

---

**FACULTAT DE BIOLOGIA**  
**DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA**

MODULACIÓ DELS PROCESSOS DIGESTIUS EN RESPOSTA A  
LA COMPOSICIÓ DE LA DIETA EN ORADA (*Sparus aurata*) I  
TRUITA (*Oncorhynchus mykiss*).

Tesi Doctoral

Ester Santigosa i Culí

---





FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

MODULACIÓ DELS PROCESSOS DIGESTIUS EN RESPOSTA A  
LA COMPOSICIÓ DE LA DIETA EN ORADA (*Sparus aurata*) I  
TRUITA (*Oncorhynchus mykiss*).

Memòria presentada per  
**Ester Santigosa i Culí**  
Per optar al grau de  
**Doctora per la Universitat de Barcelona**

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Maria Ángeles Gallardo Romero del Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia. Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa de Fisiologia (bienni 2001-2003).

M.A. Gallardo Romero

Ester Santigosa i Culí

Barcelona, Desembre de 2006

---

---

---

## AGRAÏMENTS

---

Després de tants anys, ha arribat el moment més dolç de tots. Totes les pàgines que vénen a continuació no existirien sense la gent que ha estat al meu costat durant aquest temps, i per això crec que el mínim que puc fer és intentar expressar en paraules tot el que m'han aportat.

En primer lloc vull agrair el suport de la Maggi. Sense tu aquest treball hauria set impossible. Com a directora has estat incansable. De tu he après a intentar arribar sempre més enllà per difícil que semblés. Mai oblidaré els mostrejos inacabables, les llargues xerrades al despatx que ens esgotaven a les dues, i els teus consells. Has aconseguit que treballés més del que jo creia que era capaç. Gràcies per creure en mi. (I per encarregar-te de tota la paperassa mentre jo no hi era).

Vull agrair també al J. Pérez i a la F. Médale la seva paciència quan els hem envaït les instal·lacions. Gràcies per cuidar tan bé els peixos, per estar sempre disposats a donar-nos un cop de mà en els mostrejos, i per les vostres crítiques, sempre enriquidores, en els treballs.

També a la Carmen Benito, per la paciència que has tingut amb les muntanyes de vials que et saturaven les instal·lacions, i sobretot per cuidar-me quan els descontaminava!!!

Gràcies també a tot el personal del departament de fisiologia, amb qui he pogut comptar durant aquests anys. Als directors i secretaris; a les secretàries, per la seva paciència amb tots els papers que a mi em tornaven boja només de mirar-los. Gràcies al Josep per donar-me aquesta oportunitat. Gràcies Ginés pel teu suport informàtic!!! Jaume, Jose, Guti, Isabel: moltes gràcies per tots els consells que m'heu donat, per la vostra companyia als mostrejos, per escoltar moltes vegades les presentacions abans de les exposicions...!!! I gràcies a tu, Juani, pel temps que has dedicat a aquestes mostres, per les hores de son que has perdut per culpa meva i que mai et podré compensar...

Em falten paraules pels companys de laboratori. Primerament agrair a en Toni i a la Mònica S. tot el que em va ensenyar quan vaig arribar. Recordar també els que han passat per "l'aula": en Víctor, la Jud, en Pau i l'Àlex. Agrair els bons moments passats amb l'Annita i la Ka. Marta B., gràcies per deixar-me l'ordinador tantes vegades quan necessitava la xarxa, per riure en els estressos dels mostrejos, i sobretot en les inacabables entregues dels reports...!!!! Mònica G., gràcies per la teva serenitat, els teus consells estadístics, i per la calma que sempre m'has transmès. Gràcies a la Nuriaka, la Raquel i en Dani, per la seva fe en les gelatinases i les hores invertides intentant aconseguir resultats; a en Santinoi, per la seva correcció en els formes malgrat la seva manca de 'timing'. A en Moi, per la seva gran capacitat de treball, pel que m'ha fet riure amb el seu desconeixement del concepte 'párrafo corto', i per la gràcia que té renegant a mitja veu quan creu que ningú el sent! I finalment, a en Pere: en aquests 'dos anys' has aconseguit que em fes gràcia tot, m'has robat les frases (i els amics), però (i que no servisca de precedent) crec que la majoria de les vegades tens raó! ;-) Resumint, moltes gràcies a tots per les converses de l'hora de dinar, per les tardes escoltant en Quim o l'Andresito (obviaré aquí les sessions de màquina light), per l'alicent d'haver d'acabar una feina abans d'un sopar... Tots heu aconseguit que anar a treballar fos una alegria i no una obligació. Us desitjo molta sort!!! Us trobaré molt molt molt a faltar!!!

A la resta de becaris de fisio -Irene, Marta C., Joan 'petit', Núria M., Lourdes, Dani,...- us agraeixo a tots els moments compartits i us desitjo molta sort en els vostres projectes!

Als 'de bio'... uffft!!!! és difícil... amb vosaltres he crescut!! us vaig conèixer amb divuit anys acabats de fer i, malgrat tot el que hem passat, continueu estant aquí... Sense vosaltres crec que

ni tan sols hauria acabat la carrera!!! No oblidaré mai les migdiades a la gespa esperant les pràctiques, les sobretauls interminables a ca l'Evita o a casa (amb la banda sonora d'amelie i una cafetera que no s'acabava), els sopars amb glamourT de la Meri o la Marta, els caps de setmana al Roc, les meravelloses vacances amb el Chufas o la caravana... D'entre tots vosaltres no puc obviar en Raül: per totes les converses, per tot el que m'has ensenyat, pels esmorzars i les exposicions els diumenges que em quedava a bcn... He après moltíssimes coses amb tu! Gràcies per tenir paciència, per ser-hi sempre que ho necessitava!! També agrair les llargues converses amb l'Evita de punta a punta de departament fins no fa tant! Les xerrades entresetmana amb en Pablo, amb unes braves i una cerveseta a les mans. Gràcies a la Marta S. per la seva serenitat, a en Sergi per la sinceritat del seu somriure, a la força de la Patri, a l'entusiasme de la Lola, a l'energia de la Silvi. Gràcies al 'cinisme' de la Meri, a la Núria, a l'Eusebi, en Guillem, en Nahuel, en Carlos, en Víctor, en Jordi. Gràcies Tonda i Laia per la gairebé ineludible cita del Tagamament. Us agraeixo a tots el bon humor d'aquests anys, els comentaris del merists, els deslluiments dels TdPs, les festes temàtiques que ningú prepara tan bé... Ja sabeu que us estimo i us admiro. Gràcies per haver set aquí!!!

A les de spt...a vosaltres sí que no sé que dir-vos! Em coneixeu tant que abans d'obrir aquesta tesi ja deveu saber el que hi ha escrit, el tipus de lletra, el format de les figures,... Gràcies a les del València 487, especialment a l'Emma per totes les hores compartides en aquella habitació petita però amb encant... Gràcies Valls pels teus ànims! tu ets la que més entén tot el que implica aquesta tesi (tinc unes ganes boges de venir-te a veure!!!). Gràcies a la Mimi, a la Nogue, a la Laura C. per les seves rialles durant aquests anys. Gràcies Vaqué per aconseguir que no rigui enlloc com a spt... a tota la resta, per tots els cafès dels caps de setmana: la Montse, l'Eva J., la Font, la Laia, la Mari, l'Anna R., la Laura A., la Gonsi. Igualment als nois, que sempre han intentat entendre per què servia el que feia: l'Abel, els Davids, l'Alfons, l'Eelco, en Marc, en Ricard, en Patx, en Miliu, en Richard... Gràcies per haver aconseguir que desconnectés els dissabtes.

Non posso dimenticare Maria, Núria S. e Laura P., perché da loro ho imparato tantissimo! Perché sono apparse in un momento dolcissimo della mia vita molto tempo fa, ma restano ancora qua. Per i momenti a Campuccio 82, per Stromboli, per le Vacanze romane, per i formaggi di giovedì sera... Grazie per provare di capire quello che facevo, per scusarmi se arrivavo in ritardo per finire un'esperimento, per credere nei 'pesci vegetariani', per tutto quello che mi avete dato!!!!!! Igualment als que no puc posar dins d'un grup concret però que sempre han estat aquí: en Rubèn, què m'ha animat en tot des que em va conèixer fa moltíssims anys; y a Juan, por los jueves al mediodía en los comedores, por tus didácticas lecciones sobre arte y fotografía, y por tus aportaciones en este trabajo. Javi, Ana, Miguel, Esteban, Mariam... gracias por hacer tan agradable mi estancia y ayudarme a aprender (un montón!) estos últimos meses.

Finalment, he d'agrair el suport de la meva família. Els meus pares són els que han fet possible aquest treball, emocional i logísticament. Necessito donar-los les gràcies per la confiança que han dipositat en mi, per la capacitat que han demostrat intentant entendre la meva feina, per la seva fe en mi i no en el que feia. Moltes gràcies mare, per tots els tàpers que m'has guardat aquests anys (una exquisitesa cada dilluns al migdia); moltes gràcies pare per totes les vegades que m'has trucat perquè no m'adormís (sempre dues vegades, perquè jo demanava 5 minuts més), i també pels dinars algun dimecres, quan em treies del laboratori i no podies entendre que mengés orada... No puc oblidar els meus avis, que sense entendre el que feia han confiat en mi; i l'Anna, que sempre ha tingut una opinió coherent (i molts ànims apunt) sobre qualsevol cosa que li he demanat. A tots moltes gràcies, perquè sense totes les converses amb vosaltres la vida seria molt trista!!! Si no haguéssiu set aquí no ho hagués aconseguir!!!!

Gràcies a tots. Una vegada més. Ester.

als meus pares





La creixent importància de l'aqüicultura fa necessària la recerca per a la millora i abaratiment de les dietes per a la piscicultura, amb l'objectiu d'optimitzar el desenvolupament del sector de forma sostenible.

Cal buscar alternatives a la farina i l'oli de peix, matèries primeres cada vegada més limitants, que s'han utilitzat tradicionalment en la formulació de pinsos per a peixos carnívors.

S'han testat dietes experimentals amb diferents percentatges de reemplaçament de la farina de peix per fonts proteiques vegetals per a orada (*Sparus aurata*) i truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*). Amb la finalitat d'ajustar la composició aminoacídica del pinso al perfil requerit per les espècies, es van utilitzar en les dietes de substitució, mescles d'ingredients vegetals i suplementació amb aminoàcids lliures. En experiències de creixement de dotze setmanes, el reemplaçament de la farina de peix va disminuir l'activitat total de les proteases digestives, suggerint la presència a la dieta de factors antinutricionals. En ambdues espècies, però, van aparèixer mecanismes de compensació, com l'increment de la longitud intestinal relativa, l'increment d'algunes activitats proteasa específiques, o el desplaçament de la capacitat d'absorció des de l'intestí proximal cap a zones intestinals distals. Aquests mecanismes compensatoris van permetre obtenir bones taxes de creixement amb substitucions de fins a un 75% de la farina de peix. Els animals alimentats amb dietes de substitució total van presentar una funció digestiva deteriorada i un creixement al voltant d'un 20% menor al dels animals alimentats amb la dieta basada en farina de peix.

En l'orada es testà la substitució simultània de la farina de peix (75%) i de diferents percentatges d'oli de peix (33, 66 i 100%). L'administració de les dietes experimentals amb un 66% i un 100% d'oli vegetal durant deu setmanes va disminuir l'activitat enzimàtica digestiva, però la capacitat d'absorció d'aminoàcids no es va veure afectada. Només la dieta de doble substitució amb el reemplaçament total de l'oli de peix va afectar negativament el creixement.

Es va estudiar l'efecte de la inclusió total d'oli vegetal en dietes amb diferent percentatge (50% i 75%) i origen de fonts proteiques vegetals. Les orades presentaren diferents patrons de regionalització de la capacitat d'absorció de nutrients al llarg del tracte intestinal segons les fonts proteiques utilitzades. El grup de menor substitució de

la farina de peix presentà una activitat proteolítica digestiva més elevada i superior taxa de creixement.

El síndrome d'hivern, malaltia que afecta a les orades en cultiu de la costa Nord-Mediterrània, té un origen multifactorial, i pot ocasionar importants pèrdues econòmiques en els mesos freds.

S'han testat en orades pinsos comercials amb diferent percentatge de lípids (14 i 22%) com a dietes de preparació per a l'hivern. L'engreix durant 75 dies amb les dietes estudiades no afectà l'absorció de nutrients a nivell intestinal o els índexs de creixement. L'exercici moderat tampoc afectà aquests paràmetres. Es descarta que a baixes temperatures els animals rebutgin l'aliment degut a una incapacitat en l'absorció de nutrients, ja que tots els grups d'orades van respondre de manera similar a una situació prolongada de fred.

La creciente importancia de la acuicultura ha impulsado la investigación dirigida a la mejora de las dietas para peces y a la disminución de los costes de fabricación de éstas, con el objetivo de optimizar el desarrollo sostenible del sector.

Se hace necesaria la búsqueda de ingredientes alternativos a la harina y el aceite de pescado, tradicionalmente utilizados en la formulación de los piensos para peces carnívoros, y que son materias primas cada vez más limitantes.

Para la dorada (*Sparus aurata*) y la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) se han testado dietas experimentales con distintos porcentajes de sustitución de la harina de pescado por fuentes proteicas vegetales, llegando al reemplazo total. Con el fin de ajustar la composición aminoacídica del pienso al perfil requerido por las especies, se utilizaron en las dietas de sustitución mezclas de ingredientes vegetales y suplementación con aminoácidos libres. En experiencias de doce semanas de crecimiento, la sustitución de la harina de pescado disminuyó la actividad total de las proteasas digestivas, sugiriendo la presencia de factores antinutricionales en la dieta. Pero en ambas especies, se presentaron mecanismos de compensación, como el incremento de la longitud intestinal relativa, el incremento de algunas actividades proteasa específicas, o el desplazamiento de la capacidad de absorción desde el intestino proximal hacia el distal. Estos mecanismos compensatorios permitieron obtener buenas tasas de crecimiento hasta un 75% de reemplazo de la harina de pescado. Los animales alimentados con dietas de sustitución total presentaron una función digestiva muy deteriorada y un crecimiento aproximadamente un 20% inferior al de los animales alimentados con el pienso basado en harina de pescado.

En dorada se testó la sustitución simultánea de la harina de pescado (75%) y de distintos porcentajes de aceite de pescado (33, 66 i 100%). La administración de las dietas experimentales con un 66% y un 100% de aceites de origen vegetal durante diez semanas disminuyó la actividad enzimática digestiva, no viéndose afectada la capacidad de absorción de aminoácidos. Solamente la dieta de doble sustitución con un reemplazo total del aceite de pescado afectó negativamente el crecimiento.

Se estudió en dorada el efecto de la inclusión total de aceite vegetal en dietas con distintos porcentajes (50% i 75%) y orígenes de las fuentes proteicas vegetales. Los animales mostraron distintos patrones de regionalización de la capacidad de absorción de nutrientes a lo largo del tracto intestinal según la digestibilidad de las fuentes proteicas utilizadas. El grupo alimentado con la dieta de menor sustitución de harina

de pescado presentó una actividad proteolítica digestiva superior, y una tasa de crecimiento significativamente más elevada.

El síndrome de invierno es una enfermedad que afecta a las doradas en la costa norte del Mediterráneo. Tiene un origen multifactorial, pudiendo ocasionar pérdidas económicas importantes durante los meses más fríos.

Se han testado, en dorada, piensos comerciales con distintos porcentajes de lípidos (14 y 22%) como dietas de preparación para el invierno. El engorde durante 75 días con los piensos seleccionados no afectó a la absorción de nutrientes a nivel intestinal ni tampoco a los índices de crecimiento. El ejercicio moderado tampoco afectó los parámetros estudiados. Se descarta que a bajas temperaturas los animales rehusen el alimento debido a una incapacidad en la absorción de nutrientes, ya que todos los grupos de doradas respondieron de manera similar a una situación duradera de frío.

## ABSTRACT

---

Recently, there has been considerable growth in aquaculture. As a result, fish diets have improved and production costs have dropped. Aquaculture optimises the development of the industry in a sustainable way.

Fish meal and fish oil have traditionally been used in the diets of carnivorous fish species. Alternatives to these feeds need to be found, as primary sources are now limited.

Experimental diets in which different percentages of fish meal were replaced by plant sources have been tested in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Feeds contained a mixture of ingredients that matched the required amino acid profile of each species. Feeds were also supplemented with free amino acids to avoid nutritional imbalances. In a 12-week growth trial, when up to 75% of the fish meal was replaced the total digestive protease activity fell and histological changes occurred. This suggests that antinutritional factors were present in the experimental diets. However, compensation mechanisms such as an increase in relative intestinal length, an increase in some specific protease activities, or increased absorption in more distal intestinal regions appeared in both species, enabling good growth rates to be attained.

The use of plant ingredients as the sole source of protein affected the efficiency of the digestive processes in both sea bream and rainbow trout. Fish showed a final weight decrease of around 20% when compared to control groups.

In sea bream, the effect of simultaneously replacing 75% of fish meal and different percentages of fish oil (33, 66 and 100%) was studied. Fish fed for ten weeks on a diet which included over 66% of plant oil presented a decrease in enzymatic activities. However, amino acid absorption capacities were not affected. Only total fish oil replacement affected growth performance.

Replacement of all the fish oil when 50 and 75% of fish meal was replaced by different plant sources was also tested. Sea bream showed different absorption patterns for the studied nutrients in different parts of the digestive tract, depending on the protein source used. In the group in which only a low percentage of fish meal was replaced, digestive proteolytic activities were higher, and growth rates were significantly better.

The specific requirements of some species also have to be taken into account. Sea bream, for instance, can be affected by winter syndrome in some regions of the north Mediterranean coasts. This disease, which has a multifactorial origin, can lead to considerable economic losses during cold months.

Commercial diets with different percentages of lipids as diets to prevent winter syndrome in sea bream, did not affect intestinal nutrient absorption or growth performance. Moderate exercise did not affect the parameters. We can rule out the theory that the refusal of feed at low temperatures is related to nutrient absorption impairments, since all sea bream groups showed similar responses to a long, cold-induced situation.

Agraïments.....	i
Resum.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
Contingut.....	xi
1. Introducció.....	1
1.1. L'aqüicultura.....	3
1.2. Dietes per a aquicultura.....	7
1.2.1. Fonts alternatives a la farina de peix.....	8
1.2.2. Fonts alternatives a l'oli de peix.....	10
1.2.3. La doble substitució.....	12
1.3. El síndrome d'hivern.....	12
1.4. L'aparell digestiu dels peixos.....	14
1.4.1. Requeriments nutricionals de les espècies carnívores.....	17
1.5. Digestió i absorció de nutrients.....	18
1.5.1. La digestió.....	18
1.5.2. L'absorció dels nutrients.....	20
Annexes a la introducció.....	25
2. Objectius.....	35
3. Materials i Mètodes.....	39
3.1. Reactius.....	41
3.2. Animals.....	42
3.3. Disseny experimental i presa de mostres.....	42
3.4. Anàlisis.....	42
3.4.1. Histologia de l'intestí proximal.....	42
3.4.2. Valoració de les activitats proteolítiques i $\alpha$ -amilasa de l'intestí proximal.....	43

3.4.2.1. Quantificació de l'activitat proteolítica total.....	43
3.4.2.2. Identificació de les diferents activitats proteasa alcalina.....	43
3.4.2.3. Quantificació de l'activitat $\alpha$ -amilasa.....	43
3.4.3. Captació de nutrients.....	46
3.4.3.1. Tècnica d'obtenció de vesícules de membrana apical (VMAs) d'enteròcit.....	46
3.4.3.2. Validació de la tècnica d'obtenció de VMAs d'enteròcit.....	48
3.4.3.3. Captació de nutrients en VMAs obtingudes dels diferents segments intestinals.....	50
3.5. Anàlisi estadístic dels resultats.....	53
Annexes al materials i mètodes.....	55
4. Blocs experimentals.....	69
4.1. Dietes de substitució.....	73
4.1.1. Dietes amb baixos i moderats percentatges de substitució de la farina de peix per ingredients vegetals.....	75
<i>Orada</i>	
Disseny experimental.....	75
Resultats.....	79
<i>Truita</i>	
Disseny experimental.....	86
Resultats.....	89
Discussió.....	95
4.1.2. Dietes amb alts percentatges de substitució. El reemplaçament total de la farina de peix per farines vegetals.....	101
Disseny experimental.....	101
Resultats.....	106
Discussió.....	123
4.1.3. Dietes de doble substitució.....	127
Disseny experimental.....	127
Dietes amb un 75% de proteïna vegetal. Efecte de la inclusió d'oli vegetal	
Resultats.....	131
Discussió.....	138



Dietes amb un 100% d'oli vegetal. Efecte de la substitució de la farina de peix	
Resultats.....	140
Discussió.....	145
4.2. Dietes de preparació a l'hivern.....	147
Disseny experimental.....	149
Resultats.....	151
Discussió	159
5. Conclusions.....	163
6. Bibliografia.....	169



## 1. INTRODUCCIÓ



## 1.1. L'AQUÍCULTURA

L'aqüicultura es defineix com el cultiu d'organismes aquícoles, bé en el medi natural en què es troben, bé en instal·lacions adaptades a controlar les variables físiques i biològiques de l'aigua per tal d'optimitzar la producció en medi aquós (Gran Diccionari de la Llengua Catalana).

Aquesta pràctica es remunta a èpoques molt antigues, segons es desprèn de diverses restes arqueològiques, com per exemple un baixrelleu del mur d'un temple egipci de Tebes (2500 a.C.) que representa el cultiu de tilapia en un estany artificial (Fundación Alfonso Martín Escudero, 2005). Altres exemples, són les lleis que existien a la regió Indo-Pacífica per protegir els piscicultors dels lladres el 1400 a.C. (Iversen, 1982), o els exitosos cultius d'ostres de japonesos, grecs i romans datats de la mateixa època. El primer tractat conegut sobre aquícultura, 'Classic of Fish Culture', fou escrit pel xinès Fan Lei el 475 a.C. (Fundación Alfonso Martín Escudero, 2005).

Actualment l'aqüicultura és la indústria alimentària que més ràpidament creix a nivell mundial (Tidwell i Allan, 2001), i ha passat de representar el 3.9% de la producció pesquera l'any 1970 a representar-ne el 29.9% l'any 2003 (FAO, 2004), amb una taxa mitjana de creixement del 8.9% durant aquest període. Aquest increment és degut a un augment en la demanda de peix, junt a un estancament de la pesca extractiva, que des del 1999 està al voltant de 92 milions de tonelades (Broad i Revkin, 2003) degut a la sobreexplotació de més del 80% dels caladors (Fig. 1).

