principles and Evidence. *Marine Geology* 113: 111-125.

Hemre, G.I., O. Lie, E. Lied, i G. Lambertsen, 1989. Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. *Aquaculture* 80: 261-270.

Hemre, G.I., i T. Storebakken, 2000. Tissue and organ distribution of C-14-activity in dextrin-adapted Atlantic salmon after oral administration of radiolabelled C-14-(1)-glucose. *Aquaculture Nutrition* 6(4): 229-234.

Hendriks J.D. i G.S Baileg., 1989. Adventitious toxins. *Fish Nutrition* 605-651.

Herzberg, G.R. i M. Rogerson, 1984. Hepatic Lipogenesis in Young-Rats Given Proteins of Different Quality 1. *British Journal of Nutrition* 52: 131-137.

Higgs, D.A., B.S. Dosanjh, A.F. Prendegast, R.M. Beames, R.W. Hardy, W. Riley i G. Deacon, 1995. Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*, pp130-156. Editat per D. Sessa I C. Lim. AOCS monograph, AOCS Press, Champaign, FL.

- Hoefs J., 1980.** Stable Isotope Geochemistry. Berlin: Springer-Verlag.
- Hobson, K.A. i R.G. Clark, 1992.** Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes .2. Factors Influencing Diet-Tissue Fractionation. *Condor* 94: 189-197.
- Hobson, K.A., R.T. Alisauskas, i R.G. Clark, 1993.** Stable-Nitrogen Isotope Enrichment in Avian-Tissues Due to Fasting and Nutritional Stress - Implications for Isotopic Analyses of Diet. *Condor* 95: 388-394.
- Houlihan, D.F., D.N. McMillan i P. Laurent, 1986.** Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in Rainbow trout: effects of body size. *Physiol. Zool.*, 59(4): 482-493.
- Houlihan, D.F., i P. Laurent, 1987.** Effects of exercise training on he performance, growth and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Scie.* 44: 1614, 1621.
- Houlihan, D.F., S. J.Hall, i C. Gray, 1989.** Effects of Ration on Protein-Turnover in Cod. 2. *Aquaculture* 79: 103-110.
- Houlihan, D.F., 1991.** Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. *Advances in comparative and environmental physiology* 7: 1-43.
- Houlihan, D.F., E. Mathers i A. Foster, 1993.** Biochemical correlates of growth rate in fish. *Fish Ecophysiology*, pp 45-71. Editat per J.C. Rankin I F.B. Jensen. Chapman i Hall, Londres.
- Houlihan, D.F, G.C. Carter i I.D. McCarthy, 1995.** Protein synthesis in fish. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* Vol. 4 pp. 191-219. Editat per P. Hochachka i P. Mommsen, Elsevier Science, Amsterdam.
- Ibarz A., J. Blasco, M. Beltran, M.A. Gallardo, J. Sánchez, R. Sala i J. Fernández-Borràs, 2005.** Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249: 477-486.
- Ibarz A., M. Beltran, J. Fernández-Borràs, M.A. Gallardo, J. Sánchez, i J. Blasco, 2006.** Alteration in lipid metabolism and use of energy depots of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture*, in Press.

- Infante O., 1974.** Untersuchungen über die stickstoffexkretion junger karpfen (Cyprinus carpio) im hunger und bei Fütterung. *Arch. Hydrobiol* suppl.47: 239-281.
- Iritani, N., K. Nagashima, H. Fukuda, A. Katsurada, i T. Tanaka, 1986.** Effects of Dietary Proteins on Lipogenic Enzymes in Rat-Liver.4. *Journal of Nutrition* 116: 190-197.
- Iritani, N., H. Hosomi, H. Fukuda, K. Tada, i H. Ikeda, 1996.** Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats 4. *Journal of Nutrition* 126: 380-388
- Johnston, I.A. i T.W. Moon, 1979.** Glycolitic and gluconeogenic enzyme activities in the skeletal muscle and liver of a teleost fish (*Pleuronectes platessa*). *Trans. Biochem. Soc.* 7: 661-663.
- Jorgensen J.B. i Mustafa T, 1980.** The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in the flounder (*Platichthys flesus L.*).II. High energy compound and the role of glycolitic and gluconeogenic enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 67: 249-256.
- Jürss K. i Bastrop R., 1995.** Amino acid metabolism in fish. *Biochemistry and molecular biology of fishes* Vol.4 pp. 159-189. Editat per P.W. Hochakha i T.P. Mommsen, Elsevier Science, Amsterdam.
- Kaushik, S.J. i P. Luquet. 1980.** Influence of Bacterial Protein Incorporation and of Sulfur Amino-Acid Supplementation to Such Diets on Growth of Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson. *Aquaculture* 19: 163-175.
- Kaushik, S.J. i A.D. Oliva-Teles, 1985.** Effect of Digestible Energy on Nitrogen and Energy-Balance in Rainbow trout. *Aquaculture* 50: 89-101.
- Kaushik, S.J, 1990.** Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. *Mediterranean Aquaculture* pp.125-138. Editat per R. Flos, L. Tort i P. Torres. Ellis Horwood, UK.
- Kaushik, S.J., J.P. Cravedi, J P. Lalles, J. Sumpter, B. Fauconneau, i M. Laroche, 1995.** Partial Or Total Replacement of Fish-Meal by Soybean Protein on Growth, Protein-Utilization, Potential Estrogenic Or Antigenic Effects,