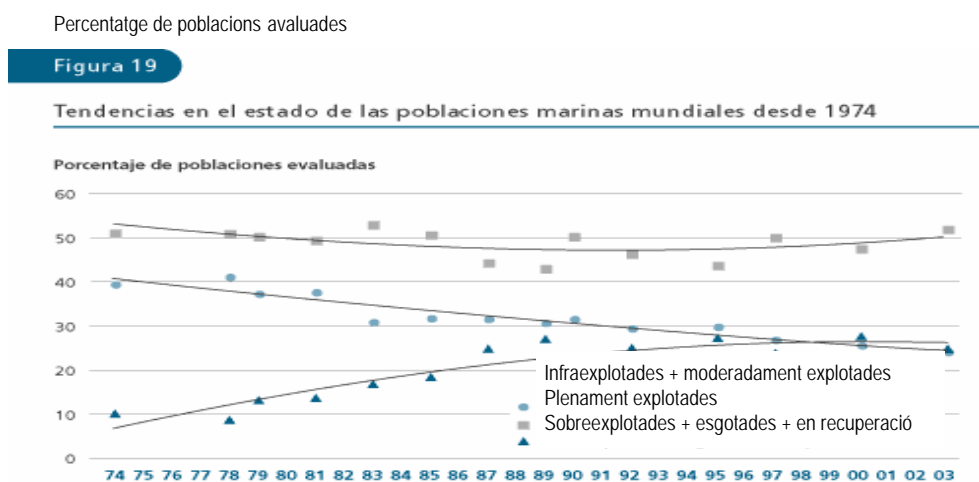


Figura 1. Tendències en l'estat de les poblacions marines mundials des de 1974. Font: FAO 2004.

Diverses estimacions (FAO, 2000) asseguren que la importància d'aquest sector seguirà augmentant per poder abastar la demanda de peix de la població. La FAO preveu que l'any 2030 aproximadament la meitat del peix consumit arreu del món serà de procedència aquícola. Cal, però, que aquest creixement tingui lloc de manera sostenible, mitigant l'impacte ambiental d'aquesta activitat intensiva, i assegurant alhora la innocuïtat i la qualitat dels productes obtinguts.

La pràctica de l'aquicultura està àmpliament extesa a tots els continents, encara que creix sis vegades més ràpid en els països en vies de desenvolupament que en els països industrialitzats (Tidwell i Allan, 2001). Les espècies cultivades, però, difereixen entre les dues regions; així, en els països pobres el 90.7% de la producció aquícola és de peixos herbívors, omnívors, o d'organismes aquàtics que s'alimenten per filtració, mentre que en els països rics la producció piscícola es centra en espècies carnívores (FAO, 2002). D'entre tots els països productors, Xina és, amb diferència, el major productor mundial, generant l'any 2002 el 71% de les 51.4 tonelades d'organismes aquàtics produïdes a nivell mundial, equivalents a un 55% del valor econòmic de la producció total (FAO 2004).

La taula 1 mostra els 10 majors productors de peix, crustacis i mol·luscs (7 dels quals es localitzen a Àsia), així com els 10 països productors que obtingueren el major creixement en el període 2000-2002. Tots els continents van augmentar la producció en aquest període, amb l'excepció d'Europa, on es mantingué inalterada (FAO, 2004).

Taula 1. Països amb major producció aquícola en volum i creixement.

Major volum				Major creixement			
Productor	Producció 2000 (Tm)	Producció 2002 (Tm)	TAM (%)	Productor	Producció 2000 (Tm)	Producció 2002 (Tm)	TAM (%)
Xina	24580	27767	6.3	Irán	40.6	76.8	37.6
Índia	1942.2	2191.7	6.2	Illes Feroe	32.6	50.9	25.0
Indonèsia	788.5	914.1	7.7	Lao	42.1	59.7	19.1
Japó	762.8	828.4	4.2	Brasil	176.5	246.2	18.1
Bangladesh	657.1	786.6	9.4	Xile	391.6	545.7	18.0
Tailàndia	738.2	644.9	-6.5	Fed.Russa	74.1	101.3	16.9
Noruega	491.2	553.9	6.2	Mèxic	53.9	73.7	16.9
Xile	391.6	545.7	18.0	Taiwan	243.9	330.2	16.4
Vietnam	510.6	518.5	0.8	Canadà	127.6	172.3	16.2
Estats Units	456.0	497.3	4.4	Birmània	89.9	121.3	10.7

TAM= taxa mitjana anual de creixement entre 2000-2002. Font: FAO 2004.

Tot i que en aquest sector es van cultivar l'any 2002 més de 220 espècies de plantes i animals aquàtics, cal assenyalar que 10 d'elles van representar el 69% de la producció, i que més del 90% dels productes primaris de l'aqüicultura inclogueren únicament 25 espècies cultivades. Cal parar doncs atenció en la possibilitat de diversificar els cultius. La taula 2 presenta els principals grups d'espècies cultivades durant el període 2000-2002 i aquelles que han mostrat un major creixement.

Taula 2. Principals grups d'espècies en la producció de l'aqüicultura en volum i creixement

Major volum			Major creixement	
Grups d'espècies	% de la producció total	TAM (%)	Grups d'espècies	TAM (%)
Carpes i altres ciprínids	41.9	3.9	Bacallà, rap	192.4
Ostres	10.8	3.9	Peixos demersals diversos	32.6
Mol·luscs marins diversos	9.4	14.3	Crustacis marins diversos	23.7
Escopinyes, cloïsses	8.6	14.1	Palaies i llenguados	21.6
Salmons, truites	4.5	7.9	Tonyines, bonítol i agulles	21.0
Tilapies i altres cíclids	3.8	8.7	Crustacis d'aigua dolça	19.9
Musclos	3.6	2.7	Crancs i cabres	17.7
Mol·luscs marins diversos	3.4	-8.0	Mol·luscs d'aigua dolça	14.6
Gambes, camarons	3.2	6.3	Peixos diversos d'aigua dolça	14.3
Vieires	3.1	3.1	Escopinyes, cloïsses	14.1

TAM= taxa mitjana de creixement entre 2000-2002. Font: FAO 2004.

La major part de la producció aqüícola prové del cultiu de peixos, crustacis i mol·luscs en aigua dolça (57.5% en volum i 48.4% en valor. Fig. 2), mentre que la maricultura contribueix amb un 36.5% de la producció i el 35.7% del valor total. La resta de la producció es localitza en aigües salobres, aportant aproximadament el 15% del valor econòmic de la producció total (Fig. 2).

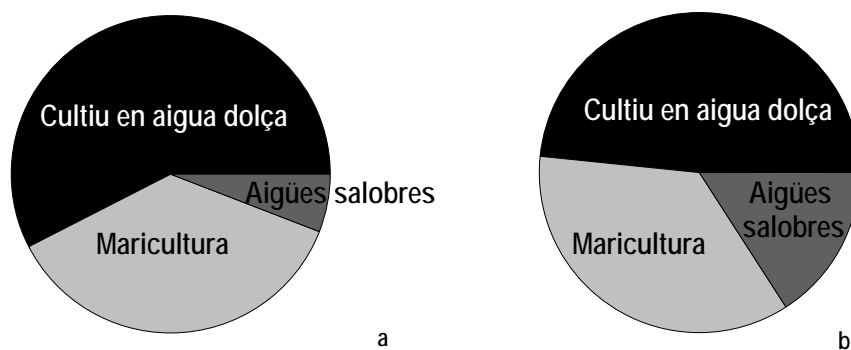


Figura 2. Aportació dels diferents tipus de cultiu al volum total (a) i al valor total de la producció (b). Font: FAO 2004.

El 15% de la producció aquícola mundial és de llagostins i peixos carnívors (FAO, 2004). Les dietes per a aquestes espècies són riques en proteïna, i com a matèria primera per a la seva elaboració s'utilitza majoritàriament farina de peix, que fa que el seu cost sigui elevat. Considerant, però, la contracció de l'activitat productora de farina i oli de peix entre 1998 i 2004 en alguns dels principals països que n'elaboren (FAO, 2004), juntament amb l'increment de l'aqüicultura en les últimes dècades, aquesta activitat és insostenible (Fig. 3), malgrat predominar al nostre entorn.

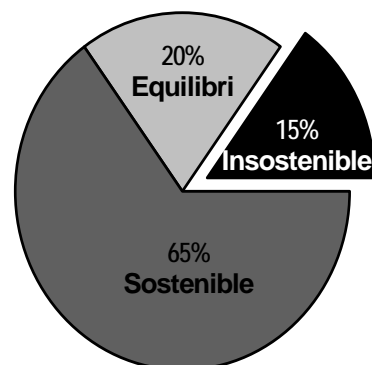


Figura 3. Percentatge de la producció aquícola independent de la producció de farina i oli de peix (sostenible), semidependent (equilibri) i dependent (insostenible). Font: FAO, 2004.

Per tant, tot i el gran increment que ha experimentat el sector en els últims anys, es fa necessari considerar alguns aspectes, com per exemple la contaminació, la diversificació de les espècies, o la limitació dels productes primaris per a l'elaboració de pinsos, perquè aquest creixement no quedi estancat.

Així, a l'establir una nova instal·lació cal tenir en compte que la majoria dels cultius, i també la pesca costera, es desenvolupen en una petita franja litoral (Fundació Alfonso Martin Escudero, 2005). Per aquest motiu, s'han de prendre les precaucions necessàries per minimitzar les concentracions de nitrogen i fòsfor orgànics alliberades al medi, adequant tant la formulació de les dietes com les quantitats de pinso administrades als animals, ja que l'excés d'aquests productes pot acumular-se i alterar l'equilibri ecològic de la zona (García Aliaga *et al.*, 2005; Macias *et al.*, 2005); modificant les característiques hidrobiològiques de l'aigua (temperatura, oxigen dissolt, contingut de sals), afavorint-se proliferacions d'algues, marees roges o fenòmens d'anòxia o toxicitat que poden afectar els animals cultivats i les captures, així com alterar la qualitat dels teixits per biotoxines o substàncies químiques (FAO, 2004; Peña *et al.*, 2005; Bueno *et al.*, 2005).

S'ha de treballar també en la diversificació dels cultius, intentant reduir la introducció d'espècies carnívores i treballant amb espècies de la zona inferior de la cadena tròfica, la cria de les quals és sostenible. Generalment, el principal problema per introduir una nova espècie són les dificultats que apareixen per tancar els seus cicles en captivitat,



com ha succeït per exemple amb el pop (Quintana *et al.*, 2005; Morote *et al.*, 2005), o el llenguado (Cañalvete *et al.*, 2005; Zerolo *et al.*, 2005). Un altre problema per a la diversificació és el possible rebuig del consumidor si les espècies introduïdes no són conegudes, que fa necessària la creació d'importants campanyes publicitàries que cal considerar (Fernández Aldana *et al.*, 2005).

El bon creixement del sector aquícola està, alhora, lligat a l'existència de pinsos adequats. Els productors busquen dietes que els permetin obtenir bones taxes de creixement, amb baixos costos, i sense alterar les propietats organolèptiques del producte final.

## **1.2. DIETES PER A AQÜICULTURA**

A l'hora de formular una dieta per a una determinada espècie, s'han de considerar els seus requeriments específics, com per exemple el tipus d'alimentació natural (herbívors, omnívors o carnívors) o el seu estadi de desenvolupament (larves, juvenils o adults). Per aquests motius, calen estudis previs que permetin conèixer la fisiologia i les característiques de les diferents espècies (Rus *et al.*, 1999).

Com ja s'ha comentat, a Europa, la major part dels peixos cultivats són carnívors (FAO, 2004), motiu pel qual s'han usat tradicionalment la farina i l'oli de peix com a fonts de proteïna i de greixos en l'elaboració de pinsos, obtenint-se bons creixements i un producte de qualitat.

La farina de peix s'obté a partir de les restes de peixos després de la fabricació de productes pesquers elaborats, a partir de peixos sencers obtinguts de la pesca però de poc valor al mercat, o de peixos sencers cultivats amb aquesta finalitat (FAO, 2004). Aquesta farina de peix presenta un perfil d'aminoàcids, àcids grassos i minerals semblant al de l'animal sencer (Jobling *et al.*, 2001), essent molt adequat per cobrir les necessitats nutricionals dels peixos carnívors, sense que es produeixin imbalanços que alterin el seu metabolisme o creixement (Mambrini i Kaushik, 1994). Aquesta composició és propera al perfil aminoacídic del múscul, com demostren els treballs de Gómez-Requeni *et al.* (2003) o Rollin *et al.* (2003), el qual representa una part important dels peixos. De les captures pesqueres actuals, un 76% es destinen al consum directe, mentre que del 24% restant se n'obtenen farina i oli de peix destinats a la producció de pinsos (FAO, 2004). Però de les 30 tonelades de farina de peix

obtingudes anualment, només 10 reverteixen en la producció de pinsos per aqüicultura, mentre que dues terceres parts es destinen a pinsos per a ramaderia (FAO, 1998), on s'aconsegueixen menors rendiments que en els peixos.

L'oli de peix és ric en els àcids grassos essencials (AGE) omega 3 àcid eicosapentanoic (EPA), àcid docosahexanoic (DHA) i àcid araquidònic (AA), que tenen en els peixos funcions essencials similars a les d'altres vertebrats. Aquestes funcions s'engloben en dues categories: el manteniment de la integritat estructural i funcional de les membranes cel·lulars, i una funció específica com a precursors d'hormones paracrines conegudes com eicosanoids (Sargent *et al.*, 1999). Alguns olis vegetals contenen altes concentracions dels seus precursors -àcid linolèic i àcid linolènic- (Padley, 1986), però s'ha descrit que les taxes de conversió a EPA, DHA i AA són baixes o inexistentes en les espècies marines (Sargent *et al.*, 2002), com per exemple l'orada (Tocher i Ghioni, 1999), el llobarro (Mourente *et al.*, 2005a) o el turbot (Ghioni *et al.*, 1999). Així, l'administració de l'oli de peix a aquests animals permet assegurar la presència dels àcids grassos omega 3 en el producte final, que és un dels principals atractius per al consumidor. S'estima, però, que l'any 2010, la demanda d'oli de peix per a aqüicultura serà d'aproximadament el 90% de la producció total (Barlow, 2000).

Però la disminució de les captures de les espècies destinades a la producció de farina i oli de peix per a fabricar pinsos, així com la retracció de la producció de peixos petits amb la mateixa finalitat en alguns països (FAO, 2004), ha limitat la disponibilitat d'aquests ingredients i n'ha elevat més el cost. Aquesta fet, juntament a la tendència creixent de l'aqüicultura (FAO, 2004), fa necessària la cerca de fonts alternatives a aquests ingredients que siguin alhora sostenibles, econòmicament assumibles, i permetin un bon creixement dels animals (Sargent *et al.*, 1995) i una bona qualitat del producte (Rosenlund *et al.*, 2001).

### **1.2.1. Fonts alternatives a la farina de peix**

S'han testat diversos ingredients per subministrar proteïna de qualitat als peixos cultivats, obtinguent-se resultats diversos. Així, Tacon *et al.* (1983) registraren una dràstica disminució del creixement, per una disminució de la palatabilitat, en alimentar truites irisades amb pinsos que tenien com a base proteica cucs de terra; Skrede *et al.* (1998), en canvi, obtingueren bons resultats en estudiar la digestibilitat i la captació de proteïna d'origen bacterià en salmons; i l'alimentació de silurs juvenils amb pinsos

realitzats amb vísceres de pollastre (Giri *et al.*, 2000) mostrà millores en el creixement malgrat l'afectació de l'activitat digestiva.

Però una de les fonts alternatives que pel moment sembla més viable són les farines vegetals, degut a la seva elevada disponibilitat i el cost assumible de moltes d'elles. En diverses experiències s'ha testat l'efecte de la substitució de la farina de peix per aquestes fonts alternatives en la dieta de diferents espècies (Annex 1 a la introducció, pàg. 27).

Les farines vegetals presenten generalment un perfil d'aminoàcids que difereix dels requeriments dels peixos (Liener, 1980; NRC, 1981; Kaushik i Luquet, 1984). Aquest fet pot portar als animals alimentats amb dietes substituïdes a una limitada disponibilitat d'alguns aminoàcids (Murai *et al.*, 1986; Kaushik 1995; Médale *et al.*, 1998), provocant, en última instància, una disminució del creixement si no s'ajusten les dietes a les necessitats aminoacídiques de l'espècie (Gomes *et al.*, 1995; Venou *et al.*, 2003). Així, si en els primers estudis que abordaven la substitució s'usava una única farina vegetal per reemplaçar la farina de peix de la dieta (de la Higuera *et al.*, 1988; Dabrowski *et al.*, 1989; Sanz *et al.*, 1994; Olvera-Novoa *et al.*, 2002), actualment s'empren mesclades de farines de diferents perfils (Gomes *et al.*, 1995; El-Saidy i Gabber, 2003) i, si és necessari, es suplementa la dieta amb aminoàcids lliures per cobrir els requeriments dels peixos carnívors (Smith *et al.*, 1988; Moyano *et al.*, 1992). Però malgrat els grans avanços realitzats en aquest camp, queden encara inconvenients a tenir en compte, com per exemple que les diferents farines vegetals poden diferir en les digestibilitats que presenten (Alarcón *et al.*, 2002), fent que la disponibilitat de nutrients al lumen intestinal no sigui en forma d'un únic pic, sinó de varis pics repartits al llarg del temps, modificant-se, en conseqüència, la digestió, l'absorció i el metabolisme. D'altra banda, els aminoàcids lliures utilitzats en la suplementació poden aparèixer al lumen intestinal ràpidament i ser absorbits en zones intestinals molt properes a l'estómac, aportant a l'animal un perfil aminoacídic concret que difereix dels requeriments del moment.

Algunes farines vegetals, com per exemple la farina de soja o la de tramussos, són altament digeribles i aporten una proteïna de qualitat (Todorov *et al.*, 1996; Médale *et al.*, 1998, Storebakken *et al.*, 2000; Glencross, 2001). Però s'ha de considerar que contenen elevades concentracions de factors antinutricionals, un grup de molècules variat i extens que pot interferir en la utilització de l'aliment i/o afectar la salut dels peixos, especialment la dels carnívors (Makkar, 1993). L'annex 2 de la introducció (pàg. 29) sumaritza els factors antinutricionals presents en les farines vegetals més

utilitzades per a la substitució de la farina de peix de les dietes d'aqüicultura. Cada tipus vegetal presenta un o més d'aquests compostos en diferents quantitats (Tacon *et al.*, 1995; Francis *et al.*, 2001), els quals poden actuar a diferents nivells. Així, per exemple, els inhibidors de proteases afecten l'activitat proteolítica intestinal per la formació de complexos específics (Moyano *et al.*, 1999), o per la supressió del mecanisme de retroalimentació pancreàtic (Dabrowski *et al.*, 1989) que permet l'alliberació al lumen intestinal de zimògens que en activar-se col·laboren en la digestió de les proteïnes (Linder, 1985). Un altre exemple són els fitats, que formen complexos amb les proteïnes disminuint-ne la disponibilitat (Richardson *et al.*, 1985), i que poden provocar hipertròfia dels cecs pilòrics i vacuolarització del citoplasma de l'epiteli intestinal (Hossain i Jauncey, 1989). Les saponines, d'altra banda, poden afectar el creixement a causa d'una alteració de la morfologia intestinal i una disminució de l'activitat enzimàtica de la mucosa de l'intestí distal (Krogdahl *et al.*, 1995). Una relació de factors antinutricionals, els vegetals que els contenen i els seus efectes en els peixos es resumeix a l'annex 3 d'aquest apartat (pàg. 31).

Tot i que les farines vegetals poden tractar-se per disminuir la presència de factors antinutricionals (Annex 3 a la introducció, pàg. 31), la combinació de les farines adequades pot permetre regular la quantitat de factors antinutricionals presents en la dieta per la formació de complexos entre ells (Fish i Thompson, 1991; Makkar *et al.*, 1995), aconseguint que estiguin en concentracions inoques per l'animal (Alarcón *et al.*, 2002).

### **1.2.2. Fonts alternatives a l'oli de peix**

La cerca d'alternatives a l'oli de peix és també una prioritat per als nutròlegs de peixos. Com en el cas de la farina de peix, s'estan estudiant diverses possibilitats (Annex 4 a la introducció, pàg. 33). La substitució de l'oli de peix per altres fonts de greixos rarament altera les taxes de creixement (Caballero *et al.*, 2002; Figueredo-Silva *et al.*, 2005; Mourente *et al.*, 2005a,b), però pot tenir altres efectes; així, per exemple, la utilització de llard de porc en llobarro (Xue *et al.*, 2006) modificà el contingut de lípids de la carcassa i el fetge. Hoehne-Reitan *et al.* (2006) utilitzaren oli de copèpodes en dietes per a bacallà, i Carter *et al.*, (2003) testaren amb èxit en salmons una dieta formulada amb oli derivat d'un microorganisme marí que presenta una elevada concentració de DHA tot i que, en ambdós casos, l'elevat cost de les dietes és un factor limitant per a la seva aplicabilitat comercial.

S'estan testant també diversos olis vegetals (Caballero *et al.*, 2002; Glencross *et al.*, 2003; Mourente *et al.*, 2005a,b). Aquests, estan virtualment lliures de contaminants orgànics (Figueiredo-Silva *et al.*, 2005) i la seva producció és molt superior a la producció d'oli de peix (Bimbo, 1990). Però els olis vegetals presenten un perfil d'àcids grassos que difereix del de l'oli de peix, ja que la seva concentració en alguns àcids grassos essencials (AGEs) omega 3 és molt baixa. Cal tenir en compte que en els peixos, els àcids grassos poliinsaturats de 18 carbonis (C<sub>18</sub> PUFA) linolènic (18:3 n-3), linolènic (18:2 n-6) i olèic (18:1 n-9), pertanyents als AGEs, no poden sintetitzar-se de nou (Holman, 1986). Aquests compostos són convertits en els n-3 HUFAs àcid eicosopentanoic (EPA; 20:5 n-3), àcid docosahexanoic (DHA; 20:6 n-3) i àcid araquidònic (AA; 20:4 n-3) en els peixos d'aigua dolça. En els peixos marins, però, tot i presentar l'equipament enzimàtic necessari per a la conversió, aquesta es presenta a unes taxes molt baixes o pràcticament inexistentes (Sargent *et al.*, 2002; Mourente *et al.*, 2005a) perquè no existeix una correcta regulació dels processos de desaturació/elongació que permeten obtenir-los en els hepatòcits i enteròcits (Bell *et al.*, 2001, 2002; Tocher *et al.*, 2001, 2003, 2004) ni tan sols en administrar als animals olis vegetals rics en els seus precursors (Tocher *et al.*, 2002) com per exemple l'oli de llinosa (Padley *et al.*, 1989). Aquestes diferències en el metabolisme dels dos grups de peixos suggereixen una adaptació dietària i metabòlica a diferents hàbitats (Sargent *et al.*, 1999), regulant-se a la baixa els enzims clau per la formació d'AGE en els peixos adaptats a un ambient on la dieta és rica en HUFA (Sargent *et al.*, 2002). Per aquest motiu, els requeriments d'àcids grassos de les espècies cultivades marines o d'aigua dolça poden diferir significativament (Sargent *et al.*, 1999).