- Cholesterolemia and Flesh Quality in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133: 257-274.
- Kaushik, S.J., 1997.** Recent developments in the nutrition and feeding of marine finfish of interest to the Mediterranean. *INVE Conference*.
- Kaushik, S.J. 1998,** Whole body amino acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquatic Living Resources* 11: 355-358.
- Kayashita, J., I. Shimaoka, M. Nakajoh i N. Kato, 1996.** Feeding buckwheat protein extract reduces hepatic triglyceride concentration, adipose tissue weight, and hepatic lipogenesis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 7: 555-559.
- Kentouri, M., P. Divanach, I. Geurden i M. Anthouard, 1995.** Evidence of adaptation behaviour in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in relation to diet composition in a self feeding condition. *Ichthyophysiological Acta* 18: 125-143.
- Kim, K.I., Kayes, T.B. i Amudson, C.H., 1991.** Purified diet development and re-evaluation of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 96: 57 – 67.
- Kim, J.D. i S.J. Kaushik, 1992.** Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 106: 161-169.
- Kim, K.I., T.W. Grimshaw, T.B. Kayes, i C.H. Amundson, 1992a.** Effect of Fasting Or Feeding Diets Containing Different Levels of Protein Or Amino-Acids on the Activities of the Liver Amino Acid-Degrading Enzymes and Amino-Acid Oxidation in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 107: 89-105.
- Kim, K.I., T.B. Kayes, i C.H. Amundson, 1992b.** Requirements for Lysine and Arginine by Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 106:333-344.
- Kim, K.I., T.B. Kayes, i C.H. Amundson, 1992c.** Requirements for Sulfur Amino-Acids and Utilization of D-Methionine by Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 101: 95-103.

- Kim, K.I., 1993.** Requirement for Phenylalanine and Replacement Value of Tyrosine for Phenylalanine in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*).4. *Aquaculture* 113: 243-250.
- Kim, K.I., 1997.** Re-evaluation of protein and amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 151: 3-7.
- Kirchner, S., S. Kaushik, i S. Panserat, 2003.** Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 134: 337-347.
- Kissil, G.W., I. Lupatsch, D.A. Higgs, i R.W. Hardy, 2000.** Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L). *Aquaculture Research* 31: 595-601.
- Knox, D., M.J. Walton, i C.B. Cowev, 1980.** Distribution of Enzymes of Glycolysis and Gluconeogenesis in Fish-Tissues. *Marine Biology* 56: 7-10.
- Koletzko, B., H. Demmelmair, W. Hartl, A. Kindermann, S. Koletzko, T. Sauerwald, i P. Szitanyi, 1998.** The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Human Development* 53: S77-S97.
- Kriengsinyos, W., L.J. Wykes, R.O. Ball, i P.B. Pencharz, 2002.** Oral and intravenous tracer Protocols of the indicator amino acid oxidation method provide the same estimate of the lysine requirement in healthy men. *Journal of Nutrition* 132: 2251-2257.
- Krogdahl, A., T.B. Lea, i J.L. Olli, 1994.** Soybean Proteinase-Inhibitors Affect Intestinal Trypsin Activities and Amino-Acid Digestibilities in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 107: 215-219.
- Krogdahl, A., G.I. Hemre i T.P. Mommsen, 2005.** Carbohydrates in Fish Nutrition: digestion and absorption in post-larval stages. *Aquaculture Nutrition* 11(2): 103-122.