Els àcids grassos n-3 HUFA són un dels principals valors dels productes aquícoles, i per això es fa necessari l'estudi de l'afectació del metabolisme lipídic en substituir l'oli de peix per olis vegetals en la dieta. S'ha descrit que la utilització d'olis vegetals a percentatges mitjans (30-50%) altera la composició d'àcids grassos dels filets, disminuint els nivells de n-3 HUFA (Bell *et al.*, 2001, 2002). Aquestes alteracions poden afectar, en darrera instància, la qualitat del producte final (Kaushik *et al.*, 1995), fent necessària la utilització de dietes de finalització (Glencross *et al.*, 2003; Turchini *et al.*, 2003) amb elevats continguts d'oli de peix per tal de reestablir el perfil d'àcids grassos requerit pels consumidors (Glencross *et al.*, 2003). Els olis vegetals, d'altra banda, poden provocar alteracions en la histologia hepàtica (Bell *et al.*, 1995; Tucker *et al.*, 1997; Figueiredo-Silva *et al.*, 2005) o la histologia intestinal (Olsen *et al.*, 1999, 2000, Caballero *et al.*, 2002) per formació de vacuoles lipídiques.

### 1.2.3. La doble substitució

Actualment, i degut a la limitada disponibilitat de la farina i l'oli de peix (Naylor *et al.*, 2000; FAO, 2004), s'està abordant la substitució simultània d'aquestes dues matèries primeres.

S'ha descrit que alts percentatges de substitució bé de la farina, bé de l'oli, poden aplicar-se sense causar disminucions importants en el creixement. Però, és possible reemplaçar conjuntament les fonts de proteïna i lípid de peix sense que aquest creixement es modifiqui? I, si no és així i existeixen limitacions, és prioritària la substitució de la farina o la substitució de l'oli?

Des del moment en què un 100% de farina vegetal pot causar un decrement del creixement dels animals (Annex 1 de l'introducció, pàg. 27), i que el reemplaçament total de l'oli de peix no afecta de manera significativa aquest paràmetre (Annex 4 de l'introducció, pàg. 33) s'està optant per substituir la farina de peix en elevats –però no totals- percentatges, intentant arribar a una substitució total de l'oli de peix, ja que la farina de peix conté entre un 5 i un 10% d'oli de peix (Jobling *et al.*, 2001) que pot ser suficient per cobrir els requeriments d'àcids grassos essencials de les espècies cultivades.

### 1.3. EL SÍNDROME D'HIVERN

El cultiu de l'orada ha esdevingut una pràctica comú les últimes dècades a la costa Mediterrània per la seva gran acceptació al mercat, un cultiu ben establert amb el cicle tancat, i la disponibilitat de dietes que aconsegueixen bones taxes de creixement.

En algunes latituds de la costa Nord-Mediterrània, però, s'han detectat als cultius taxes de mortalitat crònica durant els mesos freds, i episodis de mortalitat aguda a principis de primavera (Tort *et al.*, 1998a; Sarusic, 1999). Els pics de mortalitat poden ser alts en el primer any de cultiu, arribant al 80% en casos extrems (Padrós *et al.*, 1998), ocasionant-se pèrdues econòmiques que poden ser importants (Tort *et al.*, 2004). Aquest fenomen, conegut amb el nom de 'síndrome d'hivern', s'ha relacionat amb la baixa temperatura de l'aigua a la que poden enfrontar-se les orades cultivades durant els mesos més freds (Ibarz *et al.*, 2003; Sala-Rabanal *et al.*, 2003): a diferència de les orades salvatges, que habiten en un rang de temperatura d'entre 11 i 23°C i migren a aigües més profundes quan la temperatura de l'aigua superficial comença a disminuir (Davis, 1988), les orades cultivades estan confinades en gàbies o basses, la temperatura de les quals pot baixar per sota de les temperatures òptimes.

La simptomatologia de la malaltia d'hivern inclou letargia, natació erràtica, i una reacció mínima als estímuls externs. Els peixos afectats presenten pesos inferiors a la mitjana del cultiu i una gran varietat d'alteracions funcionals i tissulars (Gallardo *et al.*, 2003). Així, en les orades afectades, s'ha descrit una disminució de l'hematòcrit i la glucèmia, i un increment dels nivells d'aminoàcids (Gallardo *et al.*, 2003; Sala-Rabanal *et al.*, 2003). Aquests peixos presenten també necrosi muscular i atrofia pancreàtica (Galeotti *et al.*, 1998; Tort *et al.*, 1998a,b; Contessi *et al.*, 2000). L'increment dels nivells de GOT plasmàtica (Gallardo *et al.*, 2003) i una severa infiltració lipídica al fetge (Tort *et al.*, 1998a; Gallardo *et al.*, 2003) suggereix que aquesta malaltia podria estar relacionada amb una disfunció hepàtica. El tracte digestiu dels animals simptomàtics està també afectat, presentant generalment material fibromucós al llarg de l'intestí, el qual pot aparèixer distès i ple d'un líquid blanquinós (Gallardo *et al.*, 2003). La mucosa intestinal presenta una significant hiperplàsia de les cèl·lules mucoses, i sovint la lamina propia presenta edema (Bovo *et al.*, 1995; Padrós *et al.*, 1998; Tort *et al.*, 1998b; Contessi *et al.*, 2000).

El síndrome d'hivern té un origen multifactorial. Així, la baixa temperatura de l'aigua a la que s'han d'enfrontar els animals durant els mesos d'hivern provoca danys en els teixits (Tort *et al.*, 1998a). Aquest fet, juntament a la manipulació a la que poden estar sotmesos (Flos *et al.*, 1990) pot provocar una situació d'estrès que immunosuprimeix els animals (Pagès *et al.*, 1995; Tort *et al.*, 1996; Tort *et al.*, 1998a) i incrementa la seva susceptibilitat a patògens oportunistes, com s'ha descrit en altres espècies (Pickering i Pottinger, 1985).

El reemplaçament de la farina i l'oli de peix en les dietes d'aqüicultura, i l'estudi del síndrome d'hivern, fan necessaris estudis multidisciplinars que, a partir d'animals sotmesos a les mateixes condicions experimentals, permetin estudiar els efectes de les dietes testades sobre funcions molt diverses, aconseguint així una visió general i integrada dels fenòmens que tenen lloc.

Els estudis que es presentaran en aquest treball formen part de projectes més amplis, en els quals l'estudi dels processos de digestió i absorció era una part més, necessària per assolir una visió global dels efectes produïts per les diferents dietes testades.

#### **1.4. L'APARELL DIGESTIU DELS PEIXOS**

Encara que s'ha descrit una gran diversitat en l'anatomia del tub digestiu dels peixos (Smith, 1989) en resposta a la dieta natural i l'evolució de les espècies (Buddington *et al.*, 1997), existeixen algunes generalitats (Guillaume i Courbet, 2002): l'esòfag presenta una musculatura estriada, i generalment està seguit d'un estómac amb una histologia homogènia i poc diferenciada respecte la dels vertebrats superiors, amb un epiteli endodèrmic en el que es distingeixen glàndules de cèl·lules secretores de proenzims i àcid clorhídric, o bé d'hormones o mucus. Seguidament apareix l'intestí, que és un òrgan multifuncional, ja que a més de digerir i absorbir l'aliment, participa en el manteniment del balanç d'aigua i electròlits, així com en la regulació endocrina de la digestió (Buddington *et al.*, 1997). La seva longitud està directament relacionada amb la quantitat de proteïna de la dieta (Kramer i Briant, 1995), essent generalment curts els intestins de peixos carnívors i més llargs els dels herbívors (Stevens, 1988).

Estudis histològics permeten identificar regions amb funcions diferenciades al llarg del tub, però no sempre existeix una diferenciació anatòmica externa. Aquesta manca de diferenciació externa pot comportar dificultats a l'hora de distingir els segments intestinals: alguns autors parlen d'una zona proximal a la sortida de l'estómac, una zona mitja, i una zona distal final curta, mentre que d'altres distingeixen només dos segments: un de proximal i un de distal que engloba les parts mitja i final del tub (Guillaume i Chourbet, 2002). Molts peixos presenten a la sortida de l'estómac uns divertacles cecs anomenats cecs pilòrics, d'estructura histològica similar a l'intestí proximal. El seu nombre és molt variable, i la seva funció encara no està clara, malgrat que sembla que en ells no té lloc cap fenomen particular de secreció o absorció, i es consideren una extensió de la superfície absorptiva de l'intestí (Guillaume i Chourbet, 2002).



Histològicament, a l'intestí dels peixos es diferencien 3 capes: la mucosa, la muscular i la serosa, ja que l'absència de *muscularis mucosae* impedeix la distinció entre mucosa i submucosa que sí presenten l'intestí prim dels mamífers o l'intestí de les aus (Guillaume i Chourbet, 2002). La mucosa intestinal proximal dels peixos recorda la dels vertebrats superiors, encara que les vellositats no estan ben individualitzades i són més aviat pseudovellositats, que multipliquen la superfície absorptiva del tub (Fig. 4). Les cèl·lules intestinals s'originen a les zones més profundes, i es diferencien en la migració al llarg de les pseudovellositats (Trier i Moxey, 1980) per portar a terme les seves funcions com a cèl·lules secretores de mucus, o cèl·lules absorbents amb microvillis més llargs que els dels mamífers (Buddington *et al.*, 1987). Seguidament es troba un segment intestinal amb unes característiques histològiques concretes, ja que alguns enteròcits (5-10%) presenten nombroses invaginacions a la base de les microvellositats, i són els encarregats de l'absorció de material proteic. Al segment intestinal més posterior, els enteròcits tenen els microvilli curts i poques característiques de cèl·lules absorbents, però tenen un elevat nombre de mitocondries. Aquesta zona sembla tenir un important paper en la osmoregulació (Buddington *et al.*, 1997).

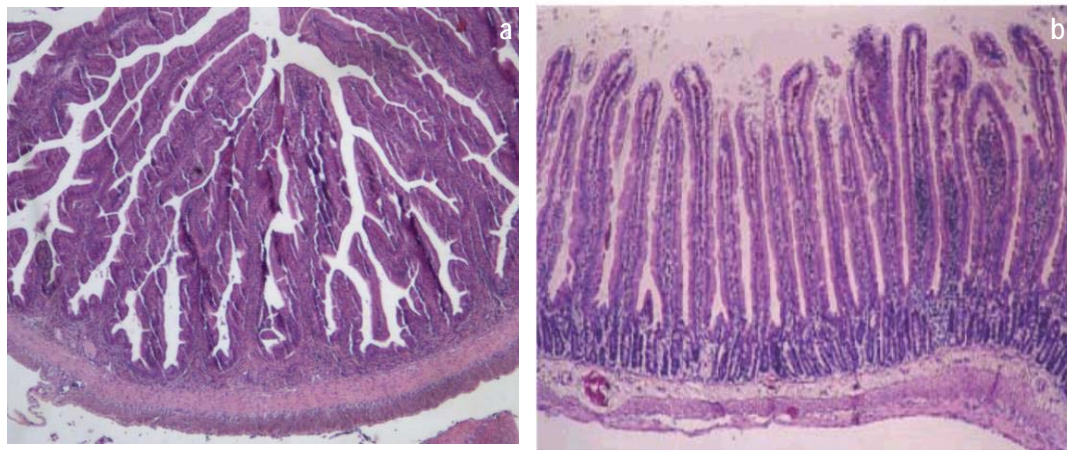


Figura 4. Tall histològic transversal de l'intestí proximal d'orada (a) i de rata (b). 4x.

Els enteròcits (Fig. 5a) són cèl·lules polaritzades amb diferències en l'activitat enzimàtica i la distribució de mecanismes específics per al pas de substàncies a través de la membrana apical o la membrana basolateral (Buddington *et al.*, 1997). Les cèl·lules mucoses (Fig. 5b) presenten una massa viscosa a la zona apical, i habitualment es troben en igual nombre al llarg de tot el tracte intestinal (Buddington *et al.*, 1997).

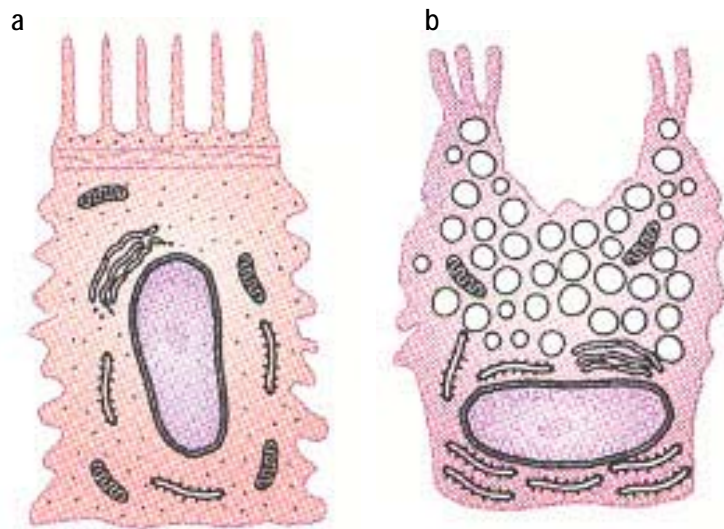


Figura 5. Enteròcit (a) i cèl·lula mucosa (b).

#### *L'aparell digestiu de l'orada*

L'orada és un peix carnívor, que pot comportar-se com a omnívor ocasional (De Sostoa, 1990). El seu esòfag és curt i ample, i està seguit d'un estómac sifonal (Grassé, 1958) (Fig. 6). Seguidament apareix l'intestí proximal, en el qual hi ha 4 cecs pilòrics (Elbal i Agulleiro, 1986). L'intestí proximal és ample, i està adaptat a rebre una elevada càrrega de nutrients (Buddington *et al.*, 1997). El segueix una zona distal més prima, que presenta generalment una menor capacitat de captació de substrats (Sala-Rabanal *et al.*, 2004). Les zones intestinals proximal i distal es diferencien també per les característiques de la capa mucosa, que a la part proximal presenta majoritàriament cèl·lules absortives mentre que en la distal apareixen vesícules al citoplasma apical, indicant la seva funció pinocitòtica (Elbal i Agulleiro, 1986). Les cèl·lules mucoses presenten una distribució uniforme al llarg de l'epiteli intestinal, sense formar glàndules, com en altres teleostis (Bishop i Odense, 1966). Finalment, el tracte digestiu incrementa novament el diàmetre per formar el recte, que té una longitud relativa d'aproximadament 1:10 respecte la resta de l'intestí. La composició del mucus d'aquesta zona no presenta variacions respecte la resta de secrecions intestinals (Reifel i Travill, 1979).

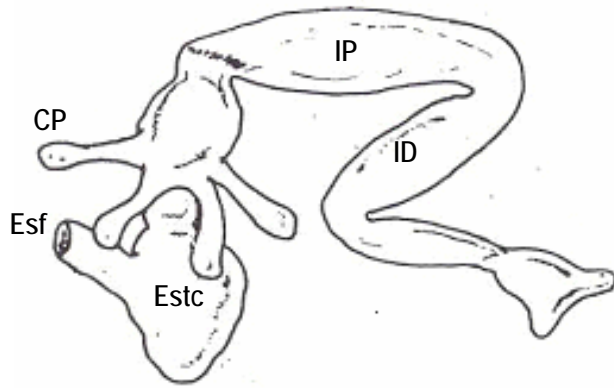


Figura 6. Esquema del tracte digestiu de l'orada. Es poden diferenciar l'esòfag (Esf), l'estómac (Estc), els cecs pilòrics (CP), l'intestí proximal (IP) i l'intestí distal (ID).

#### *L'aparell digestiu de la truita*

La truita és un peix d'hàbits carnívors. El seu esòfag és curt, i es comunica amb un estómac en forma de Y. A la sortida d'aquest hi ha els cecs pilòrics, que són molt nombrosos, encara que el seu nombre varia depenent de factors genètics modificables per la selecció, o per la temperatura de l'aigua durant el desenvolupament (Guillaume i Chourbet, 2002). L'intestí proximal presenta poques diferències externes amb l'intestí distal, que desemboca al recte (Fig. 7). Al llarg del tub, però, l'epiteli mostra un canvi des de cèl·lules columnars cap a un epitelí escamós que segrega principalment mucos, canvis distingibles *a visu*.

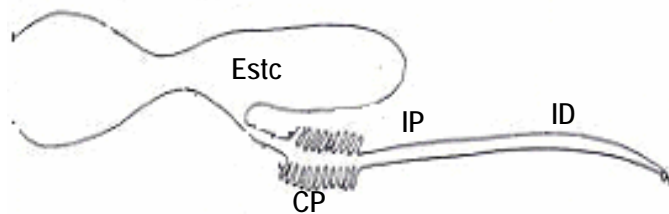


Figura 7. Esquema del tracte digestiu de la truita. Es poden diferenciar l'estómac (Estc), els cecs pilòrics (CP), l'intestí proximal (IP) i l'intestí distal (ID).

#### **1.4.1. Requeriments nutricionals de les espècies carnívores**

L'intestí dels peixos carnívors ha evolucionat per processar dietes que poden variar segons les estacions. Els carnívors cacen unes preses o altres en funció de la seva abundància, i això pot fer variar la proporció de macronutrients (grasses i proteïnes) així com els percentatges de materials indigeribles com la quitina (Lie *et al.*, 1994). Però malgrat això, l'aport de carbohidrats és generalment baix (Buddington *et al.*, 1997) i en conseqüència aquests animals presenten una limitada habilitat per modular els processos digestius que permeten assimilar-los (Buddington i Hilton, 1987; Cahu i Infante, 1995).

Aquest fet, junt a que el percentatge de proteïna requerit és superior que en la dieta de peixos és superior que en la de mamífers, té com a resultat un major requeriment

proteic, i fa que els peixos carnívors presentin una limitada eficiència a l'hora d'utilitzar les dietes amb molts carbohidrats i poca proteïna (Buddington *et al.*, 1997) que permetrien abaratir els costos de l'alimentació en piscicultura.

L'aport de lípids en l'alimentació dels peixos, igual que en la de mamífers, és una font d'energia necessària per a un bon creixement, i d'ells depèn la integritat de les membranes cel·lulars. Els lípids més importants per als peixos són els triglicèrids i els fosfolípids (Corraze, 2002), i és també necessari cobrir els requeriments d'àcids grassos essencials, no sintetitzables per l'organisme i necessaris per a alguns processos metabòlics, com per exemple la síntesi de prostaglandines (Sargent *et al.*, 1995).

Els requeriments de vitamines (Gouillou-Coustans i Guillaume, 2002) i minerals (Kaushik, 2002b) dels peixos són qualitativament similars als dels vertebrats superiors, encara que les necessitats quantitatives han estat menys estudiades.

## **1.5. DIGESTIÓ I ABSORCIÓ DE NUTRIENTS**

### **1.5.1. La digestió**

La digestió permet als animals convertir les proteïnes, lípids i carbohidrats ingerits en formes que poden ser absorbides i utilitzades en diferents processos metabòlics. La digestió mecànica, facilitada pels moviments peristàltics estomacals i intestinals, així com el pH al qual té lloc la digestió, són importants en el procés, el qual depèn també de la secreció d'enzims que actuen a nivell del tub digestiu.

#### *La digestió de les proteïnes*

La digestió de les proteïnes comença a l'estómac, on són desnaturalitzades per acció de l'àcid clorhídric i parcialment hidrolitzades per la pepsina. Continua a l'intestí gràcies a l'activitat proteasa alcalina de la tripsina i la quimotripsina pancreàtiques, i altres peptidases d'origen intestinal (Linder, 1985). Aquests enzims són específics, ja que necessiten de l'existència d'unions espacials entre els seus centres actius i els grups diana del substrat (Hoar, 1983). La tripsina i la quimotripsina són segregades pel pàncrees en forma de zimògens: el tripsinògen, que passa a tripsina per acció de l'enteroquinasa o de la mateixa tripsina; i el quimotripsinògen, que és activat per acció de la tripsina. Ambdós enzims són endopeptidases que hidrolitzen els enllaços peptídics localitzats al centre de la proteïna. La tripsina té afinitat pels grups carboxil de l'arginina i la lisina, mentre que la quimotripsina actua sobre els grups carboxil d'aminoàcids aromàtics (Hoar, 1983). Aquestes endopeptidases pertanyen a un grup

més extens, el de les serinproteases, que es caracteritzen per una seqüència tetrapeptídica (glicina-asparagina-serina-glicina) al centre actiu, amb la serina com a component funcional (Prosser, 1991). Els pèptids resultants de l'acció de les proteases luminals són posteriorment hidrolitzats per peptidases localitzades a la membrana apical dels enteròcits (Buddington *et al.*, 1997), les activitats de les quals varien al llarg de l'intestí, disminuint des de la zona proximal fins a la distal (Brudeseth, 1996).

Les proteases digestives dels peixos són similars a les dels mamífers (Kawai, 1971), i la majoria de pèptids i hormones que en controlen les funcions són iguals en vertebrats i en peixos (Takii, 1985; Munilla-Morán *et al.*, 1990). L'activitat proteolítica digestiva està relacionada amb la composició natural de la dieta (Ugolev i Kuz'mina, 1994); en algunes espècies no carnívores s'ha descrit un major potencial proteolític que en les carnívores (Kuz'mina, 1990; Hidalgo *et al.*, 1999) que s'ha relacionat amb la difícil digestió de la proteïna vegetal, i que indicaria que malgrat que els omnívors necessiten un aport proteic menor que els carnívors, aquest s'ha d'utilitzar bé. Cal tenir present, però, que l'equipament intestinal de proteases en diferents espècies de peixos adaptades a dietes similars pot presentar també diferències (Alarcón *et al.*, 1998). S'ha descrit, d'altra banda, que els peixos carnívors tenen capacitat per modular algunes de les proteases pancreàtiques en resposta a la composició de la dieta administrada (Krogdahl *et al.*, 1994; Buddington *et al.*, 1997).

#### *La digestió dels carbohidrats*

Encara que hi ha molts tipus de carbohidrats, només alguns tenen valor nutritiu en l'alimentació dels peixos: les hexoses (glucosa), els disacàrids i alguns homopolisacàrids com per exemple el midó. Altres glúcids tenen una funció nutricional secundària, o fins i tot negativa si es troben en elevades concentracions, com per exemple les fibres.

Tot i que els glúcids no són essencials en l'alimentació dels peixos carnívors, i que aquests animals tenen una baixa capacitat per utilitzar-los (Hung i Storebakken, 1994; Kaushik, 2002a), són una font d'energia poc costosa. La digestió del glúcids depèn primerament de les glucosidases. La més important és la  $\alpha$ -amilasa, segregada pel pàncrees i que s'ha trobat en tots els peixos (Kaushik, 2002a). L' $\alpha$ -amilasa hidrolitza els enllaços  $\alpha$  (1-4) de l'amilosa o fragments lineals de glucògen, atacant internament les cadenes lineals, hidrolitzant-les a maltosa, i deixant residus variables. L'activitat d'aquesta carbohidrasa pancreàtica sembla estar genèticament programada per ser baixa (Cahu i Infante, 1995).

Els disacàrids resultants d'aquesta primera digestió són posteriorment hidrolitzats per disacaridases localitzades a la membrana intestinal (Buddington *et al.*, 1997), l'activitat de les quals declina des de la zona proximal fins a la distal (Buddington i Hilton, 1987; Brudeseth, 1996) i depèn de la composició de la dieta natural (Ugolev i Kuz'mina, 1994), essent, per exemple, molt superiors en els peixos herbívors en relació a les espècies carnívores. S'ha descrit que alguns omnívors, com la tilapia, no poden modular les disacaridases de membrana en resposta a la composició de la dieta (Shiau i Chuang, 1995).

#### *La digestió dels lípids*

Els lípids més abundants en la dieta són els triacilglicèrids, que són degradats per la lipasa; i els fosfolípids, que són digerits gràcies a l'acció de la fosfolipasa.

La lipasa és d'origen pancreàtic, i té una estructura molt similar a la de les proteases de la família serínica (Voet i Voet, 1995). És segregada al lumen intestinal en la seva forma activa, i la seva activitat depèn de la presència de la colipasa, sintetitzada també al pàncrees (Corraze, 2002). Com que les grasses són insolubles, abans de ser processades al contingut aquós del tub digestiu, són emulsionades gràcies a les sals biliars d'origen hepàtic. La unió de la colipasa a les sals biliars de la gota lípidica permet que la lipasa s'uneixi al complexe i pugui catalitzar la hidròlisi dels triacilglicèrids per formar diacilglicèrids i acilglicerols (Pérez *et al.*, 1986).

La fosfolipasa pancreàtica degrada els fosfolípids de la dieta, i separa la resta de l'àcid gras en dos carbonis, originant els lisofosfolípids corresponents (Voet i Voet, 1995).

#### **1.5.2. L'absorció dels nutrients**

Els productes resultants de la digestió de les macromolècules (pèptids, aminoàcids, hexoses, àcids grassos,...) són absorbits pels enteròcits. Els mecanismes d'absorció dels peixos han estat àmpliament descrits (Smith, 1983; Ferraris i Ahearn, 1984; Storelli *et al.*, 1989; Collie i Ferraris, 1995) i són similars als de mamífers, encara que les taxes són menors (Reshkin i Ahearn, 1987a,b) per una menor densitat de transportadors i/o una menor àrea absorptiva en relació als mamífers (Collie i Ferraris, 1995). Aquestes taxes estan genèticament programades d'acord amb la composició natural de la dieta (Ferraris i Ahearn, 1984; Buddington *et al.*, 1987). Així, la captació de sucres en peixos carnívors és menor en comparació a la d'omnívors i herbívors, mentre que l'absorció d'aminoàcids és semblant en els 3 grups (Buddington *et al.*, 1987). En els peixos carnívors, però, els fluxes transepitelials de nutrients de la part distal de l'intestí poden superar els de la part proximal, contràriament al que succeeix

en herbívors (Ferraris i Ahearn, 1983) que presenten generalment intestins de major longitud (Karmer i Bryant, 1995). S'ha descrit també que els peixos d'aigua dolça poden acumular als enteròcits concentracions de sucres i aminoàcids que superen les que presenten aquests nutrients al lumen intestinal, mentre que en els peixos marins aquest fenomen no té lloc (Ferraris i Ahearn, 1984).

L'absorció es produeix per fenòmens de difusió simple, difusió facilitada i transport actiu. La difusió simple és proporcional al gradient i segueix cinètiques no asimptòtiques. És minoritària per les molècules hidrosolubles i, en canvi, sembla ser comuna pels productes hidròfobs resultants de la degradació de lípids (Guillaume i Choubert, 2002). L'absorció per difusió facilitada i transport actiu, utilitzats per a la captació d'aminoàcids i glucosa, segueix cinètiques asimptòtiques, i depèn de la presència de molècules proteïques inmerses a la bicapa lipídica. Breuement, la transferència dels nutrients hidrosolubles des del lumen intestinal fins a la sang requereix dos grups de transportadors: d'una banda, els enteròcits acumulen aminoàcids, sucres, àcids nucleics i altres soluts solubles per la combinació del transport actiu dependent d'energia, i de la difusió facilitada independent d'ATP a la membrana apical (Casirola *et al.*, 1995); de l'altra, els nutrients passen des dels enteròcits a la circulació sistèmica a través de transportadors de difusió facilitada localitzats a la membrana basolateral.

#### *Els aminoàcids, els oligopèptids i els seus transportadors*

L'estructura química dels aminoàcids i la càrrega elèctrica que presenten a pH fisiològic dificulta el seu pas a través de les membranes cel·lulars, tot i l'existència d'un gradient electroquímic favorable. Per aquest motiu, l'absorció d'aminoàcids, a més del transport per difusió passiva, està mitjançat també per proteïnes transportadores tant en mamífers (Munck i Munck, 1994) com en peixos (Ferraris i Ahearn, 1984; Storelli *et al.*, 1989), tot i que s'han descrit diferències en l'especificitat d'alguns dels sistemes de transport entre els dos grups d'animals (Collie i Ferraris, 1995). S'han establert menors taxes d'absorció en peixos que en mamífers (Ferraris i Ahearn, 1984; Storelli *et al.*, 1989; Buddington *et al.*, 1991), possiblement per una menor densitat de transportadors per unitat de superfície en els primers (Ferraris i Ahearn, 1984; Buddington *et al.*, 1987; Storelli *et al.*, 1989), encara que a diferència del que succeeix en mamífers, els transportadors d'aminoàcids en peixos es localitzen al llarg de tot el tub digestiu postgàstric (Buddington *et al.*, 1997).

Igual que en els mamífers, en els peixos existeixen evidències de que hi ha especificitats solapades d'aminoàcids en les diferents classes de transportadors, cadascun dels quals presenta diferent afinitat per un determinat aminoàcid (Storelli *et al.*, 1989; Vilella *et al.*, 1990). D'altra banda, gran part de la proteïna dietària s'absorbeix en forma de pèptids en mamífers (Adibi, 1997) i en peixos (Bogé *et al.*, 1981; Reskin i Ahearn, 1991). Així, tant en peixos carnívors com en herbívors, s'ha descrit un transport de dipèptids dependent d'energia (Thamotharan *et al.*, 1996a), i s'ha vist que els dipèptids acumulats a l'enteròcit assoleixen el torrent sanguini a través d'una via saturable independent d'energia localitzada a la membrana basolateral (Thamotharan *et al.*, 1996b).

S'ha establert l'existència de diferents tipus de transportadors d'aminoàcids a la membrana apical en base als seus substrats (Taula 3), amb canvis quantitius al llarg de l'intestí (Ahearn i Storelli, 1994) i patrons de distribució que poden variar dependent de les espècies (Buddington *et al.*, 1987). Així, la utilització de sacs invertits ha establert un transport decreixent d'aminoàcids a l'avançar al llarg del tub intestinal en diferents espècies de peixos, inclosos els salmònids (Ferraris i Ahearn, 1984; Buddington i Diamond, 1987; Bakke-McKellep *et al.*, 2000). Tot i que en les espècies carnívores s'ha descrit una major absorció a la zona distal de l'intestí en utilitzar VMAs. En els peixos, les taxes de transport d'aminoàcids estan genèticament programades d'acord amb la composició natural de la dieta (Ferraris i Ahearn, 1984; Buddington *et al.*, 1987), tot i que varien depenent dels aminoàcids o pèptids estudiats malgrat comparar espècies amb hàbits alimentaris similars (Buddington *et al.*, 1987).

En alguns mamífers, el transport d'aminoàcids està modulats en resposta a canvis a la dieta (Buddington *et al.*, 1991). En canvi, la tilàpia no ha mostrat variacions en la capacitat d'absorció en variar la quantitat de proteïna del pinso (Titus *et al.*, 1991).

Taula 3. Mecanismes de transport utilitzats per l'absorció de diferents aminoàcids en peixos.

Mecanisme de transport	Na <sup>+</sup>	Substrat
B	+	Aa neutres, L-Phe, L-Pro
IMINO	+	L-Pro, MeAIB (Phe)
PHE	+	L-Phe
XAG-	+	L-Glu, L-Asp
B <sup>0,+</sup>	+	L-Lys, L-Arg
aSC	-	L-Ala
b <sup>0,+</sup>	-	L-Lys

Es detallen els sistemes de transport estudiats en aquest treball. Na<sup>+</sup>: dependència de sodi. Font: Ahearn i Storelli, 1994.



### *El transport de la glucosa*

En els peixos, els mecanismes de transport de la glucosa són similars als de mamífers. Així, l'absorció de D-glucosa està mitjançada pel transportador d'hexosa SGLT-1 localitzat a la membrana apical de l'enteròcit, que s'ha caracteritzat com un sistema dependent de sodi, sensible a la florzina i fortament inhibible per  $\alpha$ -metil-D-glucosa i D-galactosa (Ferraris i Ahearn, 1984; Storelli *et al.*, 1986; Ahearn i Storelli, 1994; Sala-Rabanal, 2004). A aquest sistema de transport el segueix un fenomen de difusió facilitada a través de la membrana basolateral fins a la sang (Reshkin i Ahearn, 1987a).

A més, s'ha establert que les taxes de captació de sucres en peixos carnívors són menors a les taxes registrades en herbívors o omnívors (Buddington *et al.*, 1997). En l'orada, s'ha descrit que la captació de D-glucosa disminueix a mesura que s'avança en el tub digestiu (Sala-Rabanal *et al.*, 2004), com s'havia descrit ja en altres espècies carnívores (Buddington *et al.*, 1987). En els peixos herbívors, a més, s'ha localitzat una menor afinitat per al transport de D-glucosa a la zona proximal en relació a la zona distal utilitzant bé vesícules de membrana apical (Reshkin i Ahearn, 1987), bé en preparacions aïllades d'intestí (Ferraris i Ahearn, 1984).

### *L'absorció de lípids*

En els peixos, com en altres animals, l'absorció de lípids es realitza gràcies a unes partícules anomenades micel·les, formades per àcids grassos, monoacilglicerols (residus de la hidròlisi dels triacilglicèrids per acció de la lipasa pancreàtica) però també de fosfolípids, colesterol i àcids biliars. Aquests complexos lipídics difonen a través de la bicapa lipídica després de la degradació de la micel·la, i són resintetitzats en triacilglicèrids al reticle endoplasmàtic i l'aparell de golgi.



## **ANNEXES A LA INTRODUCCIÓ**



Annex 1. Efectes de la substitució de la farina de peix per farines d'origen vegetal en la dieta de peixos.

Espècie	Fonts alternatives	% d'inclusió (% de reemplaçament de la farina de peix)	Efectes	Referència
Orada	Farina de soja	10, 20, 30 (de 10 a 30)	Creixements similars al control Grup de 30% d'inclusió: activitat tripsina retardada i deposició de lípids al fetge	Robaina <i>et al.</i> , 1995
	Farina de tramussos		Creixements similars al control Activitat tripsina retardada en el grup amb un 30% d'inclusió	
Orada	Concentrats de soja i colza	de 30 a 100 (de 30 a 100)	La màxima substitució disminueix el creixement i la ingesta Disminució de la retenció de proteïnes amb la dieta 100% soja Disminució del contingut de lípids en els animals alimentats amb les dietes de major reemplaçament	Kissil <i>et al.</i> , 2000
Orada	Extrusionats de blat i de blat de moro	40 (40)	Disminució del creixement segons la font utilitzada Afectació de les activitats tripsina i $\alpha$ -amilasa Alteracions en l'índex hepatosomàtic	Venou <i>et al.</i> , 2003
Truita irisada	Farina de soja	32 (40)	No diferències en el pes final assolit i l'índex de creixement específic Ingesta superior en els animals alimentats amb les dietes que contenen soja	Sanz <i>et al.</i> , 1994
Truita irisada	Diferents tipus de soja	de 21 a 30 (30)	Les taxes de creixement dels grups alimentats amb soja foren en general millors que les del grup control	Oliva-Teles <i>et al.</i> , 1994
Truita irisada	Barreja de farines de tramussos, faves, pèsols, blat de moro i soja	de 33 a 100 (de 33 a 100)	Disminució del creixement però increment de la ingesta en els animals alimentats amb la dieta amb 100% de substitució No diferències en l'eficiència proteica	Gomes <i>et al.</i> , 1995
Truita irisada	Concentrat de proteïna de soja	de 22 a 62 (de 33 a 100)	No diferències en el creixement entre els grups	Kaushik <i>et al.</i> , 1995
	Farina de soja comercial	de 24 a 42 (de 25 a 50)	Lleugera tendència a disminuir el creixement Disminució significativa en la retenció de proteïna	

Continua

Espècie	Fonts alternatives	% d'inclusió (% de reemplaçament de la farina de peix)	Efectes	Referència
Truita irisada	Farina de soja comercial	13, 25 i 50 (de 25 a 100)	Depressió del creixement en el grup 25% i elevada mortalitat en el grup 50%. Decrement en l'absorció d'aminoàcids	Dabrowski <i>et al.</i> , 1989
Truita irisada	Farina de tramussos	10,20, 30 i 40 (de 10 a 40)	Creixement similar al control fins a un 30% d'inclusió	de la Higuera <i>et al.</i> , 1988
Llobarro	Barreja de fonts proteiques vegetals	de 19 a 80 (de 2 a 100)	No diferències en el creixement o el guany proteic Lleuger increment en la deposició de grasses en els animals dels grups alimentats amb les dietes vegetals	Kaushik <i>et al.</i> , 2004
Llobarro	Farina de soja suplementada amb meteonina	16, 34, 44 (de 24 a 64)	En peixos de 5 g no es detectaren diferències en el creixement en els dos grups extrems, encara que el creixement es va veure afectat en el grup 34% En peixos grans no es registraren diferències entre els grups	Gallagher, 1994
Llobarro	Gluten de blat de moro	100 (100)	No afectació del creixement	Dias, 2005
Tilapia	Farina de soja crua o bullida	55 i 52 (83)	Els peixos alimentats amb la soja bullida van créixer millor que els animals del grup control La progressiva inclusió de matèria crua va disminuir el creixement	Wee i Shu, 1989
Tilapia	Diferents tipus de soja	100 (100)	Disminució del creixement No efectes segons el tipus de tractament de les farines emprades	El-Sayed AFM <i>et al.</i> , 2000

Els treballs s'han escollit com a exemples d'experiències realitzades amb les dues espècies estudiades (orada i truita) i altres espècies d'interès en aqüicultura.

Annex 2. Factors antinutricionals identificats en algunes de les farines vegetals utilitzades en les dietes de substitució per a peixos.

Tipus de Farina	Factors Antinutricionals
Farina de soja	Inhibidors de proteases, lectines, fitats, saponines, fitoestrògens, antivitaminas, al·lèrgens
Farina de tramussos	Inhibidors de proteases, saponines, fitoestrògens, alcaloides
Farina de pèsol	Inhibidors de proteases, lectines, tanines, cianògens, fitats, saponines, antivitaminas
Farina de sèsam	Inhibidors de proteases, fitats
Farina de llavors de girasol	Inhibidors de proteases, saponines, inhibidor d'arginasa
Farina de colza	Inhibidors de proteases, glucosinolats, fitats, tanins
Farina de llavors de cotó	Fitats, fitoestrògens, antivitaminas, àcid ciclopropènic

Font: Adaptat de Francis *et al.*, 2001.





Annex 3. Tipus de factors antinutricionals, efectes i tractaments per minimitzar-ne la presència.

Factor Antinutricional	Vegetals on es troben	Efectes en els peixos carnívors	Tractaments per a la inhibició	Observacions
Inhibidors de proteases	Llegums	Afectació de la digestió per inhibició específica de les proteases digestives (Moyano <i>et al.</i> , 1999) o per la supressió del mecanisme de retroalimentació pancreàtic (Dabrowski <i>et al.</i> , 1989) que poden portar a imbalanços d'aminoàcids (Shiau <i>et al.</i> , 1987)	Extrusionat (Norton, 1991)* * Alguns, com p.ex. l'inhibidor de proteasa Bowman-Birk de la soja, és termoresistent (Norton, 1991)	Existeixen diferències en la tolerància als inhibidors de tripsina segons les espècies Poden existir mecanismes de compensació per un increment en la secreció d'enzims (Krogdahl <i>et al.</i> , 1994)
Fitats	Soja, colza, pèsols, sèsam	Disminució de la digestibilitat per formació de complexos fitat-proteïna (Richardson <i>et al.</i> , 1985). Formacions anormals en el tracte digestiu: hipertrofia dels cecs pilòrics i vacuolització citoplasmàtica (Richardson <i>et al.</i> , 1985) Quelant de minerals (Teskeredzic <i>et al.</i> , 1995; Sugiura <i>et al.</i> , 1999)	Fermentació (Duffus i Duffus, 1991) Inhibició per calor (Duffus i Duffus, 1991) Moltura Autoclatatge (Hossain i Jauncey, 1989)	La suplementació amb fitasa neutralitza els efectes (Riche i Brown, 1996; Storebakken <i>et al.</i> , 1998; Vielma <i>et al.</i> , 1998) L'addició de minerals a la dieta en contraresta els efectes
Glucosinolats	Crucíferes	Hemorràgia hepàtica i danys tissulars diversos al fetge i al ronyó (Duncan, 1991)	Tractament per calor (Burel <i>et al.</i> , 2000) Extracció aquosa (Makkar i Becker, 1997)	Existeixen varietats amb baixes concentracions d'aquests compostos
Saponines	Llegums	Dany a l'epiteli de les brànquies Alteració de l'absorció intestinal i disminució de l'activitat enzimàtica de la mucosa (Krogdahl <i>et al.</i> , 1995)	Extracció aquosa	La formació de complexos amb altres antinutrients pot disminuir l'efecte de les dues substàncies (Makkar <i>et al.</i> , 1995)
Tanins	Pèsols, mostassa	Interferència amb els processos digestius per unió amb els enzims o els compostos alimentaris (proteïnes o minerals) (Liener, 1989)	Esclofollació, calor, àlcali (Griffiths, 1991) Fermentació (Mukhopadhyay and Ray, 1999) Agents oxidants i suplementació amb agents acomplexants (Makkar <i>et al.</i> , 1995)	La interacció amb altres factors antinutricionals en pot disminuir els efectes (Fish i Thomposon, 1991)
Lectines	Llegums	Disrupció del metabolisme intestinal i danys morfològics a les vellositats (Grant, 1991)	Tractament aquós amb calor o autoclau (Grant, 1991)	Sinergisme amb altres factors antinutricionals
Oligosacàrids i polisacàrids diferents del midó	Llegums, cereals	Unió amb els àcids biliars, interferència amb els enzims digestius i moviment anormal dels substrats (Storebakken <i>et al.</i> , 1998)	Cocció al vapor (Erfanullah i Jafri, 1998) Tractament de calor (de la Higuera <i>et al.</i> , 1988) Extrusió a altes temperatures (Bangoula <i>et al.</i> , 1993)	Els estudis discrepen sobre els nivells de tolerància i l'ús dels carbohidrats dietaris segons les espècies

Continua

Factor Antinutricional	Vegetals on es troben	Efectes en els peixos carnívors	Tractaments per a la inhibició	Observacions
Fitoestrògens	Soja, cotó, tramussos	Afectació dels processos fisiològics: inducció de vitelogenesis (Pelisero <i>et al.</i> , 1991); hipertròfia hepàtica (Pelissero <i>et al.</i> , 1992)		
Alcaloides	Tramussos, llegums	Disminució de la ingesta per alteració de la palatabilitat de la dieta (de la Higuera, 1988)	Extracció aquosa, extrusió.	Existeixen varietats on les concentracions d'aquests compostos són molt baixes.
Compostos antigènics	Llegums, cereals	Lesions a la mucosa intestinal, anormalitats a les vellositats i moviment anormal de la ingesta (D'Mello, 1991)		Els nivells en què es troben a les dietes no provoquen alteracions de les taxes de creixement.
Gosipols	Gènere <i>Gossypium</i>	Deficiències d'aminoàcids per la formació de complexos	Extracció amb solvents.	

Font: Adaptat de Francis *et al.*, 2001.

Annex 4. Efectes de la substitució de l'oli de peix per fonts alternatives en la dieta de peixos.

Espècie	Fonts alternatives	% d'inclusió (% de reemplaçament de l'oli de peix)	Efectes	Referència
Orada ( <i>Sparus aurata</i> )	Oli de soja	12%	Afectació de la composició d'àcids grassos	Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 1992
Orada ( <i>Pagrus auratus</i> )	Oli de canola	de 25 a 100 (de 25 a 100)	Més d'un 75% de substitució amb oli no tractat afecta el creixement Canvis importants en la composició d'àcids grassos	Glencross <i>et al.</i> , 2003
Llobarro	Llard de porc	50%	No diferències en el creixement Diferències en el contingut de lípids del fetge i la tendresa de la carcassa	Xue <i>et al.</i> , 2006
Llobarro	Oli de soja	25 i 50 (25 i 50)	No diferències en el creixement No diferències en el perfil de lípids del filet Aparició de vacuoles lipídiques al fetge	Figuerido-Silva <i>et al.</i> , 2005
Llobarro	Barreja de llinosa, colza i palma	60 (60)	No afectació del creixement o la supervivència No diferències en les activitats d'hepatòcits i enteròcits	Mourente <i>et al.</i> , 2005a
Salmó	Oli de llinosa	de 25 a 100 (de 25 a 100)	Decrement de la quantitat de n-3 HUFA als teixits	Tocher <i>et al.</i> , 2002
Salmó	Oli de llinosa: oli de colza 1:1	de 25 a 100 (de 25 a 100)	Alteració del perfil d'àcids grassos del filet No efectes metabòlics o fisiològics al llarg del cicle	Tocher <i>et al.</i> , 2003
Salmó	Oli de canola Thraustochytrids (microorganisme marí)	100 (100 g·Kg <sup>-1</sup> )	No diferències en la composició, índexs somàtics o immunologia. Increment de la mortalitat en les dietes sense oli de peix.	Carter <i>et al.</i> , 2003
Salmó	Oli de copèpodes	100 (100)	No afectació del creixement Increment en el contingut de carotenoides en la pell	Hoehne-Reitan <i>et al.</i> , 2006
Truita irisada	Oli de soja Oli de colza	50 (50) 61(61)	No diferències en el creixement Aparició de vacuoles lipídiques als enteròcits	Caballero <i>et al.</i> , 2002
Truita irisada	Oli de palma	de 25 a 100 (de 25 a 100)	Disminució de la desaturació/elongació en enteròcits i hepatòcits dels peixos alimentats amb oli vegetal	Tocher <i>et al.</i> , 2004
Truita irisada	Oli de soja	25 i 50 (25 i 50)	No diferències en les taxes de creixement No diferències en el perfil de lípids del filet	Figuerido-Silva <i>et al.</i> , 2005
Truita irisada	Oli de palma	de 25 a 100	No diferències en el creixement Afectació del perfil de lípids del múscul a partir del 50% d'inclusió	Fonseca-Madrigal <i>et al.</i> , 2005

Els treballs s'han escollit com a exemples d'experiències realitzades amb la espècie estudiada (orada) i altres espècies d'interès en aqüicultura.