- Krueger, H.W. i C.H. Sullivan, 1984.** Models for Carbon Isotope Fractionation Between Diet and Bone. *Acs Symposium Series* 258: 205-220.
- Laidley, C.W. i J.F. Leatherland, 1988.** Circadian Studies of Plasma-Cortisol, Thyroid-Hormone, Protein, Glucose and Ion Concentration, Liver-Glycogen Concentration and Liver and Spleen Weight in Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 89: 495-502.
- Lajtha, K. i R.H. Michener, 1994.** *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Langar, H., J. Guillaume, R. Metailler, i B. Fauconneau, 1993.** Augmentation of Protein-Synthesis and Degradation by Poor Dietary Amino-Acid Balance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Nutrition* 123: 1754-1761.
- Langar, H. i J. Guillaume, 1994.** Effect of Feeding Pattern and Dietary-Protein Source on Protein-Synthesis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 108: 461-466.
- Liener, I.E., 1994.** Implications of Antinutritional Components in Soybean Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 31-67.
- Lin, H., D.R. Romsos, P.I. Tack i G.A. Leveille, 1978.** Determination of glucose utilization in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum) with (6-³H)- and (U-¹⁴C)-glucose. *Comparative Biochemistry & Physiology* 59A: 189-191.
- Lorrain, A., Y.M. Paulet, L. Chauvaud, N. Savoye, A. Donval, i C. Saout, 2002.** Differential delta C-13 and delta N-15 signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 275: 47-61.
- Lovell, R.T., 1990.** Use of soybean products in diets for aquaculture species: revised. *ASA (American Soybean Association) Tech. Bull.* AQ21-90 6/7, Singapore, 16
- Lowenste J.M., 1972.** Ammonia Production in Muscle and Other Tissues - Purine Nucleotide Cycle. 4. *Physiological Reviews* 52: 382.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, i R.J. Randall, 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

Lupiañez, J.A., M.J. Sanchezlozano, L. Garciarejon, i M. De la Higuera, 1989.

Long-Term Effect of A High-Protein Non-Carbohydrate Diet on the Primary Liver and Kidney Metabolism in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*).2. *Aquaculture* 79: 91-101.

Luquet, P. i J.J. Sabaut, 1974. Nutrition azotée et croissance chez la daurade et la truite. *Colloque sur l'aquaculture, Actes del Colloques*. INRA.

Lyndon, A.R., D.F. Houlihan, i S.J. Hall. 1992. The Effect of Short-Term Fasting and A Single Meal on Protein-Synthesis and Oxygen-Consumption in Cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology B- Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 162: 209-215.

Lyndon, A.R., I. Davidson, i D.F. Houlihan, 1993. Changes in Tissue and Plasma-Free Amino-Acid-Concentrations After Feeding in Atlantic Cod. *Fish Physiology and Biochemistry* 10: 365-375.

Mackie, A.M. i A.I. Mitchell, 1985. Identification of gustatory feeding stimulants for fish-applications in aquaculture. *Nutrition and Feeding in Fish*, pp. 177-189. Editat per C.B. Cowey, A.M. Mackie i J.G.Bell. Academic Press, London.

Macko, S.A., M.L.F Estep, M.H. Engel, i P.E. Hare, 1986. Kinetic Fractionation of Stable Nitrogen Isotopes During Amino-Acid Transamination. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50: 2143-2146

Macko, S.A., M.L. Fogel, P.E. Hare, i T.C. Hoering, 1987. Isotopic Fractionation of Nitrogen and Carbon in the Synthesis of Amino-Acids by Microorganisms. *Chemical Geology* 65: 79-92.

Macrae, R., R.K. Robinson i M.J. Sadler, 1993. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Academic Press, London.

Mambrini, M. i S.J. Kaushik, 1994. Partial Replacement of Dietary-Protein Nitrogen with Dispensable Amino-Acids in Diets of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 109: 469-477.

Mambrini, M., A. J. Roem, J. P. Cravedi, J. P. Lalles, i S. J. Kaushik, 1999. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient

- utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal Science* 77: 2990-2999.
- Mambrini M. i J. Guillaume, 1999.** Nutrition proteique. *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*, pp 113-146. Editat per Guillaume J., S.J. Kaushik, P. Bergot i R. Metailler. Edicions INRA, França
- Mannerström, M., A. Soivio, i A. Salama, 2001.** Intestinal absorption and tissue distribution of glucose and isoleucine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 7: 229-235.
- Marcouli, P.A., M.N. Alexis, A. Andriopoulou, J. i Iliopoulou-Georgudaki, 2004.** Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition* 10(5): 335-343.
- Marino, B.D. i M.B. McElroy, 1991.** Isotopic composition of atmospheric CO₂ inferred from carbon in C4 plant cellulose. *Nature* 349: 127-131.
- Martin, S. A. M., O. Vilhelmsson, F. Medale, P. Watt, S. Kaushik, i D. F. Houlihan, 2003.** Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1651: 17-29.
- Mathers, E. M., D. F. Houlihan, I. D. McCarthy, i L. J. Burren, 1993.** Rates of Growth and Protein-Synthesis Correlated with Nucleic-Acid Content in Fry of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* - Effects of Age and Temperature. *Journal of Fish Biology* 43: 245-263.
- Mazeaud F., 1973.** Recherches sur la régulation des acides gras libres plasmatiques et de la glycémie chez les poissons. *Ph. D. Thesis*.
- McCarthy, I. D., C.G. Carter i D. F. Houlihan, 1992.** The effect of feeding hierarchy on individual variability in daily feeding of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* 41: 257-263.
- McCarthy, I. D., D.F. Houlihan, i C.G. Carter, 1994.** Individual Variation in Protein-Turnover and Growth Efficiency in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 257: 141-147.