## **2. OBJECTIUS**



En el present treball s'analitzen, en dues espècies de peixos amb interès comercial - l'orada (*Sparus aurata*) i la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*)-, els efectes de la composició de la dieta i/o del fred sobre, d'una banda, les variacions que es produeixen en l'activitat digestiva mitjançant tècniques histològiques, quantificacions d'enzims digestius i determinacions de fluxes de nutrients; i de l'altra, sobre el creixement mitjançant mesures biomètriques.

Els objectius concrets del treball foren:

### ⇒ Metodològics

- ◆ Adequació i validació de les tècniques de zimografia.
- ◆ Posada a punt de la tècnica d'obtenció de vesícules de membrana apical d'enteròcit de truita.
- ◆ Adequació i validació de les tècniques de vesiculació emprades.

### ⇒ Aplicats

- ◆ Estudi dels efectes de les dietes de substitució sobre els processos digestius.
  - Efectes en l'orada i la truita de pinsos experimentals on s'havia reemplaçat la farina de peix per fonts proteiques vegetals en diferents percentatges (baixos o alts), arribant a la substitució total.
  - Efectes en l'orada de la substitució simultània de la farina i l'oli de peix per ingredients vegetals.
- ◆ Estudi dels efectes sobre l'activitat digestiva de l'orada de dos pinsos comercials amb diferent percentatge de lípids com a dietes de preparació per a l'hivern. Estudi del paper de l'exercici.





### **3. MATERIALS I MÈTODES**



### 3.1.Reactius

Àcid acètic glacial	A-6283	Sigma
Àcid clorhídric	131020	Panreac
Àcid tricloracètic (TCA)	490-10	Sigma
Acilamida	17-1302-02	Amersham - Pharmacia- Biotech
Albúmina sèrica bovina	103703	ICN Biomedicals Inc.
Alfa-amilasa	A-6814	Sigma
Amilosa azure	A-3508	Sigma
Azida de liti	480525	Sigma
Bicarbonat sòdic	131648	Panreac
BioRad Protein Assay	500-0006	BioRad
Blau brillant de Coomassie (BBC R-250)	B-0149	Sigma
Blau de bromofenol	17-1329-01	Amersham - Pharmacia- Biotech
Caseïna de llet bovina	C-8654	Sigma
Clorur de magnesi	M-0250	Sigma
Clorur de potassi	P-4504	Sigma
Clorur de zinc	Z-3500	Sigma
D-Glucosa	G-7528	Sigma
D-[2- <sup>3</sup> H]-Glucosa 10-25 Ci· mmol <sup>-1</sup>	TRK 361	Amersham - Pharmacia- Biotech
Deoxicolat sòdic	D-6750	Sigma
1-4 dioxà	D-9553	Sigma
DTNB (àcid 5'5-ditio-bis-(2-nitrobenzoic))	D-8130	Sigma
EDTA (àcid etilendiaminotetracètic)	141952	Panreac
Filtron-X, líquid de centelleig	LS-201	Itisa
Folin Ciocalteu DC	2.515.671.609	Panreac
Formol tamponat (4%)	211.328.121	Panreac
Glicerol	17-1325-01	Amersham - Pharmacia- Biotech
Glicina	17-1323-01	Amersham - Pharmacia- Biotech
HEPES	H-3375	Sigma
Hidroxid de sodi	131687	Panreac
L-Alanina	A-7627	Sigma
L-[2,3- <sup>3</sup> H]-Alanina (40-60 Ci· mmol <sup>-1</sup> )	TRK400	Amersham - Pharmacia- Biotech
L-Fenilalanina	P-8324	Sigma
L-[2,6- <sup>3</sup> H]-Fenilalanina (40-60 Ci· mmol <sup>-1</sup> )	TRK552	Amersham - Pharmacia- Biotech
L-Glutàmic	G-8415	Sigma
L-[6- <sup>3</sup> H]-Glutàmic (20-60 Ci· mmol <sup>-1</sup> )	TRK445	Amersham - Pharmacia- Biotech
L-Leucina	L-5652	Sigma
L-[4,5- <sup>3</sup> H]-Leucina (120-190 Ci· mmol <sup>-1</sup> )	TRK636	Amersham - Pharmacia- Biotech
L-Lisina	L-5626	Sigma
L-[4,5- <sup>3</sup> H]-Lisina (75-100 Ci· mmol <sup>-1</sup> )	TRK520	Amersham - Pharmacia- Biotech
L-Prolina	P-5607	Sigma
L-[2,3- <sup>3</sup> H]-Prolina (30-60 Ci· mmol <sup>-1</sup> )	TRK638	Amersham - Pharmacia- Biotech
[1- <sup>14</sup> C]-Linolèic (50-62 mCi· mmol <sup>-1</sup> )	CFA 104-50UCI	Amersham - Pharmacia- Biotech
Mannitol	M-9647	Sigma
Marcador de pes molecular	RPN 800	Amersham - Pharmacia- Biotech

Metanol	131091	Panreac
Metilbisacrilamida	17-1304-02	Amersham - Pharmacia- Biotech
MS-222 (3-aminobenzoic-etil-éster)	A-5040	Sigma
Ouabaïna	0-3125	Sigma
Persulfat amònic	17-1311-01	Amersham - Pharmacia- Biotech
PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoride)	P-7626	Sigma
p-nitrofenilfosfat	N-4645	Sigma
p-nitrofenol	104-8	Sigma
2-propanol	405-7	Sigma
Sacarosa	1.316.211.211	Panreac
Sal trilitica d'acetil coenzim A	A-2181	Sigma
SBTI (inhibidor tripsina de soja)	T-9128	Sigma
Sodi dodecil sulfat (SDS)	17-1313-01	Amersham - Pharmacia- Biotech
Sulfat de magnesi	M-1880	Sigma
Tiocianat de potassi	P-3011	Sigma
Tiocianat de sodi	S-7757	Sigma
TLCK (N $\alpha$ -p-tosyl-L-lisina-metil-quetona)	T-7254	Sigma
TPCK (N-tosil-L-fenilalanina-quetona)	T-4376	Sigma
Tripsina XII-S	T-2271	Sigma
TrisHCl	17-1321-01	Amersham - Pharmacia- Biotech
ZPCK (N-CBZ-L- fenilalanina clorometil quetona)	C-9511	Sigma

### 3.2 Animals

Es va treballar amb dues espècies d'interès en l'aqüicultura europea (FAO, 2004): l'orada (*Sparus aurata*) i la truita irisada (*Onchorhynchus mykiss*).

### 3.3. Disseny experimental i presa de mostres

Els detalls de cada experiència es descriuen als dissenys experimentals corresponents a cada bloc experimental.

### 3.4. Anàlisis

Els anàlisis realitzats en aquest treball es descriuen a continuació i es resumeixen a l'annex 1 d'aquest apartat (pàg. 57).

#### 3.4.1. Histologia de l'intestí proximal

S'obtingué el segon fragment, d'aproximadament 0.5 cm d'intestí proximal, i es conservà en formol. Posteriorment, les mostres van incloure's en parafina, van tallar-se, i es van tenyir amb hematoxilina-eosina per a la seva observació (realitzat per

Laboratorio Citohistológico S.L., Barcelona). Es van prendre fotografies de les diferents preparacions utilitzant una càmera digital (CC-12; Soft Imaging System) acoblada a un microscopi òptic (BX40). Per a la captació d'imatges s'usà el software AnalySIS (Soft Imaging System).

### **3.4.2. Valoració de les activitats proteasa i $\alpha$ -amilasa a l'intestí proximal**

Aquestes activitats es determinaren al primer segment intestinal (0.5 cm aproximadament). Cada mostra s'homogeneïtzà (Politron 2000, Sorvall TC) a 4°C en tampó TrisHCl pH 7.5 a una concentració de 50 mg de teixit·mL<sup>-1</sup>. Seguidament l'homogeneïtzat es va centrifugar (1100 g durant 15 min a 4°C. Jouan CR 4 11) i es va recuperar el sobrenedant, que es conservà a -20°C.

#### *3.4.2.1. Quantificació de l'activitat proteolítica total*

Es va mesurar mitjançant el mètode de Kunitz (1947) modificat per Walter (1984). 50  $\mu$ L d'homogeneïtzat es van fer reaccionar amb 0.5 mL de tampó tris amb caseïna (concentració final: 1.1 % de caseïna en TrisHCl 50 mM; pH 9.0) durant 30 minuts a 20°C. La reacció s'aturà amb 0.5 mL de TCA 12% i el desproteïnitat es va mantenir una hora a 4°C. Seguidament es va centrifugar (7500 g, 5 min, 4°C. Sigma 2-15) i es mesurà l'absorbància del sobrenedant a 280 nm (UV-1603, Shimadzu). Cadascun dels homogeneïtzats es va analitzar per triplicat, i per a cada mostra es realitzà també un blanc (afegint en primer lloc el TCA i seguidament la mostra homogeneïtzada). Com a patró es va utilitzar tripsina bovina preparada com una solució de 2000 UI·mL<sup>-1</sup> i diluïda (de 0 a 100 UI ·mL<sup>-1</sup>) per tal d'aconseguir un increment lineal d'absorbància a 280 nm als 30 minuts ( $r^2=0.9976$ ). Una unitat d'activitat enzimàtica es va definir com la quantitat d'enzim necessària per catalitzar la formació d'1  $\mu$ g de tirosina en un minut usant el coeficient d'extinció per la tirosina (0.008 mL·  $\mu$ g<sup>-1</sup>· cm<sup>-1</sup>).

Es va quantificar la proteïna dels diferents homogeneïtzats mitjançant el mètode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Com a estàndard de referència s'usà albúmina sèrica bovina (de 0 a 800 mg·L<sup>-1</sup>;  $r^2= 0.9980$ ).

#### *3.4.2.2. Identificació de les diferents activitats proteasa alcalina*

La caracterització de les activitats proteasa alcalina individuals es va realitzar usant inhibidors específics de cada tipus d'activitat en zimogrames. Les característiques de les solucions d'inhibició emprades es resumeixen a la Taula 4. Els inhibidors utilitzats es van escollir en base a la bibliografia (García-Carreño *et al.*,1993; Munilla-Morán *et*

*al.*, 1996; Alarcón *et al.*, 1998). Per determinar les activitats tipus quimotripsina i tipus serin proteasa es van usar dos inhibidors en cada cas, ja que els seus perfils d'inhibició no són exactament iguals dins la classe proteica que afecten. L'EDTA s'utilitza per determinar la dependència de les proteases de la presència de cations. Van mesurar-se també els percentatges d'inhibició de l'activitat proteolítica per cada dissolvent usat (Taula 4), observant-se que aquests no alteraven significativament el resultat de l'anàlisi.

Taula 4. Característiques de les solucions d'inhibició emprades en la caracterització de les activitats proteolítiques i percentatges d'inhibició dels dissolvents utilitzats.

Inhibidor	[ ] d'inhibidor	Activitat afectada	Dissolvent	% d'inhibició de l'activitat proteolítica total pel dissolvent
TLCK	10 mM	tripsina-like	HCl 1mM	0.37 ± 0.37
TPCK	10 mM	quimotripsina-like	Metanol	4.86 ± 2.46
ZPCK	10 mM	quimotripsina-like	Dioxà	0.57 ± 0.41
PMSF	100 mM	serina-like	2-propanol	4.05 ± 1.39
SBTI	250 µM	serina-like		—
EDTA	0.5 M	quelant de ions divalents	Aigua	

Els percentatges d'inhibició es presenten com la mitjana ± S.E.M. de 10 quantificacions per cada dissolvent usat.

Els zimogrames, que permeten veure les bandes amb activitat proteolítica en un gel, es realitzaren en gels d'acrilamida al 12% (10 x 10.5 x 0.1 cm), en els quals es van carregar<sup>1</sup> homogeneïtzats incubats durant 30 min (20°C) amb les diferents solucions d'inhibició o en aigua destil·lada<sup>2</sup>. Les electroforesis es van portar a terme amb un corrent constant de 15 mA per gel, durant 100 minuts a 4°C (EPS 301 Power Supply). Les fraccions actives de proteases es van visualitzar d'acord amb el mètode descrit per García-Carreño *et al.* (1993). Breument, els gels es van incubar en una solució de Tris HCl pH 8.2 que contenia un 2% de caseïna (30 min a 4°C i 90 min a 25°C). La caseïna s'uneix a la superfície de l'electroforesis durant les incubacions, i només és degradada en aquelles zones on les proteases són actives. Seguidament, es van rentar els gels i es van tenyir en una solució de metanol: acètic: aigua (40:10:40) amb un 0.1% de blau brillant de coomassie R-250. Durant la tinció tota la superfície que conté caseïna queda tenyida de color blau, mentre que les bandes on la proteïna ha estat degradada apareixen de color blanc (Fig. 8). Els gels van destenyir-se amb la mateixa solució sense colorant. La combinació d'un mateix homogeneïtzat amb cadascun dels inhibidors permet determinar quin tipus d'activitat presenten les

<sup>1</sup> El tampó de càrrega usat contenia (en mM) 123.8 Tris; 138.7 SDS; 0.3 blau de bromofenol; (en M) 2.75 Glicerol.

<sup>2</sup> 40 µL d'homogeneïtzat + 10 µL bé de la solució d'inhibició corresponent, bé d'H<sub>2</sub>O destil·lada.

diferents bandes, ja que aquestes desapareixen com a conseqüència de la inactivació de la proteasa per part de l'inhibidor corresponent. Tripsina i albúmina pures es van utilitzar com a controls. Per tal de determinar el pes molecular va usar-se un marcador de pes molecular comercial (RPN 800) (Fig. 9).

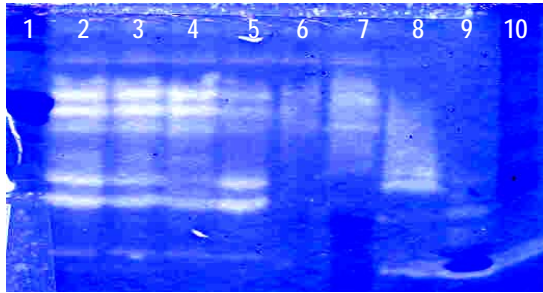


Figura 8. Zimograma representatiu d'homogeneïtzat de truita combinat amb diferents solucions d'inhibició. Columna (C) 1= BSA; C2= homogeneïtzat (H); C3= H + TPCK (inhibidor de l'activitat quimotripsina-like); C4= H+ ZPCK (inhibidor de l'activitat tripsina-like); C5= H+ TLCK (inhibidor de l'activitat tripsina-like); C6= H + PMSF (inhibidor de serin proteases); C7= H + SBTI (inhibidor de serin proteases); C8 = H+ EDTA (quelant de ions divalents); C9= tripsina bovina, C10= marcador de pes molecular RPN 800.

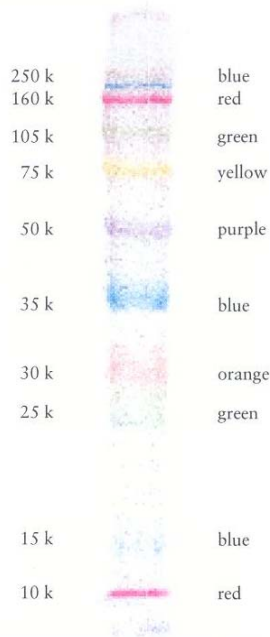


Figura 9. Marcador de pes molecular RPN800 usat en la identificació dels pesos de les bandes detectades en els gels. La imatge correspon a un 12% SDS-PAGE (després d'usar el mètode de Laemmli, 1970) en una electroforesi realitzada a 150V durant 50 minuts. Imatge obtinguda d'Amersham-Pharmacia-Biotech.

### 3.4.2.3. Quantificació de l'activitat $\alpha$ -amilasa

Les mostres s'analitzaren mitjançant una modificació del mètode descrit per Dold *et al.* (1995). La tècnica es basa en la utilització del traçador amilosa azure, un derivat de midó de patata que està covalentment marcat amb Blau Brillant R de Ramazol. 100 $\mu$ L d'homogeneïtzat es van combinar amb 400  $\mu$ L de tampó amb amilosa azure i SBTI (0.625% i 0.025 mg·mL<sup>-1</sup> respectivament en TrisHCl pH 7.5). L'SBTI es va afegir per minimitzar la degradació de l' $\alpha$ -amilasa per part de les proteases presents a la mostra. La reacció s'aturà passats 30 min addicionant 0.5 mL d'àcid acètic al 6%. Els tubs es van mantenir a 4°C durant 30 min i a continuació es van centrifugar (13000g; 10 min,

4°C. Jouan CR 4 11). L'absorbància del sobrenedant es va llegir a 595 nm. Com a patró es va utilitzar  $\alpha$ -amilasa (de 0 a 30 mU·mL<sup>-1</sup>;  $r^2= 0.987$ ). Cada homogeneïtzat s'analitzà per triplicat i es determinà el seu blanc.

### 3.4.3. Captació de nutrients

#### 3.4.3.1. Tècnica d'obtenció de vesícules de membrana apical d'enteròcit

Els cecs pilòrics, l'intestí proximal i l'intestí distal (Fig. 10) es van rentar en el moment del mostreig en salí isosmòtic (450 i 305 mOsm per orada i truita, respectivament) que contenia PMSF (0.1 M) per inhibir l'acció de les proteases i ràpidament es van congelar en nitrogen líquid.

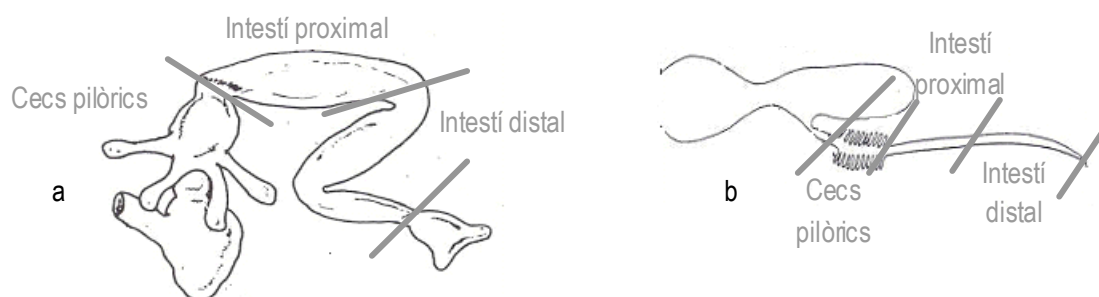


Figura 10. Tracte digestiu d'orada (a) i de truita (b). Es van distingir 3 segments: cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal. Els fragments intestinals es van diferenciar en funció de l'aparença externa i de la mucosa.

Per obtenir les vesícules de membrana apical d'enteròcit (VMAs) de cada segment intestinal, s'usà en orada el mètode de precipitació amb MgCl<sub>2</sub> descrit per Sala-Rabanal *et al.* (2004) (Fig. 11). Per a la truita s'adaptà l'esmentada tècnica adequant les osmolaritats dels medis a utilitzar. Les VMAs permeten valorar els influxos de nutrients selectivament a través de la membrana apical i sense que siguin metabolitzats, ja que en el procés d'obtenció de les vesícules es descarten els altres tipus de membranes cel·lulars (Annex 2 al materials i mètodes, pàg. 59) i la maquinària enzimàtica de l'enteròcit.

A pools de 2-5 g de mostra es van afegir 40 mL de medi d'homogeneïtzació (Taula 5). El teixit es va tallar en petits fragments i seguidament es va homogeneïtzar en un Waring blender (7011S; Waring laboratory) a baixa velocitat durant 8 min<sup>3</sup> per separar la capa mucosa de les capes musculars. L'homogeneïtzat resultant es va filtrar a través d'un embut Büchner (SC2134154; Afora) i va enrasar-se a 50 mL amb el mateix

<sup>3</sup> Per no escalfar la mostra es van deixar períodes de repòs de 30 s entre tandes d'homogeneïtzació de 2 min.



medi d'homogeneïtzació. A continuació, es va homogeneïtzar a alta velocitat durant 3 min<sup>4</sup> i va filtrar-se a través d'una mitja d'escuma. Es va afegir MgCl<sub>2</sub> a l'eluent fins a una concentració final de 10 mM per precipitar de manera selectiva totes les membranes cel·lulars a excepció de les apicals. L'homogeneïtzat es va mantenir en agitació 15 minuts i es va centrifugar (3000g durant 15 min). El sobrenedant resultant es mantingué 10 min en gel, durant els quals els lípids van formar una capa prima que es descartà amb l'ajuda d'una pipeta pasteur de vidre. El volum restant es va centrifugar (30000g, 30 min) i el pellet es va ressuspendre en medi d'enriquiment (Taula 5). La suspensió es va homogeneïtzar en un homogeneïtzador Teflon de vidre (cos KA 6150, èmbol KA 6350; Afora) i seguidament centrifugar a 35000 g (25 min). El pellet –que contenia els fragments purificats de membrana apical- es va ressuspendre en medi de vesiculació (Taula 5) usant una xeringa d'1 mL amb una agulla de 0.5 mm. Finalment la ressuspensió es féu passar varies vegades per una xeringa d'insulina per tal de vesicular els fragments de membrana apical obtinguts. Tot el procés es portà a terme entre 0-4°C i es va utilitzar una centrífuga Beckman J2-HS amb un rotor JH.20.

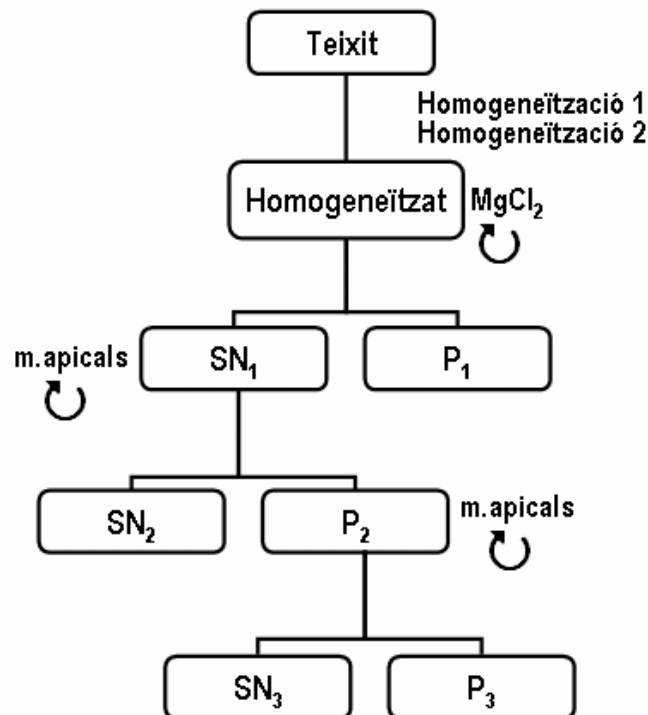


Figura 11. Esquema del procés d'obtenció de vesícules de membrana apical d'enteròcit. SN: sobrenedant; P: precipitat; m: membrana; : centrífuga.