- McFarlan, I.G. i C. Vonholt, 1969.** Metabolism of Amino Acids in Protein-Calorie-Deficient Rats. *Biochemical Journal* 111: 557.
- Medale, F., P. Aguirre i S. Kaushik, 1991.** Utilization of dietary carbohydrates by rainbow trout at two water temperatures. 12th *Symposium on energy metabolism of farm animals*, EAAP, Zurich.
- Medale, F., T. Boujard, F. Vallee, D. Blanc, M. Mambrini, A. Roem, i S.J. Kaushik, 1998.** Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources* 11: 239-246.
- Mente, E., P. Coutteau, D. Houlihan, I. Davidson, i P. Sorgeloos. 2002.** Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology* 205: 3107-3122.
- Mente, E., S. Deguara, M. B. Santos, i D. Houlihan. 2003.** White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 225: 133-147.
- Mertz E.T., 1972.** The protein and amino acids needs. *Fish Nutrition* 106-144.
- Meton, I., D. Mediavilla, A. Caseras, E. Canto, F. Fernandez, i I.V. Baanante, 1999.** Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* 82: 223-232.
- Meton, I., F. Fernandez, i I.V. Baanante, 2003.** Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225: 99-107.
- Meyer-Burgdorff, K. i H. Rosenow, 1995a.** Protein turnover and energy metabolism in growing carp. 1. Method of determining N-turnover using a 15N-labelled casein. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 73: 113-122.
- Meyer-Burgdorff, K. i H. Rosenow. 1995b.** Protein turnover and energy metabolism in growing carp. 2. Influence of feeding level and protein:energy ratio. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 73: 123-133.

- Minagawa, M. i E. Wada, 1984.** Stepwise Enrichment of N-15 Along Food-Chains - Further Evidence and the Relation Between Delta-N-15 and Animal Age. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 1135-1140.
- Mommsen, T.P., C.J. French, i P.W. Hochachka, 1980.** Sites and Patterns of Protein and Amino-Acid Utilization During the Spawning Migration of Salmon. 1. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 58: 1785-1799.
- Mommsen, T.P., P.J. Walsh, i T. W. Moon, 1985.** Gluconeogenesis in Hepatocytes and Kidney of Atlantic Salmon. 2. *Molecular Physiology* 8: 89-99.
- Moon, T.W. i I.A. Johnston, 1980.** Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of plaice. *Journal of Comparative Physiology* 136B: 31-38.
- Moon, T.W. i I.A. Johnston, 1981.** Amino-Acid-Transport and Interconversions in Tissues of Freshly Caught and Food-Deprived Plaice, *Pleuronectes platessa* L. 1. *Journal of Fish Biology* 19: 653-663.
- Moon, T.W., 1983.** Metabolic Reserves and Enzyme-Activities with Food-Deprivation in Immature American Eels, *Anguilla-Rostrata* (Lesueur).4. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 61: 802-811.
- Moon, T.W., G.D. Foster, i E.M. Plisetskaya, 1989.** Changes in Peptide-Hormones and Liver-Enzymes in the Rainbow trout Deprived of Food for 6 Weeks. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 67: 2189-2193.
- Moon, T.W. i D.M. Gatlin, 1989.** Amino acid nutrition of the red drum (*Sciaenops ocellatus*). Determination of limiting amino acids test diet. *Proc. Third Int. Symp. pp. 201-208. Feeding Nutrition in Fish.* Toba, Japan.
- Moon, T.W., 2001.** Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry & Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology* 129: 243-249.
- Murai, T., H. Ogata, T. Takeuchi, T. Watanabe, i T. Nose, 1984.** Composition of Free Amino-Acid in Excretion of Carp Fed Amino-Acid Diets and Casein-Gelatin Diets. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50: 1957.

- Murai, T., H. Ogata, P. Kosutarak, i S. Arai, 1986.** Effects of Amino-Acid Supplementation and Methanol Treatment on Utilization of Soy Flour by Fingerling Carp. *Aquaculture* 56: 197-206.
- Murai, T., H. Ogata, Y. Hirasawa, T. Akiyama, i T. Nose, 1987.** Portal Absorption and Hepatic-Uptake of Amino-Acids in Rainbow trout Force-Fed Complete Diets Containing Casein Or Crystalline Amino-Acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 1847-1859.
- Murai T.,** Protein nutrition of Rainbow trout. *Aquaculture* 100 (1-3): 191-207.
- Nagai, M. i S. Ikeda, 1972.** Carbohydrate Metabolism in Fish .3. Effect of Dietary Composition on Metabolism of Glucose-U-C-14 and Glutamate-U-C-14 in Carp 2. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38: 137.
- Nagai, M. i S. Ikeda, 1973.** Carbohydrate Metabolism in Fish. 4. Effect of Dietary Composition on Metabolism of Acetate-U-C-14 and L-Alanine-U-C-14 in Carp 1. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 39: 633-643.
- Narayansingh, T. i J.G. Eales, 1975.** Effects of Thyroid-Hormones on Invivo 1-C-14 L-Leucine Incorporation Into Plasma and Tissue Protein of Brook Trout (*Salvelinus-Fontinalis*) and Rainbow Trout (*Salmo-Gairdneri*).1. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 52: 399-405.
- Nengas I, M.N. Alexis i S.J. Davies, 1996.** Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivates in diets for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research* 27: 147-156.
- Nose, T., 1972.** Changes in the pattern of free plasma amino acid in rainbow trout after feeding. *Bull. Freshw. Fish. Res. Lab.* 22: 137-144.
- National Research Council, 1993.** Nutrient Requirements of fish. *National Academic of Sciences*, USA.
- Ogata, H., 1986.** Correlations of Essential Amino-Acid Patterns Between the Dietary-Protein and the Blood, Hepatopancreas, Or Skeletal-Muscle in Carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52: 307-312.
- Ogino, C., 1980.** Protein Nutrition in Fish .9. Requirements of Carp and Rainbow-Trout for Essential Amino-Acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46: 171-174.

- O'Leary, M.H., 1988.** Carbon Isotopes in Photosynthesis. *Bioscience* 38: 328-336.
- Oliva-Teles, A., A.J. Gouveia, E. Gomes, i P. Rema, 1994.** The Effect of Different Processing Treatments on Soybean-Meal Utilization by Rainbow-Trout, *Oncorhynchus-Mykiss*. *Aquaculture* 124: 343-349.
- Oliva-Teles, A., J.P. Pereira, A .Gouveia, i E. Gomes, 1998.** Utilisation of diets supplemented with microbial phytase by sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquatic Living Resources* 11: 255-259.
- Opstvedt, J., A. Aksnes, B. Hope, i I.H. Pike, 2003.** Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture* 221: 365-379.
- Owen, S.F., I.D. Mc Carthy, P.W. Watt, V. Ladero, J.A. Sanchez, D.F. Houlihan, i M.J .Rennie, 1999.** In vivo rates of protein synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts determined using a stable isotope flooding dose technique. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 87-94.
- Page, J.W. i J.W. Andrews, 1973.** Interactions of Dietary Levels of Protein and Energy on Channel catfish (*Ictalurus-Punctatus*). *Journal of Nutrition* 103: 1339-1346.
- Palmer, T.N. i B.E. Ryman, 1972.** Studies on Oral Glucose Intolerance in Fish. *Journal of Fish Biology* 4: 311
- Panserat, S., E. Capilla, J. Gutierrez, P. O. Frappart, C. Vachot, E. Plagnes-Juan, P. Aguirre, J. Breque, i S. Kaushik, 2001.** Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128: 275-283.
- Panserat, S., E. Plagnes-Juan, i S. Kaushik, 2002.** Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1579: 35-42.
- Parimi, P.S., S. Devapatla, L. Gruca, A.M. O'Brien, R.W. Hanson, i S.C. Kalhan, 2002.** Glutamine and leucine nitrogen kinetics and their relation to urea nitrogen

in newborn infants. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 282: E618-E625.

Patterson B.W., X. Zhang, Y.P. Cheng, S. Klein i R. Wolfe, 1997. Measurement of very low stable isotope enrichments by gas chromatography / mass spectrometry: Application to measurement of muscle protein synthesis. *Metabolism* 46(8): 943-948.

Patterson B.W., B. Nfittendorfer, N. Elias, R. Satyanarayana, S. Klein, 2002. Use of stable isotopically labelled tracers to measure very low density lipoprotein-triglyceride turnover. *Journal of Lipid Research* 43(2): 223-233.

Peragon, J., J. B. Barroso, L. Garcia-Salguero, M. De la Higuera, i J. A. Lupianez, 1999. Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 179: 425-437.

Pereira, T.G. i A. Oliva-Teles, 2002. Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture Research* 33: 1183-1189.

Pereira, T.G. i A. Oliva-Teles, 2003. Evaluation of corn gluten meal as protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research* 34(3): 1111-1117.

Perera, W.M.K., 1995. Growth performance, nitrogen balance and protein turnover of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under different dietary regimes. *Ph D Thesis*, University of Aberdeen.

Peres, H. i A. Oliva-Teles, 1999. Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 170: 337-348.

Peres, H., P. Gonçalves i A. Oliva-Teles, 1999. Glucose tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179(1-4): 415-423.

Peter, R.E., 1979. The brain and feeding behaviour. *Fish Physiology*, Vol. VIII, pp.121-159. Editat per W.S. Hoar, D.J. Randall i J.R. Brett. Academic Press, New York.