<sup>4</sup> Es deixaren períodes de repòs de de 15 s entre tandes d'homogeneïtzació de 30 s.

Taula 5. Composició (mM) dels medis d'homogeneïtzació, enriquiment i vesiculació usats en la obtenció de VMAs d'enteròcits d'orada i de truita.

Medi d'Homogenització	Orada	Truita
Manitol	100	60
HEPES	2	2
	Osmolaritat 100; pH 7.4	Osmolaritat 60; pH 7.4

Medi d'Enriquiment	Orada	Truita
Manitol	100	60
HEPES	2	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1
	Osmolaritat 100; pH 7.4	Osmolaritat 60; pH 7.4

Medi de Vesiculació	Orada	Truita
Manitol	300	285
HEPES	20	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1
LiN <sub>3</sub>	4.08	4.08
	Osmolaritat 320; pH 7.4	Osmolaritat 305; pH 7.4

La osmolaritat està expressada en mosmols Kg<sup>-1</sup>.

#### 3.4.3.2. Validació de la tècnica d'obtenció de vesícules de membrana apical d'enteròcit

Per verificar l'enriquiment en membrana apical, així com l'empobriment en altres tipus de membrana, es mesurà a l'homogeneïtzat i a les vesícules l'activitat d'enzims marcadors de diferents tipus de membranes cel·lulars. Com a marcador de membrana apical es valorà la fosfatasa alcalina; per a determinar l'absència de membrana basolateral es va quantificar l'activitat Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa; l'activitat citrat sintasa de les mostres s'analitzà per descartar contaminació per membrana mitocondrial.

Es va estudiar també la orientació vesicular, ja que durant el procés de vesiculació, la membrana pot quedar orientada de dues maneres diferents: *outside-out* (orientació que presenta la membrana a la cèl.lula) o *inside-out* (amb la cara externa de la membrana a l'interior de la vesícula). Cal descartar la presència de VMAs amb la orientació *inside-out*, ja que en aquestes els transportadors queden atrapats a l'interior de la vesícula i no són funcionals, infravalorant-se la capacitat de transport en les suspensions obtingudes.

Totes les determinacions es van portar a terme a 20 °C. Els resultats de validació obtinguts es detallen i comenten a l'annex 2 d'aquest apartat (pàg. 59).

#### *Fosfatasa Alcalina (EC 3.1.3.1)*

L'enteròcit presenta activitat fosfatasa alcalina exclusivament a la membrana apical, considerant-se aquest enzim un bon marcador d'aquest tipus de membrana (Scalera *et al.*, 1980). Per a la seva quantificació, es seguí el mètode proposat per Weiser (1973). Breument, s'incubaren 100 µL de la mostra diluïda corresponent, amb 1 mL de la solució amortidora que contenia p-nitrofenilfosfat (en mM: 500 TrisHCl, 0.3 ZnCl<sub>2</sub>, 10 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 p-nitrofenilfosfat; pH 9.4) durant 15 min. La fosfatasa alcalina transforma el p-nitrofenilfosfat en p-nitrofenol, el qual es converteix en quinona per hiperalcalinització del medi. Per aturar la reacció es van afegir 0.5 mL de NaOH 0.5 N a cadascuna de les mostres i es llegí l'absorbància (420 nm). Com a recta patró s'utilitzà p-nitrofenol (de 0 a 90 µM; r<sup>2</sup>= 0.9989), i l'activitat de l'enzim als homogeneïtzats i les vesícules es va calcular interpolant els valors d'absorbància obtinguts amb els valors de concentració coneguda de la recta patró.

#### *Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> - ATPasa (EC 3.6.1.3)*

La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa es localitza a la membrana baso-lateral de l'enteròcit i té com a funció el reestabliment del gradient transmembrana de sodi, essent dependent d'ATP (Scalera *et al.*, 1980). Per determinar aquesta activitat s'usà una adaptació del mètode descrit per Colas i Maroux (1980), que es basa en l'activitat p-nitrofenilfosfatasa dependent de K<sup>+</sup> que presenten totes les ATPases, i en la inhibició específica de l'ouabaïna sobre la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa descrita per Stirling (1972).

Per determinar aquesta activitat, es van prendre dues alíquotes de 50 µL de cada mostra, prèviament diluïda. Una s'incubà amb 0.5 mL de la solució substrat (en mM: 50 Tris, 10 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 EDTA, 90 KCl; pH 7.6) i l'altra amb 0.5 mL de solució substrat amb ouabaïna (0.7 mM). Seguidament, s'afegiren 0.5 mL de p-nitrofenilfosfat 12 mM i, passats 30 min, la reacció s'aturà afegint 0.3 mL d'àcid tricloracètic al 20%. Després de centrifugar els tubs (13000g, 5 min, 4°C. Jouan CR 4 11) els sobrenedants es van recuperar, se'ls afegiren 2 mL de Tris 1M i es llegí l'absorbància a 420 nm. La diferència entre les lectures corresponents a una mostra incubada sense i amb ouabaïna permet conèixer la quantitat de fosfat alliberat per acció de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPasa. Com a estàndard s'utilitzà p-nitrofenilfosfat (de 0 a 1 mM; r<sup>2</sup>=0.9941).

#### *Citrat Sintasa (EC 2.3.3.1)*

La citrat sintasa és un enzim mitocondrial que catalitza la primera reacció del cicle de Krebs (Voet i Voet, 1995), i que té com a funció la conversió d'oxalacetat a citrat en presència d'acetil coenzim A al medi. Per determinar aquesta activitat s'utilitzà una

modificació del mètode descrit per Srere (1969). Breument, es van afegir 100 µL de mostra diluïda a 800 µL de tampó (concentració final en mM: 75 TrisHCl, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 AcetilCoA, 1 DTNB; pH=8) per quantificar l'activitat deacilasa no específica i establir el blanc de cada mostra. Seguidament, s'afegiren 100 µL d'oxalacetat 5 mM i es determinà l'augment d'absorbància a 412 nm. La comparació de l'activitat citrat sintasa d'homogeneïtzats i vesícules d'un mateix aïllament, permet determinar si hi ha un empobriment en aquest enzim i descartar la possible contaminació de les suspensions vesiculars amb restes mitocondrials.

#### *Orientació de les vesícules*

S'estudià mitjançant una modificació del mètode de Del Castillo i Robinson (1982): les vesícules s'incubaren en presència i absència d'una solució 2 mM de deoxicolat sòdic i 15 mM d'EDTA. En aquest medi, la membrana es fragmenta i per tant les vesícules es trenquen. Es mesurà seguidament l'activitat sacarasa total de la suspensió afegint a la preparació sacarosa 100 µM. S'usà el Kit comercial Glucofix (Ref. 34232; Menarini Diagnostics) per determinar la quantitat de glucosa alliberada en les mostres diluïdes. Breument, mitjançant dues reaccions successives, s'obté una complexa colorejada que presenta màxima absorbància a 505 nm. El valor d'extinció a aquesta longitud d'ona és directament proporcional a la concentració de glucosa de la mostra i, per tant, indicador de l'activitat sacarasa a la membrana apical de les vesícules. Un nivell més alt d'activitat sacarasa en VMAs fragmentades *versus* les no fragmentades, és indicador de la presència de VMAs orientades *inside-out* en les quals el complexa sacarasa-isomaltasa, així com els transportadors de nutrients, han quedat retinguts a l'interior vesicular. En aquest cas, cal descartar les VMAs obtingudes, ja que s'infravalora la capacitat de transport de la suspensió vesicular. Es verificà que les VMAs obtingudes presentessin majoritàriament la orientació *outside-out* (99.42 ± 0.95% en les orades i 98.96 ± 0.86% en les truites; n=12).

#### *3.4.3.3. Captació de nutrients en VMAs obtingudes dels diferents segments intestinals*

S'estudià la captació de 6 aminoàcids, que s'escolliren en base a dos criteris: la seva essencialitat, i el sistema de transport usat per l'enteròcit en la seva absorció. Com a aminoàcids essencials es van escollir la L-leucina, la L-lisina i la L-fenilalanina, i com a no essencials la L-alanina, l'àcid L-glutàmic i la L-prolina. Els transportadors de membrana apical implicats en l'absorció d'aquests aminoàcids es resumeixen a la taula 6.

Es quantificaren també els influxes de D-glucosa i àcid linolèic. El sacàrid és absorbit pels enteròcits a través del transportador SGLT1 (Taula 6). L'àcid linolèic es capta per difusió (Guillaume i Choubert, 2002) i s'utilitzà com a índex de l'absorció de lípids en peixos alimentats amb dietes que contenien olis d'origen vegetal, rics en aquest àcid gras.

L'estudi conjunt dels influxes d'aquests nutrients permet fer una aproximació global a les modificacions en la capacitat de transport d'un ampli espectre de mecanismes d'absorció de l'enteròcit degudes a canvis en la composició de la dieta, el fred o l'exercici.

Taula 6. Sistemes de transport usats per a la captació dels aminoàcids estudiats.

Nutrient	L-leucina	L-lisina	L-fenilalanina	L-alanina	L-glutamat	L-prolina	D-glucosa
Transportador	B	B <sup>0,+</sup> ; b <sup>0,+</sup>	B, PHE	β-amino, B	B; X <sub>AG</sub> -	B; IMINO	SGLT1

Font: Ahearn i Storelli, 1994.

Per determinar l'influx de diferents nutrients a les VMAs, es va utilitzar una modificació de la tècnica de Garriga *et al.* (1999). Es treballà en la zona lineal de captació (Annex 3 al materials i mètodes, pàg. 61) i a baixes concentracions de substrat per minimitzar els fenòmens de difusió.

*Determinació de la zona lineal de captació de cada nutrient en vesícules de membrana apical obtingudes de cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal*

Es van incubar 10 µL de suspensió vesicular amb 40 µL del medi d'incubació que contenia el nutrient a estudiar (Taula 7) durant diferents temps (de 0 a 10 s). La reacció es va parar addicionant 1 mL de solució d'aturada a 4°C (Taula 7). 990 µL de la suspensió resultant es van filtrar ràpidament sota pressió negativa a través de filtres de nitrat de cel·lulosa de 0.22 µm (Millipore, Bedford MA) prèviament humitejats en solució d'aturada. El filtre es va netejar amb 10 mL de la mateixa solució per tal de rentar les vesícules i eliminar la radioactivitat no absorbida; seguidament es dissolgué en líquid de centelleig Filtron-X i la mostra es va comptar en un comptador de centelleig (Packard TRI-CARB 2100TR). Les determinacions es van realitzar a 20°C. L'annex 3 d'aquest apartat (pàg. 61) presenta els seguiments dels influxes entre 0 i 10 s obtinguts per als diferents nutrients en les dues espècies estudiades, observant-se que en tots els casos 5 s està dins de la zona de linealitat. S'escollí aquest temps per a la determinació de la captació de nutrients.

### *Determinació de la captació de nutrients de les VMAs obtingudes a partir dels diferents segments intestinals*

Es van realitzar alíquotes de 10 µL d'una mateixa suspensió vesicular, i cadascuna d'elles es va fer reaccionar durant 5 s amb 40 µL de medi d'incubació que contenia un dels nutrients a estudiar: L-leucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-alanina, L-glutàmic, L-prolina o D-glucosa (Taula 7). Passat el temps d'incubació, la captació es va parar usant 1 mL de solució d'aturada i seguidament es filtrà i comptà seguint el protocol descrit en el punt anterior.

Degut al caràcter hidròfob del linolèic, aquest s'afegí al medi d'incubació acomplexat amb albúmina (segons Tocher *et al.*, 2002). Una alíquota d'àcid gras (0.75 µCi de <sup>14</sup>C) s'incubà 10 min amb una solució 0.428 mmols KOH·µCi<sup>-1</sup>. Seguidament s'incubà 45 min més amb el medi d'incubació que contenia albúmina lliure d'àcids grassos 600 µg·µCi<sup>-1</sup>. S'aliquotaren 40 µL per a cada rèplica i es seguí el protocol prèviament descrit.

Taula 7. Composició final (mM) dels medis d'incubació i aturada usats en les proves de captació de nutrients en VMAs obtingudes dels diferents segments intestinals d'orada i de truita.

Solució d'incubació Na <sup>+</sup>	orada	truita
NaSCN	250	250
Manitol	100	70
HEPES	40	40
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1
LiN <sub>3</sub>	8.16	8.16
Nutrient fred*	0.15	0.15
Nutrient marcat	0.01	0.01
	Osmolaritat 320; pH 7.4	Osmolaritat 305; pH 7.4
Solució d'aturada	orada	truita
Manitol	300	285
HEPES	20	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1
LiN <sub>3</sub>	4.08	4.08
	Osmolaritat 320; pH 7.4	Osmolaritat 305; pH 7.4

\* en tots els casos s'utilitzaren nutrients marcats amb <sup>3</sup>H, a excepció del linolèic, que estava marcat amb <sup>14</sup>C.

### *Quantificació de proteïnes de les fraccions vesiculars*

La concentració proteica de les diferents fraccions es va determinar seguint el mètode descrit per Bradford (1976), utilitzant el reactiu BIORAD<sup>R</sup>. El reactiu conté un colorant, blau brillant de coomassie R-250, que es combina en el medi àcid amb les proteïnes

donant lloc a un complex colorat blau. Aquest complex es forma ràpidament i es manté en dissolució durant una hora. Per determinar la concentració proteica es van incubar 50 µL de mostra diluïda amb 50 µL d'àcid fòrmic i 1.5 mL del reactiu BIORAD<sup>R</sup> diluït (1:5). La barreja es deixà 15 minuts en repòs i seguidament es llegiren les absobàncies (595 nm). Per a la recta patró s'utilitzà albúmina bovina (de 75 a 500 µg·mL<sup>-1</sup>; r<sup>2</sup>=0.9964).

#### *Determinació del volum vesicular utilitzant L-alanina*

Es va mesurar la quantitat de L-alanina<sup>5</sup> retinguda a l'interior de les VMAs en assolir-se l'equilibri (veure Annex 4 al materials i mètodes, pàg. 65). Una alíquota de 10 µL de la suspensió vesicular s'incubà amb 40 µL del medi corresponent que contenia 0.151 mM de L-alanina (essent el 0.01 mM L-alanina tritiada). La mescla es conservà en gel, i passats 90 min la reacció es va parar i comptar seguint el protocol descrit anteriorment.

#### *3.5. Anàlisi estadístic dels resultats*

Per a establir si existien diferències significatives (p<0.05) entre dos paràmetres s'usà un test T-Student. Les diferències entre més de dos grups es van determinar mitjançant l'anàlisi de varianza (ANOVA) d'un factor i aplicant el test de Tuckey. El software utilitzat fou l'SPSS 12.0 (SPSS Inc., EUA).

---

<sup>5</sup> S'utilitzà L-alanina com a model.





## ANNEXES AL MATERIAL I MÈTODES



Annex 1. Taula resum dels materials i mètodes. Les tècniques assenyalades amb un asterisc han estat adaptades.

	Fragment intestinal	Preparació i conservació	Processat	Analítiques
Histologia	Intestí proximal (0.5 cm)	Formol tamponat (4%)	Inclusió en parafina; talls (1 µm) Tinció hematoxilina-eosina	Observació al microscopi òptic Anàlisi d'imatges (AnalySiS; Soft Imaging System)
Enzims digestius	Intestí proximal (0.5 cm)	Congelació en nitrogen líquid Conservació a -80°C	Homogeneïtzació (50mg mL <sup>-1</sup> ; TrisHCl 7.5) Centrifugació Conservació sobrenedant (-20°C)	Activitat proteolítica total (Walter, 1984) Activitats proteasa alcalina específiques (García-Carreño <i>et al.</i> , 1993; Moyano <i>et al.</i> 1996) Activitat α-amilasa (Dold <i>et al.</i> , 1995)* Quantificació de proteïnes en l'homogeneïtzat (Lowry, 1951)
Transport de nutrients	Cecs pilòrics (C) Intestí proximal (P) Intestí distal (D)	Rentat en PMSF (0.1 M) Congelació en nitrogen líquid Conservació a -80°C	Obtenció de VMAs (Sala-Rabanal <i>et al.</i> , 2004)*	Validacions del procés de vesiculació Fosfatasa alcalina (Weiser, 1973) Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa (Colas i Maroux, 1980)* Citrat sintasa (Srere, 1969)* Orientació vesicular (Del Castillo i Robinson, 1982) Transport de nutrients (aminoàcids; glucosa; àc. linolènic) (Garriga <i>et al.</i> , 1999)* Quantificació de proteïnes de la suspensió vesicular (Bradford, 1976)



## **Annex 2. Validació del procés d'obtenció de VMAs.**

Es quantificà en l'homogeneïtzat inicial i la fracció vesicular final l'activitat d'enzims reconeguts com a marcadors de diferents components i orgànuls cel·lulars. Així, es mesurà l'activitat fosfatasa alcalina com a marcador de membrana apical (Berner *et al.*, 1976), l'activitat  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa com a indicador de la membrana basolateral (Berner *et al.*, 1976), i la citrat sintasa com a enzim marcador de la membrana mitocondrial (Voet i Voet, 1995).

La taula 8 mostra que les suspensions vesiculars emprades en els diferents blocs experimentals presentaren un enriquiment enfront de l'homogeneïtzat inicial en l'activitat fosfatasa alcalina, així com un empobriment de les activitats  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPasa}$  i citrat sintasa, indicant que les VMAs obtingudes en les diferents experiències eren adequades per a les mesures de la capacitat d'absorció de nutrients.

Taula 8. Activitat específica a l'homogeneïtzat i les vesícules i factor d'enriquiment dels enzims marcadors del procés de vesiculació en cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal de les orades i les truites usades en els experiments de substitució (a) i de preparació a l'hivern (b).

a	Marcador enzimàtic	Truita			Orada		
		Activitat específica		Enriquiment	Activitat específica		Enriquiment
		Homogeneïtzat	VMAs		Homogeneïtzat	VMAs	
Fosfatasa alcalina ( $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{g} \text{prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Cecs	4.77 ± 0.70	20.57 ± 2.1	4.56 ± 0.98	2.76 ± 0.94	14.39 ± 0.96 <sup>1</sup>	5.21 ± 0.45 <sup>1</sup>
	I. Proximal	2.71 ± 0.27	17.58 ± 3.19	6.56 ± 1.36	2.54 ± 0.20	8.62 ± 1.99 <sup>2</sup>	3.39 ± 0.19 <sup>2</sup>
	I. Distal	4.13 ± 0.79	25.40 ± 2.27	6.25 ± 0.96	1.12 ± 0.04	5.76 ± 1.51 <sup>2</sup>	5.15 ± 0.46 <sup>1</sup>
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa ( $\text{pmols} \cdot \mu\text{g} \text{prot}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Cecs	0.11 ± 0.01 <sup>2</sup>	0.07 ± 0.01	0.64 ± 0.01 <sup>1</sup>	0.14 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.42 ± 0.02 <sup>3</sup>
	I. Proximal	0.28 ± 0.02 <sup>1</sup>	0.09 ± 0.01	0.32 ± 0.02 <sup>2</sup>	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.66 ± 0.02 <sup>2</sup>
	I. Distal	0.23 ± 0.03 <sup>1</sup>	0.09 ± 0.03	0.39 ± 0.02 <sup>2</sup>	0.20 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.80 ± 0.01 <sup>1</sup>
Citrat Sintasa ( $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{g} \text{prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Cecs	0.12 ± 0.01 <sup>2</sup>	0.01 ± 0.0	0.09 ± 0.05	0.26 ± 0.07	0.01 ± 0.0	0.03 ± 0.01 <sup>2</sup>
	I. Proximal	0.32 ± 0.10 <sup>1</sup>	0.05 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.04 ± 0.02	0.12 ± 0.04 <sup>1</sup>
	I. Distal	0.27 ± 0.03 <sup>1</sup>	0.03 ± 0.0	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.03 <sup>1</sup>

b	Marcador enzimàtic	CREIXEMENT			FRED		
		Activitat específica		Enriquiment	Activitat específica		Enriquiment
		Homogeneïtzat	VMAs		Homogeneïtzat	VMAs	
Fosfatasa alcalina ( $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{g} \text{prot}^{-1}$ )	Cecs	4.35 ± 0.53	25.58 ± 2.35 <sup>1</sup>	5.95 ± 0.36	3.93 ± 0.11 <sup>1</sup>	36.98 ± 1.71 <sup>1</sup>	9.40 ± 0.3 <sup>1</sup>
	I. Proximal	8.32 ± 2.80	15.08 ± 1.49 <sup>2</sup>	6.55 ± 2.80	2.70 ± 0.46 <sup>2</sup>	11.64 ± 2.06 <sup>2</sup>	4.76 ± 1.01 <sup>2</sup>
	I. Distal	2.68 ± 0.42	13.55 ± 1.77 <sup>2</sup>	7.36 ± 2.34	2.65 ± 0.20 <sup>2</sup>	21.24 ± 4.36 <sup>2</sup>	7.89 ± 1.14 <sup>12</sup>
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa ( $\text{pmols} \cdot \mu\text{g} \text{prot}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Cecs	0.30 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.24 ± 0.01 <sup>12</sup>	0.06 ± 0.02	0.25 ± 0.16 <sup>1</sup>
	I. Proximal	0.28 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.36 ± 0.05 <sup>1</sup>	0.04 ± 0.02	0.11 ± 0.05 <sup>2</sup>
	I. Distal	0.21 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.11 ± 0.03 <sup>2</sup>	0.04 ± 0.02	0.35 ± 0.03 <sup>1</sup>
Citrat Sintasa ( $\mu\text{mols} \cdot \mu\text{g} \text{prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	Cecs	0.31 ± 0.11	0.02 ± 0.0	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.18 ± 0.03
	I. Proximal	0.71 ± 0.52	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.03 ± 0.0	0.15 ± 0.02
	I. Distal	0.18 ± 0.03	0.01 ± 0.0	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.02 ± 0.0	0.18 ± 0.02

L'enriquiment és la relació entre l'activitat específica mesurada a les vesícules i a l'homogeneïtzat inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± S.E.M d'almenys 4 determinacions independents. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els diferents segments intestinals es mostren amb números. I=intestí.

### **Annex 3. Determinació de la zona de linealitat de captació de nutrients en VMAs dels diferents segments intestinals d'orada i truita.**

Les figures 12 i 13 mostren els seguiments al llarg del temps (entre 0 i 10 s) dels influxes dels nutrients estudiats a les VMAs d'orada i truita. Per als 3 tipus vesiculars analitzats, la captació dels nutrients estudiats fou lineal durant almenys els 7 primers segons i, en alguns casos fins als 10 s.

Per uniformitzar les mesures dels influxes, es va escollir el temps 5 s. per a totes les proves. S'optà per aquest temps ja que la zona de linealitat podia reduir-se si en alguna experiència existia una regulació a l'alça dels transportadors de nutrients en resposta a la condició experimental testada.