- Peterson, B.J. i B. Fry, 1987.** Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 293-320.
- Pfeffer, E., 1995.** Carbohydrate utilization and its determination. *J. Appl. Ichthyol.*, 11: 175-182.
- Phillips, J.W. i F.J.R. Hird, 1977.** Gluconeogenesis in Vertebrate Livers
2. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 57: 127-131.
- Pieper, A. i E. Pfeffer, 1980a.** Studies on the Effect of Increasing Proportions of Sucrose Or Gelatinized Maize Starch in Diets for Rainbow-Trout (*Salmo Gairdneri*, R) on the Utilization of Dietary Energy and Protein
9. *Aquaculture* 20: 333-342.
- Pieper, A. i E. Pfeffer, 1980b.** Studies on the Comparative Efficiency of Utilization of Gross Energy from Some Carbohydrates, Proteins and Fats by Rainbow-Trout (*Salmo gairdneri*, R). *Aquaculture* 20: 323-332.
- Pinnegar, J.K. i N.V.C. Polunin, 1999.** Differential fractionation of delta C-13 and delta N-15 among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Functional Ecology* 13: 225-231.
- Pion R., 1976.** Dietary effects and amino acids in tissues. *Protein Metabolism and Nutrition* pp 259-278. Editat per D.J.A. Cole K.N. Boorman, P.J. Buttery, D. Lewis, R.J.N. Eale i H. Swan. Butterwoth, Londres.
- Power, D.M., J. Melo, i C.R.A. Santos, 2000.** The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology* 56: 374-387.
- Rackis, J. J., 1974.** Biological and Physiological Factors in Soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society* 51: A161-A174.
- Refstie, S., T. Storebakken, i A.J. Roem, 1998.** Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture* 162: 301-312.
- Refstie, S., O.J. Korsoen, T. Storebakken, G. Baeverfjord, I. Lein, i A. J. Roem, 2000.** Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190: 49-63.
- Regost C., J. Arzel, S.J. Kaushik, 1999.** Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180: 99-117.
- Reigh, R.C. i S.C. Ellis, 1992.** Effects of Dietary Soybean and Fish-Protein Ratios on Growth and Body-Composition of Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Fed Isonitrogenous Diets. *Aquaculture* 104: 279-292.
- Renaud, J.M. i T.W. Moon, 1980.** Characterization of Gluconeogenesis in Hepatocytes Isolated from the American Eel, *Anguilla rostrata* Lesueur.1. *Journal of Comparative Physiology* 135: 115-125.
- Robaina, L., M. S. Izquierdo, F. J. Moyano, J. Socorro, J. M. Vergara, D. Montero, i H. Fernandez-Palacios, 1995.** Soybean and Lupin Seed Meals As Protein-Sources in Diets for Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) - Nutritional and Histological Implications. *Aquaculture* 130: 219-233.
- Rodehutscord, M., S., Mandel, M. Pack, S., Jacobs i E. Pfeffer, 1995.** Free amino acids can replace protein-bound amino acids in test diets for studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Nutrition* 125: 956-963.
- Rodehutscord, M. i E. Pfeffer, 1995.** Effects of Supplemental Microbial Phytase on Phosphorus Digestibility and Utilization in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Water Science and Technology* 31: 143-147.
- Rodehutscord, M., A. Becker, M. Pack, i E. Pfeffer, 1997.** Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. *Journal of Nutrition* 127: 1166-1175.
- Rodehutscord, M., F. Borchert, Z. Gregus, M. Pack, i E. Pfeffer, 2000.** Availability and utilization of free lysine in Rainbow trout (*Oncorhynchus-Mykiss*).1. Effect of dietary crude protein level. *Aquaculture* 187(1-2): 163-176.
- Rosebrough, R.W., N.C. Steele, i L.T. Frobish, 1982.** Effect of Protein and Amino-Acid Status on Lipogenesis by Turkey Poults.6. *Poultry Science* 61: 731-738.
- Rumsey, G.L., S.G. Hughes, i R.A. Winfree, 1993.** Chemical and Nutritional-Evaluation of Soya Protein Preparations As Primary Nitrogen-Sources for

- Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science and Technology* 40: 135-151.
- Rundel P.W., J.R. Ehleringer, i K.A Nagy, 1989.** Stable isotopes in ecological research. New York: Springer-Verlag.
- Ruohonen, K., J. Vielma, i D.J. Grove, 1999.** Low-protein supplement increases protein retention and reduces the amounts of nitrogen and phosphorus wasted by rainbow trout fed on low-fat herring. *Aquaculture Nutrition* 5: 83-91.
- Saad, C.R.B., 1989.** Carbohydrate metabolism in channel catfish. *Ph. D. dissertation*, Auburn University, Auburn, AL.
- Sakaguchi M. i A. Kawai, 1970.** Histidine metabolism in fish.V. The effect of dietary deficiency and fasting on the activity of histidine deaminase and urocanase in carp liver. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 36: 783-787.
- Sanchez-Muros, M.J., L. Garcia-Rejon, L. Garcia-Salguero, M. De laHiguera, i J. A. Lupianez, 1998.** Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 55-63.
- Sanden ,M., M.H.G. Berntssen, A. Krogdahl, G.I. Hemre, i A.M. Bakke-McKellep, 2005.** An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr fed different varieties of soy and maize. *Journal of Fish Diseases* 28: 317-330.
- Sandholm, M., R.R .Smith, J.C.H. Shih, ai M.L .Scott, 1976.** Determination of Antitrypsin Activity on Agar Plates - Relationship Between Antitrypsin and Biological Value of Soybean for Trout. *Journal of Nutrition* 106: 761-766.
- Sanz, A., A.E. Morales, M. De la Higuera, i G. Cardenete, 1994.** Sunflower Meal Compared with Soybean-Meal As Partial Substitutes for Fish-Meal in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Diets- Protein and Energy Utilization. *Aquaculture* 128: 287-300.
- Schmidt, K., J.W. McClelland, E. Mente, J.P. Montoya, A. Atkinson, i M. Voss, 2004.** Trophic-level interpretation based on delta N-15 values: implications of

- tissue-specific fractionation and amino acid composition. *Marine Ecology-Progress Series* 266: 43-58.
- Schuhmacher, A., M. Munch, i J.M. Gropp, 1995.** Non-essential amino acid sources in crystalline amino acid diets for trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift fur Angewandte Ichthyologie* 11: 317-321.
- Schwarcz, H.P., 1991.** Some theoretical aspects of isotope paleodiet studies. *Journal of Archeological Science* 18: 261-275.
- Shimeno, S., H. Hosokawa, H. Hirata, i M. Takeda, 1977.** Comparative Studies on Carbohydrate-Metabolism of Yellowtail and Carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 43: 213-217.
- Shimeno, S., Hosokawa H., i M. Takeda, 1979.** The importance of carbohydrate in the diet of a carnivorous fish. *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* Vol I, pp.127-143.
- Shimeno, S., M. Kumon, H. Ando, i M. Ukawa, 1993.** Protein-Source for Fish Feed.7. the Growth-Performance and Body-Composition of Young Yellowtail Fed with Diets Containing Defatted Soybean-Meal for A Long-Period. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 821-825.
- Sierra M.A., 1995.** La encapsulación como estrategia para establecer las necesidades de metionina y la suplementación de la proteina de soja. Consecuencias sobre el recambio proteico tisular y el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*). *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- Singh, R.P. i T. Nose, 1967.** Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. *Bull. F water Fish. Res. Lab. Japan*, 17(1):21-25.
- Smith, D. M., 1929.** The excretion of ammonia and urea by the gills of fish. *J. Biol. Chem* 82: 727-742.
- Spisni, E., M. Tugnoli, A. Ponticelli, T. Mordeni i V. Tomasi, 1998.** Hepatic steatosis in artificially marine teleost. *Journal of Fish Diseases* 21: 177-184.
- Steele, K.W. i R.M. Daniel, 1978.** Fractionation of Nitrogen Isotopes by Animals - A Further Complication to Use of Variations in Natural Abundance of N-15 for Tracer Studies. *Journal of Agricultural Science* 90: 7-9.

- Storebakken, T., K. D. Shearer i A. J. Roem, 2000.** Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus, and absorption of other minerals in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquaculture Nutrition* 6: 103-108.
- Sunde, J., S.A. Eiane, A. Rustad, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, G. Venturini i K. Rungruangsak-Torrissen, 2004.** Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture Nutrition* 10(4): 261-277.
- Tacon, A.G.J. i A.J. Jackson, 1985.** Utilisation of conventional protein sources in practical fish feeds. *Nutrition and Feeding in Fish*, pp 119-145. Editat per C.B. Cowey, A.M. Mackie i J.G. Bell. Academic Press, London.
- Tacon, A.G.J., 1993.** Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. *Food and Agriculture of United Nations*.
- Takeuchi, T., K.S. Jeong, i T. Watanabe, 1990.** Availability of Extruded Carbohydrate Ingredients to Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Carp *Cyprinus-Carpio*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56: 1839-1845.
- Teskeredzic, Z., D.A. Higgs, B.S. Dosanjh, J.R. McBride, R.W. Hardy, R.M. Beames, J.D. Jones, M. Simell, T. Vaara, i R.B. Bridges, 1995.** Assessment of Undeptynized and Deptynized Rapeseed Protein-Concentrate As Sources of Dietary-Protein for Juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 131: 261-277.
- Tieszen, L.L., T.W. Boutton, K.G. Tesdahl, i N.A. Slade, 1983.** Fractionation and Turnover of Stable Carbon Isotopes in Animal-Tissues - Implications for Delta-C-13 Analysis of Diet. *Oecologia* 57: 32-37.
- Trueman, C.N., R.A.R. McGill, i P.H. Guyard, 2005.** The effect of growth rate on tissue-diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 3239-3247.
- Van Waarde A., 1981.** Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Activities of transamination reactions, purine nucleotid cycle and glutamate