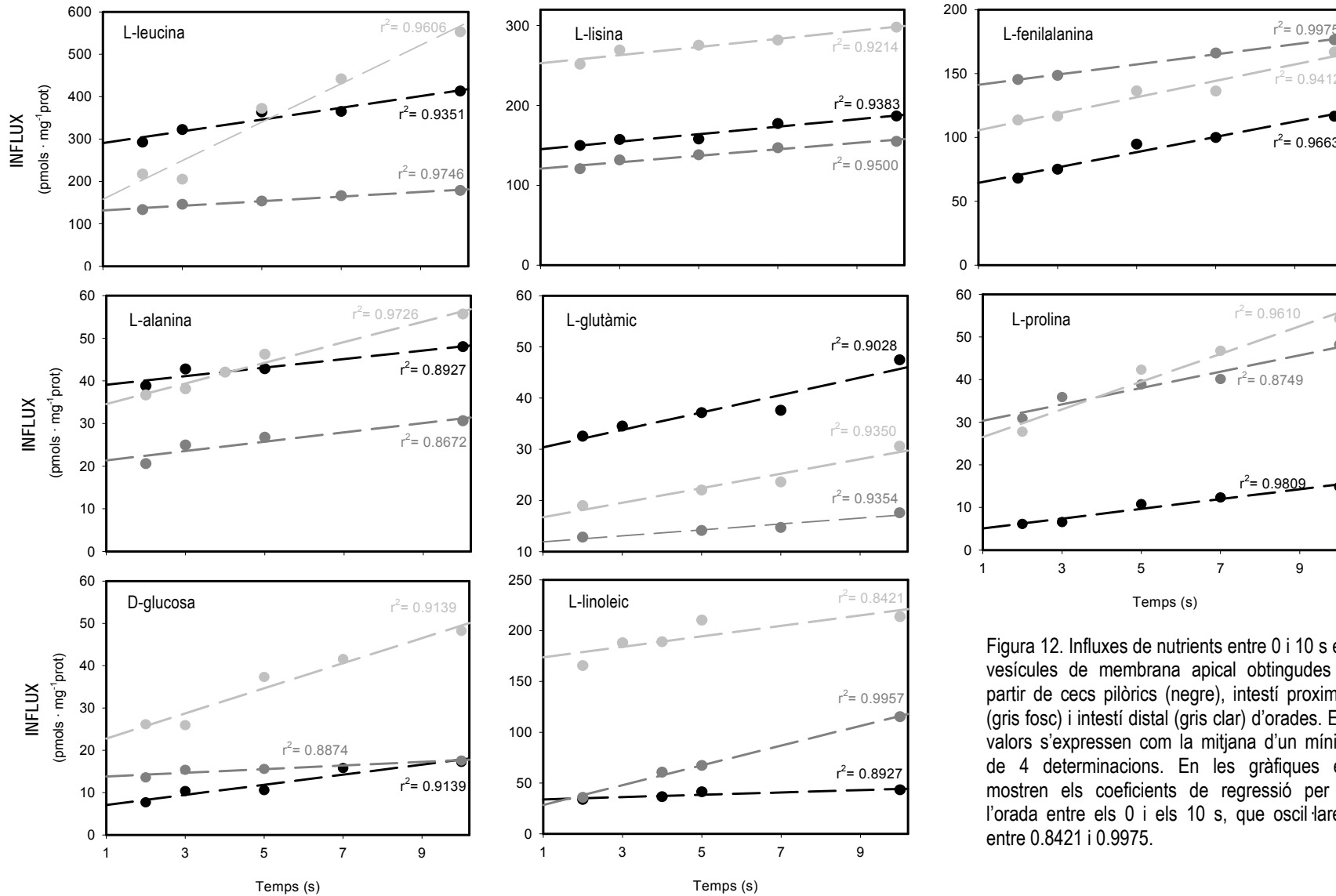


Figura 12. Influxes de nutrients entre 0 i 10 s en vesícules de membrana apical obtingudes a partir de cecs pilòrics (negre), intestí proximal (gris fosc) i intestí distal (gris clar) d'orades. Els valors s'expressen com la mitjana d'un mínim de 4 determinacions. En les gràfiques es mostren els coeficients de regressió per a l'orada entre els 0 i els 10 s, que oscil·len entre 0.8421 i 0.9975.



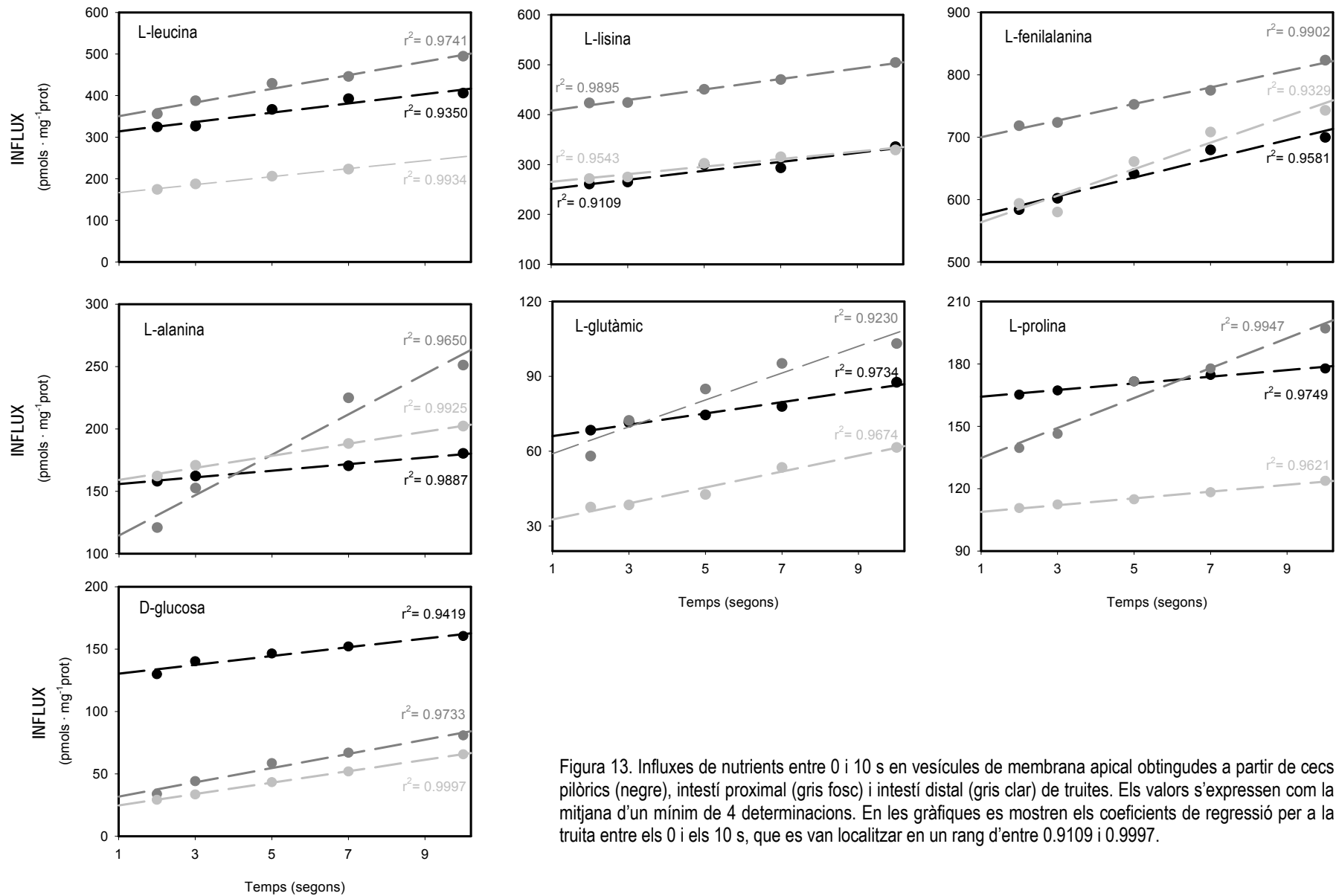


Figura 13. Influxes de nutrients entre 0 i 10 s en vesícules de membrana apical obtingudes a partir de cecs pilòrics (negre), intestí proximal (gris fosc) i intestí distal (gris clar) de truites. Els valors s'expressen com la mitjana d'un mínim de 4 determinacions. En les gràfiques es mostren els coeficients de regressió per a la truita entre els 0 i els 10 s, que es van localitzar en un rang d'entre 0.9109 i 0.9997.



#### Annex 4. Determinació del volum vesicular

L'influx de substrats a les vesícules de membrana apical pot deure's a la difusió simple, la difusió facilitada i el transport actiu (Storelli *et al.*, 1986). En el primer cas, l'entrada de nutrient depèn únicament del gradient de concentració entre l'interior i l'exterior vesicular (Fig. 14). En els altres dos casos la captació del nutrient depèn de la presència de proteïnes transportadores inmerses en la bicapa lipídica, les quals poden ser independents o dependents de la presència de ió sodi al medi (Storelli *et al.*, 1986). L'influx de nutrient és inicialment lineal, però en pocs segons o minuts la concentració intravesicular pot arribar a excedir la concentració extravescicular degut a la captació activa del substrat. A temps llargs, els fluxes entre l'interior i l'exterior de la vesícula s'equilibren, fet que comporta que les concentracions de substrat intra i extravescicular s'igualin (Fig. 14).

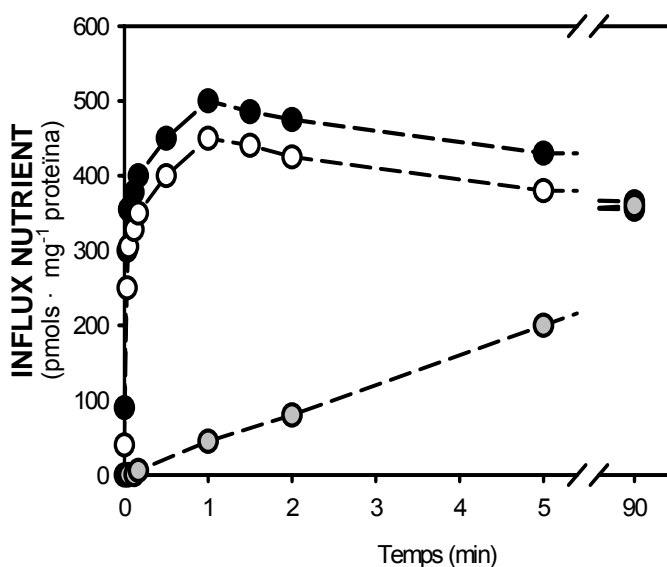


Figura 14. Model de la captació de nutrients en VMAs d'enteròcit per transport actiu dependent de sodi (cercles negres), transport actiu independent de sodi (cercles blancs) i difusió (cercles gris). A l'equilibri la concentració intravesicular de nutrient en presència i absència de sodi s'igualen.

Es van realitzar mesures de la captació de L-alanina<sup>6</sup> (151 mM) al llarg del temps en VMAs obtingudes a partir de cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal en presència i absència de sodi<sup>7</sup> (Fig.15). En les VMAs de les orades i les truites, per a tots els casos

<sup>6</sup> S'utilitzà L-alanina com a model, encara que qualsevol dels substrats estudiats permetia determinar l'assoliment de l'equilibri i calcular el volum de les suspensions vesiculars en funció de la proteïna.

<sup>7</sup> El transport independent de sodi s'estudià substituint-lo als medis per una quantitat equivalent de ió potassi.

estudiats, l'equilibri estava assolit als 90 min<sup>8</sup>, ja que la quantitat de L-alanina atrapada a les vesícules en aquest moment (pmols·mg<sup>-1</sup> prot) fou equivalent en presència i absència de sodi al medi i, per tant, igual a la utilitzada en la prova (151 μM). Considerant aquests factors, es pot calcular el volum vesicular en funció de la proteïna de la suspensió i normalitzar els influxes de nutrients per unitat de concentració intravesicular.

---

<sup>8</sup> Per a estudiar la captació als 90 min, la incubació es mantingué en gel per evitar que les VMAs es deterioressin.

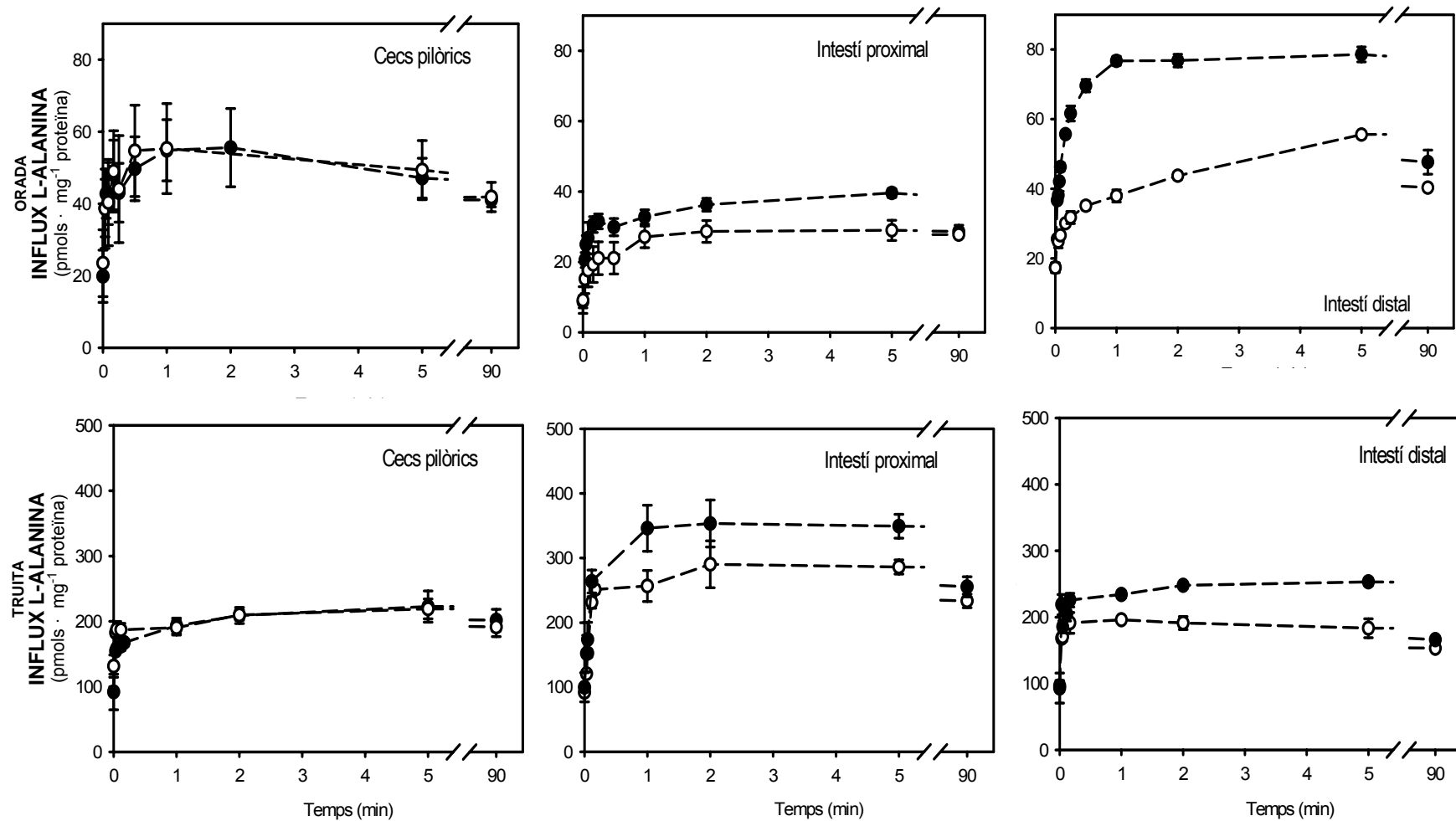


Figura 15. Seguiment al llarg del temps de la captació de L-alanina a vesícules d'orada (gràfiques superiors) i truita (gràfiques inferiors) en vesícules de membrana apical obtingudes a partir de cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal en presència de sodi (cerques negres) i absència de sodi (cerques blancs) al medi extravèsicel·lar. La incubació de 90 min es va mantenir en fred per evitar que les VMAs obtingudes es deterioressin. Per a l'estudi del transport independent de sodi, aquest ió es substituï als medis per una quantitat equivalent de ió potassi.



## **4. BLOCS EXPERIMENTALS**





## 4.1. Dietes de substitució

- ◆ **Substitució en la dieta d'orada i truita de la farina de peix per ingredients vegetals (Projecte PEPPA Q5RS-2000-30068)**
  - 1<sup>er</sup> experiment: Dietes amb baixos o moderats percentatges de substitució.
  - 2<sup>on</sup> experiment: Dietes amb alts percentatges de substitució. El reemplaçament total de la farina de peix per farines vegetals.
  
- ◆ **Doble substitució: Inclusió en la dieta d'orada de proteïna i lípids d'origen vegetal (Projecte 56544851SR68007)**

## 4.2. Dietes de preparació a l'hivern per orada

- ◆ **Efecte de la quantitat de lípids de la dieta. Efecte de l'exercici moderat (Projecte CIRIT 036043)**



## 4.1. DIETES DE SUBSTITUCIÓ

En els darrers anys l'aqüicultura ha adquirit gran importància arreu del món degut a la creixent demanda de peixos per abastar els mercats i a l'estabilització de les captures (FAO, 2004). A Europa, la major part dels peixos cultivats són espècies carnívores, i per això s'han usat tradicionalment la farina i l'oli de peix com a fonts de proteïna i lípids de la dieta, aconseguint-se bones taxes de creixement. Però l'increment de l'aqüicultura ha comportat un augment de la demanda d'aquests ingredients, que s'han convertit en limitants per la seva menor disponibilitat i l'elevat cost (FAO, 2004). Per aquest motiu, per millorar el rendiment de les explotacions es treballa en la formulació de pinsos que, amb baixos costos, permetin un creixement òptim dels animals i assegurin alhora una bona qualitat del producte (Rus *et al.*, 1999).

En aquest sentit, s'estudia actualment substituir la farina de peix per farines vegetals, abundants i més econòmiques, ja sigui en diferents proporcions o de manera total (Dabrowsky i Kozack, 1979; Gomes *et al.*, 1993; Oliva-Teles *et al.*, 1994; Robaina *et al.*, 1995; Burel *et al.*, 1998; Kissil *et al.*, 2000; Olvera-Novoa *et al.*, 2002; Muzinic *et al.*, 2004, entre altres) per tal de permetre la sostenibilitat del sector. De fet, les dietes comercials contenen ja percentatges baixos o mitjans d'ingredients vegetals com a font de proteïna, però són necessaris més estudis per aconseguir dietes que permetin cobrir les necessitats aminoacídiques requerides per cadascuna de les espècies cultivades, minimitzant alhora els efectes negatius dels factors antinutricionals (ANFs) presents en els ingredients d'origen vegetal (Francis *et al.*, 2001; Guillaume i Métallier, 2002), els quals interfereixen en la utilització de l'aliment i poden afectar la salut dels animals (Makkar, 1993). A nivell digestiu, per exemple, s'ha descrit que els ANFs poden alterar la histologia intestinal (Hendriks *et al.*, 1990; Baeverfjord i Krogdahl, 1996; Krogdahl, 2003), inhibir l'alliberació de proteases pancreàtiques (Dabrowsky *et al.*, 1989) o acomplexar enzims digestius (Moyano *et al.*, 1999) o minerals (Teskeredzic *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1999). Aquestes alteracions poden modificar els processos d'absorció intestinal i perjudicar la digestibilitat de les dietes, disminuint, en última instància, el creixement dels animals (Sanz *et al.*, 1994; Olvera-Novoa *et al.*, 2002).

D'altra banda, s'estima que l'any 2010, la demanda d'oli de peix per aqüicultura serà d'aproximadament el 90% de la producció total (Barlow, 2000), i és necessari buscar

alternatives a aquest ingredient per assegurar la sostenibilitat de la indústria piscícola (Naylor *et al.* 2000). Actualment, la única font sostenible per reemplaçar-lo són els olis vegetals, la producció dels quals és 100 vegades superior a la producció del limitant oli de peix (Bimbo, 1990). Els àcids grassos poliinsaturats (PUFA) linoleic i linolènic no poden sintetitzar-se *de novo* en els animals (Holman, 1986). En els peixos, els C<sub>18</sub> PUFA no tenen però funcions essencials, sinó que la seva essencialitat radica en la seva conversió als àcids grassos de cadena llarga n-3 HUFAs: EPA, DHA i AA (Sargent *et al.*, 1995). En peixos d'aigua dolça, el linoleic i/o el linolènic poden satisfer la demanda d'AGEs (Sargent *et al.*, 2002), mentre que els peixos marins necessiten els n-3 HUFAs en la dieta per un creixement òptim, ja que no s'ha establert en les espècies marines estudiades una taxa significativa de conversió dels PUFAs (Sargent *et al.*, 2002; Mourente *et al.*, 2005a,b). Però els olis d'origen vegetal, malgrat ser rics en els C<sub>18</sub> PUFA, no contenen els n-3 HUFAs, abundants en l'oli de peix. Així, per a utilitzar els olis vegetals en dietes d'aqüicultura, s'estan avaluant els seus efectes sobre el creixement (Dosanjh *et al.*, 1998; Thomassen i Rosjo, 1989; Glencross *et al.*, 2003; Fonseca-Madrigal *et al.*, 2005), la histologia hepàtica i intestinal (Olsen *et al.*, 1999; 2000; Caballero *et al.*, 1995; 2002; 2004) o sobre la composició i deposició de grasses (Bell *et al.*, 2001; 2003; Caballero *et al.*, 2002; Glencross *et al.*, 2003) que, en última instància, poden afectar la qualitat del producte (Arzel *et al.*, 1994; Sinclair i Anderson, 1994; Kaushik 1997).

L'objectiu d'aquest bloc és estudiar els efectes a nivell intestinal de dietes en què s'ha substituït la farina de peix per fonts vegetals en dues espècies d'interès en aqüicultura: l'orada i la truita irisada. I seguidament testar l'efecte sobre la digestió i la capacitat d'absorció de la substitució doble en dietes per a l'orada.

## 4.1.1. DIETES AMB BAIXOS I MODERATS PERCENTATGES DE SUBSTITUCIÓ DE LA FARINA DE PEIX PER INGREDIENTS VEGETALS

---

ORADA

### DISSENY EXPERIMENTAL

#### Animals

Orades (*Sparus aurata*) provinents d'una piscifactoria comercial (Tina Menor, Santander, Espanya) es van aclimatar a les instal·lacions de l'Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal (C.S.I.C., Castelló, Espanya) durant 20 dies.

#### Dietes

A l'I.N.R.A. (St-Pée-sur-Nieville, França) es van formular dues dietes experimentals per a aquesta espècie: PV20 i PV33. La taula 9 en mostra la composició. En la dieta PV20 un 20.5% de la proteïna era d'origen vegetal; en la dieta PV33 el 33% de la proteïna provenia de fonts vegetals. Les dues dietes eren isoproteiques, isolipídiques i isoenergètiques.