- deshydrogenase in goldfish tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* 68 B: 407-413.
- Vellas F. i A. Sefarty, 1974.** Ammonia and urea in a fresh water teleost carp. *J Physiol.* 68: 591-614.
- Vergara, J.M. i K. Jauncey, 1993.** Studies on the use of dietary energy by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish nutrition in practice* pp.453-458.
- Vergara, J. M., L. Robaina, M. Izquierdo, i M. Delahiguera, 1996.** Protein sparing effect of lipids in diets for fingerlings of gilthead sea bream. *Fisheries Science* 62: 624-628.
- Viaplana-Marin, I., J. Fernandez-Borras, i J. Blasco, 2005.** Effects of protein/carbohydrate ratio of extruded diets on protein synthesis, protein growth and body composition in juvenile brown trout (*salmo salar*). *Aquaculture International*, Online.
- Walton, M.J. i C.B. Cowey, 1977.** Aspects of Ammoniogenesis in Rainbow-Trout, *Salmo-Gairdneri*.2. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 57: 143-149.
- Walton, M. J. i C. B. Cowey, 1979a.** Gluconeogenesis by Isolated Hepatocytes from Rainbow-Trout *Salmo-Gairdneri*.62. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 62: 75-79.
- Walton, M.J. i C.B. Cowey, 1979b.** Gluconeogenesis from Serine in Rainbow-Trout *Salmo-Gairdneri* Liver. 61. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 62: 497-499.
- Walton, M.J. i C.B. Cowey, 1982.** Aspects of Intermediary Metabolism in Salmonid Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 73: 59-79.
- Walton, M.J., C.B. Cowey, i J. W. Adron, 1982.** Methionine Metabolism in Rainbow-Trout Fed Diets of Differing Methionine and Cystine Content. *Journal of Nutrition* 112: 1525-1535.
- Walton, M. J., 1986.** Metabolic Effects of Feeding A High Protein-Low Carbohydrate-Diet As Compared to A Low Protein-High Carbohydrate-Diet to Rainbow-Trout *Salmo-Gairdneri*. 2. *Fish Physiology and Biochemistry* 1: 7-15.

- Walton, M.J. i R.P. Wilson, 1986.** Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein. *Aquaculture* 51: 105-115.
- Walton, M.J., C.B. Cowey, R.M. Coloso, i J.W. Adron, 1986.** Dietary Requirements of Rainbow-Trout for Tryptophan, Lysine and Arginine Determined by Growth and Biochemical Measurements.1. *Fish Physiology and Biochemistry* 2: 161-169.
- Wang T.C. i M.F. Fuller, 1989.** The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. Experiments by amino acid deletion. *British Journal of Nutrition* 62: 77-89.
- Waterlow, J.C. i D.J. Millward, 1989.** Energy cost of turnover of protein and other cellular constituents. *Energy transformations in cells and organisms*, pp 277-282. Editat per W. Wieser i E. Gnaiger. Georg Thieme, Stuttgart.
- Werner W., H.G. Rey i H. Wielinger, 1970.** On the properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood according to the GOD/POD-method. *Z. Analyt. Chem.* 252: 224.
- Wilson, R. P., D. M. Gatlin, i W. E. Poe, 1985.** Postprandial Changes in Serum Amino-Acids of Channel Catfish Fed Diets Containing Different Levels of Protein and Energy. *Aquaculture* 49: 101-110.
- Wilson, R.P., 1994.** Utilization of Dietary Carbohydrate by Fish. *Aquaculture* 124: 67-80.
- Wittmann, C., M. Hans, i E. Heinzle, 2002.** In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GUMS. *Analytical Biochemistry* 307: 379-382.
- Woo, K.L. i D.K. Chang, 1993.** Determination of 22 Protein Amino-Acids As N(O)-Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives by Gas-Chromatography. *Journal of Chromatography* 638: 97-107.
- Woo, K.L. i D.S. Lee, 1995.** Capillary Gas-Chromatographic Determination of Proteins and Biological Amino-Acids As N(O)-Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* 665: 15-25.

Yamamoto, T, T. Unuma, T. Akiyama, 1988. Postprandial changes in plasma free amino acid concentrations of rainbow trout fed diets containing different protein sources. *Fish Science* 64: 474-481.

Zammit, V.A. i E.A. Newsholme, 1979. Activities of Enzymes of Fat and Ketone-Body Metabolism and Effects of Starvation on Blood-Concentrations of Glucose and Fat Fuels in Teleost and Elasmobranch Fish.1. *Biochemical Journal* 184: 313-322.