La composició aminoacídica de PV20 i PV33 reflexava la del múscul de l'orada, que sembla ser la més adequada per un òptim creixement dels animals (Jobling *et al.*, 2001). Per ajustar les dietes a aquesta composició, minimitzant alhora la necessitat de suplementació amb aminoàcids lliures, es van barrejar diferents farines (extrusionat de pèsol i concentrat de proteïna de soja en PV20; extrusionat de blat i concentrat de proteïna de soja en PV33). La mescla de matèries primeres, al mateix temps, disminuïa el risc de que la dieta contingués un excés en un determinat tipus de factor antinutricional.

En la dieta PV33, a més, s'addicionà àcid glutàmic lliure per tal d'incrementar el balanç entre aminoàcids no essencials (NEAA) i aminoàcids essencials (EAA), aconseguint-se una relació entre NEAA/EAA de la dieta PV33 versus la PV20 de 1.10, sense modificar, però, la quantitat total d'aminoàcids essencials.

Taula 9. Composició aproximada (a), ingredients utilitzats (b) i percentatge de cadascuna de les fonts de proteïna (c) de les dietes experimentals d'orada.

a	Composició Aproximada	PV20	PV33
	Matèria seca (MS, %)	92.1	93.7
	Proteïnes (% MS)	52.7	53.0
	Lípids (% MS)	15.7	16.4
	Energia Bruta (MJ/Kg)	22.5	22.5
b	Ingredients (g/kg)	PV20	PV33
Farines i extrusionats	Farina de peix (CP70%)	499.98	478.06
	CPSP G <sup>1</sup>	50	0
	Gluten de blat (Amylium)	0	0
	Extrusionat de blat	0	56.08
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	199.15	0
	Soja (CP 42%)	121.89	300
Grasses	Oli de peix	83.61	94.51
Vitamines i lligands	Lligand	10	10
	Mix Mineral <sup>2</sup>	10	10
	Mix de Vitamines <sup>2</sup>	10	10
	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0	0
Suplementació (aa lliures)	L-Histidina	2.04	2
	L-Lisina	3.14	4.85
	L-Meteonina	0.95	1.18
	L-Treonina	0.60	1.54
	L-Isoleucina	5.57	4.58
	L-Valina	3.07	2.61
	L-Glutàmic	0	24.58
	NEAA/EAA	0.88	0.97
NEAA/EAA PV33 / NEAA/EAA PV20 = 1.10			
c	Aport proteic individual (%)	PV20	PV33
Farines i extrusionats	Farina de peix (CP70%)	72.0	67.28
	CPSP G <sup>1</sup>	7.47	0
	Gluten de blat (Amylium)	0	0
	Extrusionat de blat	0	1.64
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	9.73	0
	Soja (CP 42%)	10.78	31.5

Aproximacions realitzades segons les dades aportades per I.N.R.A. (2002).

### Experiència de creixement amb les dietes experimentals

540 orades ja aclimatades ( $14.7 \pm 0.1$  g) es van distribuir aleatòriament en 6 tancs experimentals de fibra de vidre de  $0.5 \text{ m}^3$  (Fig. 16). Durant 12 setmanes (del 27 d'abril al 20 de juliol de 2001) els peixos es van mantenir en un sistema d'aigua marina interior, sota fotoperíode natural i una temperatura també natural que va oscil·lar entre 17 i 25 °C. Els animals van alimentar-se amb la dieta experimental corresponent (PV20

o PV33), de manera manual, dues vegades al dia fins a la sacietat. Els resultats de biomassa reportats després de 12 setmanes de creixement es resumeixen a la taula 10.



Figura 16. Instal·lacions de l'Institut d'Aqüicultura de Torre la Sal – C.S.I.C. (Castelló, Espanya)

Taula 10. Pesos finals assolits i índex de creixement específic (SGR) de les orades alimentades amb les dietes experimentals.

Orada		
	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
PV20	74.9 ± 0.67	1.98 ± 0.0
PV33	70.9 ± 1.37	1.91 ± 0.0

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels grups triplicats per a cadascuna de les dietes. No es van detectar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els paràmetres estudiats. PV20 i PV33 contenen un 20.5 i un 33% de fonts proteiques d'origen vegetal, respectivament. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial;  $t$  és el període de creixement en dies. Dades Projecte PEPPA Q5RS-2000-30068.

### Presa de mostres

Es va continuar alimentant els animals fins 6 dies després de finalitzar el període de creixement. En aquest moment es realitzà una experiència postprandial: animals sotmesos a un dejuni previ de 24 hores, es van anestesiar lleugerament amb MS-222 ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) i se'ls forçà a ingerir, mitjançant una cànula gàstrica, una ració corresponent a l'1% del seu pes corporal (Fig. 17). Després de la ingesta, els animals es van recuperar ràpidament en caixes de plàstic (Fig. 18), i seguidament es van transferir a tancs cònics de  $0.2 \text{ m}^3$  fins a la presa de mostres.

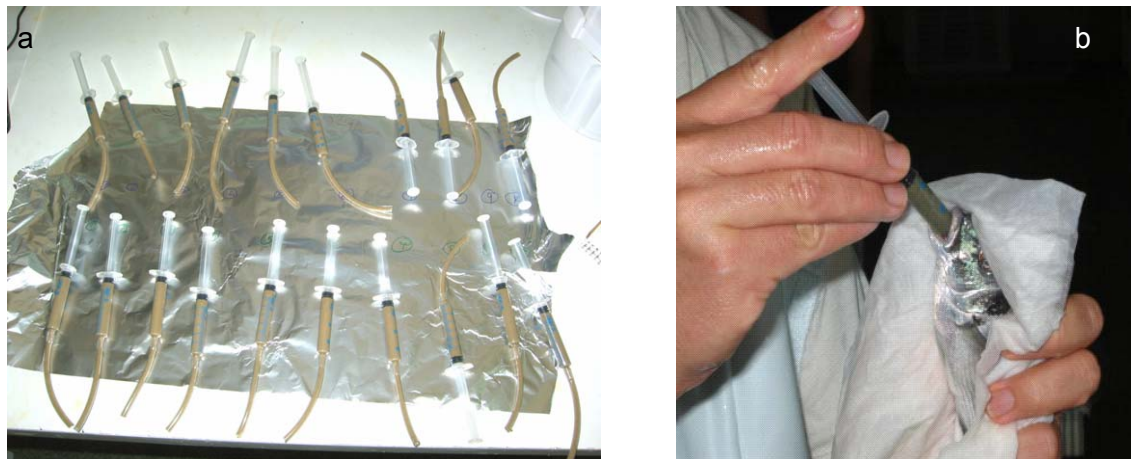


Figura 17. Cànules gàstriques amb la ració de pinso a administrar (a) i alimentació d'una orada (b). L'extrusionat es va moldre i barrejar amb aigua provinent dels tancs en una proporció 1:2 per poder administrar correctament la ració.

A diferents temps postingesta (1, 3, 6, 12 i 24 hores), 10 animals per condició es van anestesiar novament, van sacrificar-se per desmedul·lació i es van pesar. Seguidament va aïllar-se l'aparell digestiu i va mesurar-se'n la longitud<sup>9</sup> i la dispersió del contingut intestinal. El fragment més proximal de l'intestí es va congelar ràpidament en nitrogen líquid per a la valoració de l'activitat proteolítica total. A les 6 hores postingesta, la resta d'intestí proximal i tot l'intestí distal es van rentar en salí isosmòtic que contenia PMSF i es van congelar ràpidament en nitrogen líquid. Posteriorment es van conservar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A les 24 hores, un segon fragment proximal es va fixar en formol per a l'estudi de la histologia intestinal.



Figura 18. Tancs de recuperació de l'Institut d'Aqüicultura de Torre la Sal a Castelló.

<sup>9</sup> La longitud de l'intestí es va mesurar exclouent els cecs pilòrics



## Analítiques

Tipus d'anàlisi	Temps (h)	Mètode utilitzat	Referència (M&M)	Segment estudiat
Histologia	24	Tinció H-E	3.4.1	Proximal
Activitat proteolítica total	1, 3, 6, 12 i 24	Walter (1984)	3.4.2.1	Proximal
Fluxes de nutrients	6	VMAs (Sala-Rabanal <i>et al.</i> , 2004)	3.4.3.3	Proximal, Distal

## RESULTATS

La taula 11 mostra els pesos finals assolits i els índexs de creixement específic de les orades alimentades amb les dietes PV20 i PV33 utilitzades en l'experiència postprandial. Els animals PV33 van mostrar un creixement inferior als animals PV20, amb una disminució del 6.8% del pes final i un decrement del 4.4% de l'SGR. En els valors de biomassa reportats en l'experiència de creixement (Taula 10), s'observà una tendència a disminuir el pes i l'SGR de les orades alimentades amb la dieta PV33 *versus* les PV20, encara que les diferències entre els dos grups d'animals no foren significatives.

Taula 11. Pesos finals i índex de creixement específic (SGR) de les orades alimentades amb les dietes experimentals utilitzades en l'experiència postingesta.

Orada		
	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
PV20	84.17 ± 1.87 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.02 <sup>a</sup>
PV33	78.44 ± 1.90 <sup>b</sup>	1.82 ± 0.03 <sup>b</sup>

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels 50 animals mostrejats per a cadascuna de les dietes. Les diferències ( $p < 0.05$ ) per a cada paràmetre s'assenyalen amb diferents lletres. PV20 i PV33 contenen un 20.5 i un 33% de fonts proteiques d'origen vegetal, respectivament. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial;  $t$  és el període de creixement en dies.

No es van trobar diferències significatives en la longitud intestinal relativa (LIR) entre les orades PV20 i PV33 (Taula 12), encara que en aquestes últimes la LIR fou un 7.5% superior.

Taula 12. Longitud intestinal relativa (LIR) de les orades mostrejades en l'experiència postingesta.

	LIR (mm · g animal <sup>-1</sup> )
PV20	2.13 ± 0.07
PV33	2.29 ± 0.09

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels 50 animals mostrejats per a cada dieta. La longitud intestinal es va mesurar excloent els cecs pilòrics, i es va referir al pes de l'animal.

La posició i la dispersió del contingut intestinal a diferents moments postingesta permet fer una aproximació del temps que requereixen les dietes per ser digerides i absorbides. La figura 19 mostra l'evolució postprandial d'aquest paràmetre. No s'observaren canvis significatius en la posició del bolus alimentari entre els animals PV20 i PV33 en els moments postingesta estudiats.

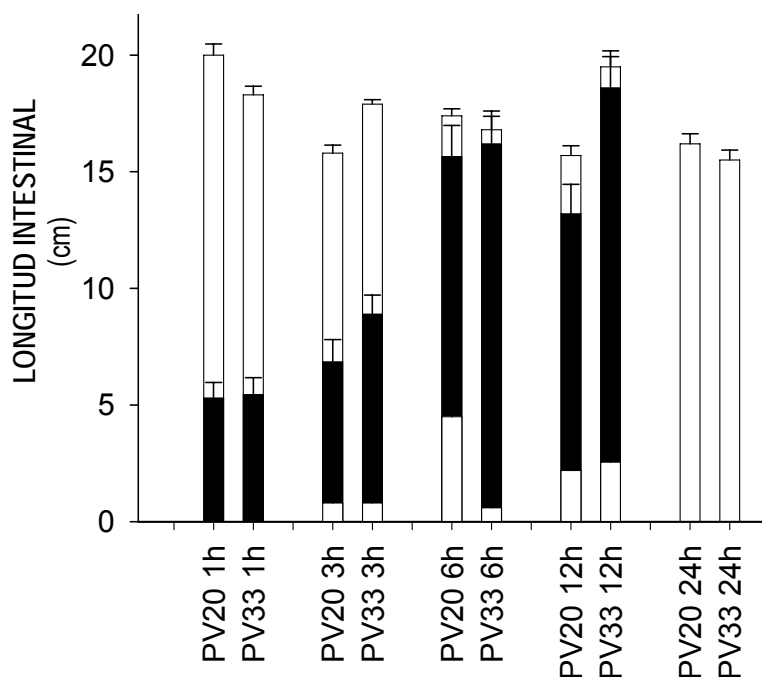


Figura 19. Seguiment postprandial de la dispersió del contingut intestinal en orades alimentades amb les dietes experimentals. Les barres negres indiquen la presència d'aliment al tub digestiu, representat com a barres blanques. Els valors es mostren com la mitjana  $\pm$  S.E.M. dels 10 animals mostrejats a cada temps.

S'estudià l'evolució postprandial de l'activitat proteolítica total (APT) a l'intestí proximal de les orades PV20 i PV33 (Fig. 20). En ambdós grups, el valor màxim d'APT es va registrar 1 h després de la ingesta, però la magnitud del pic fou un 40.2% superior en els peixos PV20 que en el grup PV33. Els perfils postingesta d'aquesta activitat van diferir entre els dos grups: en les orades PV20 l'APT va créixer a les 3 hores, mantinguent-se entre les 3 i les 6 h, per caure a les 24 h postingesta; en els peixos PV33 l'activitat proteasa va disminuir des d'1 fins a les 6 h postingesta, i va aparèixer un repic a les 12 h postingesta (relació 12h/6h = 1.92), suggerint en aquest cas la presència d'aliment poc digerit a l'intestí. En els peixos PV33 l'activat basal s'assolí també a les 24 h.

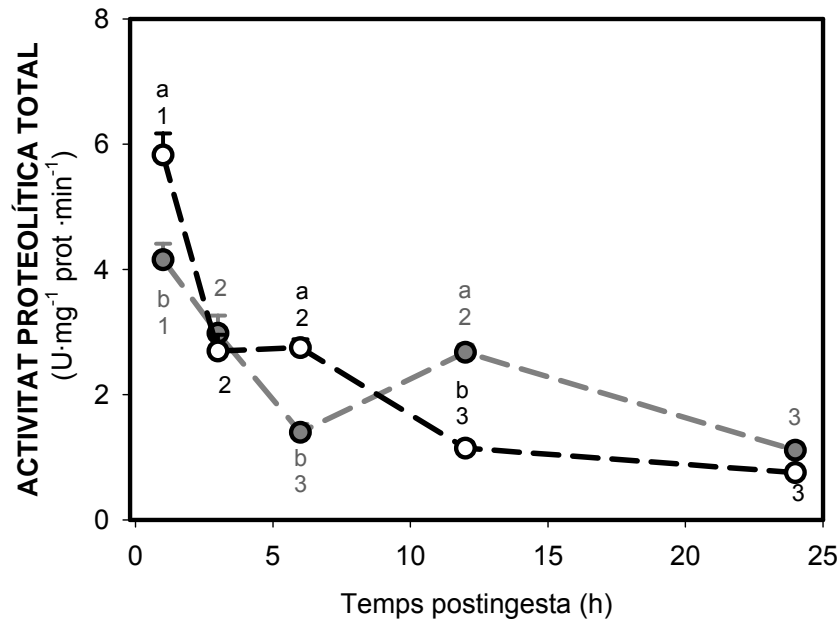


Figura 20. Seguiment postprandial de l'activitat proteolítica total al primer segment de l'intestí proximal d'orades alimentades amb les dietes experimentals: PV20 (cercles blancs) i PV33 (cercles grises). Els valors es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 10 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives entre els diferents temps postingesta es representen amb diferents números.

Es van obtenir vesícules de membrana apical (VMAs) d'enteròcits de l'intestí proximal i l'intestí distal de les orades PV20 i PV33. Les vesícules obtingudes presentaven un enriquiment en fosfatasa alcalina (enzim marcador de la membrana apical) i un empobriment en  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa i citrat sintasa (enzims validats com a marcadors de membrana basolateral i mitocondrial, respectivament). Així, les VMAs obtingudes eren adequades per a l'estudi del transport de nutrients a través de la membrana apical (veure Annex 2 al materials i mètodes, pàg. 59).

S'estudiaren els influxes de 3 aminoàcids essencials (L-leucina, L-lisina i L-fenilalanina), 3 aminoàcids no essencials (L-alanina, L-glutàmic i L-prolina) i de D-glucosa a les VMAs. La captació es va mesurar després de 5 s d'incubació (en la zona lineal d'influx per a tots els casos estudiats; veure Annex 3 al materials i mètodes, pàg. 61). Els resultats s'expressaren en funció de la proteïna de la suspensió vesicular (Figs. 21a, 22a i 23a) i també es normalitzaren a unitats de concentració (Figs. 21b, 22b i 23b). S'optà per la doble representació perquè la relació entre el volum vesicular en funció de la proteïna i la quantitat de proteïna de la suspensió es va modificar (Taula 13) entre les VMAs proximals i distals en les orades PV20, i també entre les vesícules

obtingudes dels segments distals dels dos grups d'orades, denotant que tant el segment intestinal analitzat com la dieta poden afectar el volum de les VMAs obtingudes (veure Annex 4 al materials i mètodes, pàg. 65).

Taula 13. L-alanina retinguda a l'equilibri i volum vesicular en funció de la proteïna de les vesícules obtingudes a partir dels segments proximal i distal de l'intestí d'orada.

	PV20		PV33	
	Int. Proximal	Int. Distal	Int. Proximal	Int. Distal
L-alanina intravesicular a l'equilibri (pmols · µg prot <sup>-1</sup> )	580.6 ± 5.3 <sup>2</sup>	942.5 ± 56.6 <sup>a,1</sup>	615.2 ± 66.8	716.7 ± 0.1 <sup>b</sup>
Volum (V) (µL · µg prot <sup>-1</sup> )	1.93 ± 0.01 <sup>2</sup>	3.14 ± 0.19 <sup>a,1</sup>	2.05 ± 0.22	2.39 ± 0.18 <sup>b</sup>

Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 3 determinacions per a cada condició. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números. Càlculs realitzats segons la descripció de l'annex 4 del M&M. (pàg. 65). Int: intestí.

Després de 12 setmanes de creixement amb les dietes experimentals, en ambdós grups de peixos l'influx de nutrients fou superior a la zona distal de l'intestí. Pel que fa a l'efecte de les dietes, els animals PV33 mostraren, en comparació a les orades PV20, una major captació a l'intestí proximal per als aminoàcids (amb excepció de l'àcid glutàmic) i la D-glucosa. Els influxes de L-lisina i L-glutàmic a la zona intestinal distal foren també superiors en el grup de major substitució, suggerint una regulació a l'alça del nombre de transportadors per a aquests nutrients.

La normalització dels resultats obtinguts a unitats de concentració (Figs. 21b, 22b i 23b) no mostrà variacions importants respecte els perfils d'influxes, mantinguent-se per a tots els nutrients estudiats un patró similar a l'obtingut en expressar els resultats en funció de la quantitat de proteïna.

Els fluxes d'aminoàcids essencials i no essencials (Figs. 21a i 22a) foren de magnituds similars, mentre que la captació de la glucosa (Fig. 23a) va ser superior per als dos grups d'orades

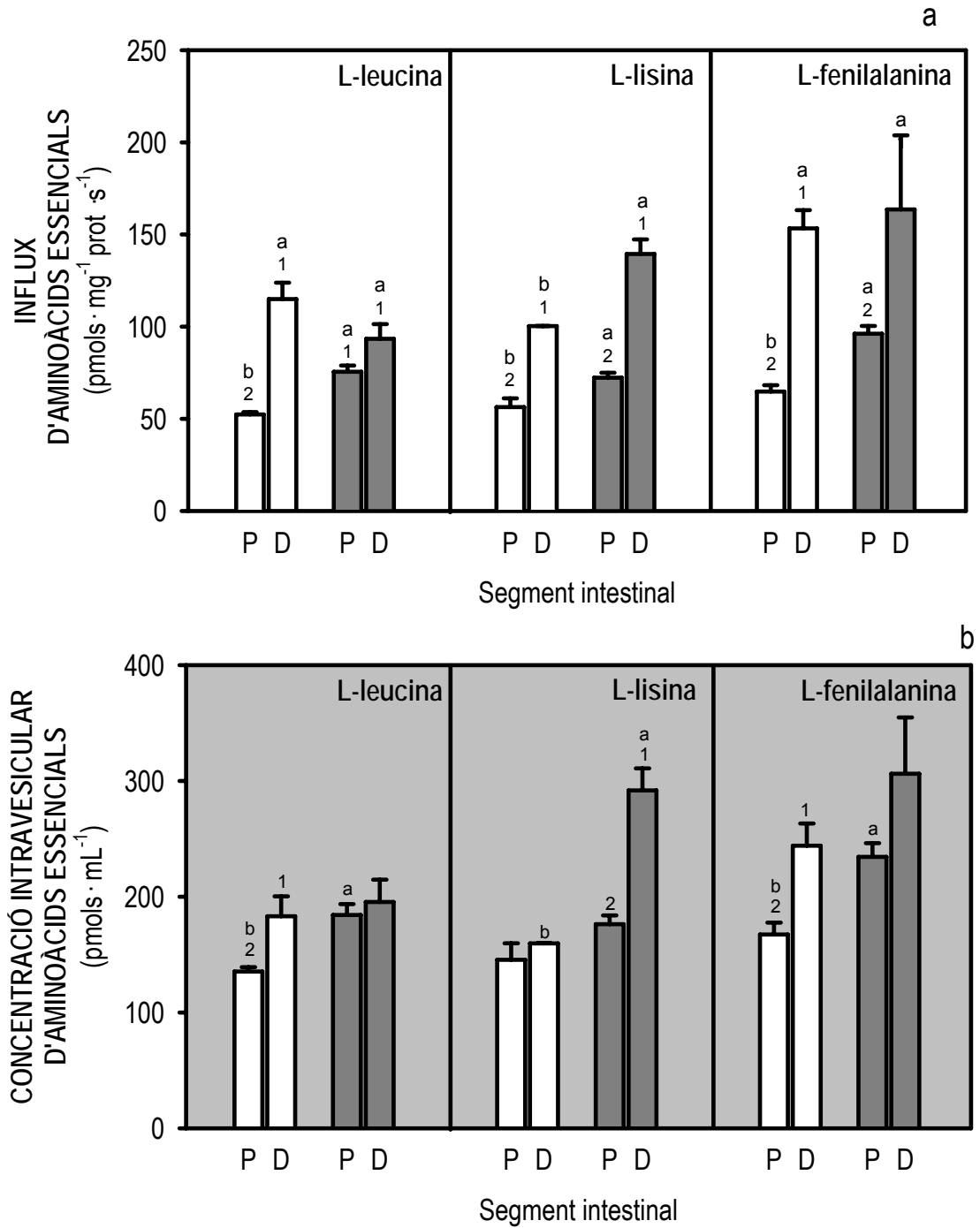


Figura 21. Captació d'aminoàcids essencials en vesícules de membrana apical (VMAs) obtingudes d'intestí proximal (P) i intestí distal (D) a les 6 hores postingesta d'orades alimentades amb les dietes experimentals (a). Normalització dels fluxes en funció del volum vesicular als 5 s d'incubació (b). PV20 (barres blanques) i PV33 (barres grises). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números.

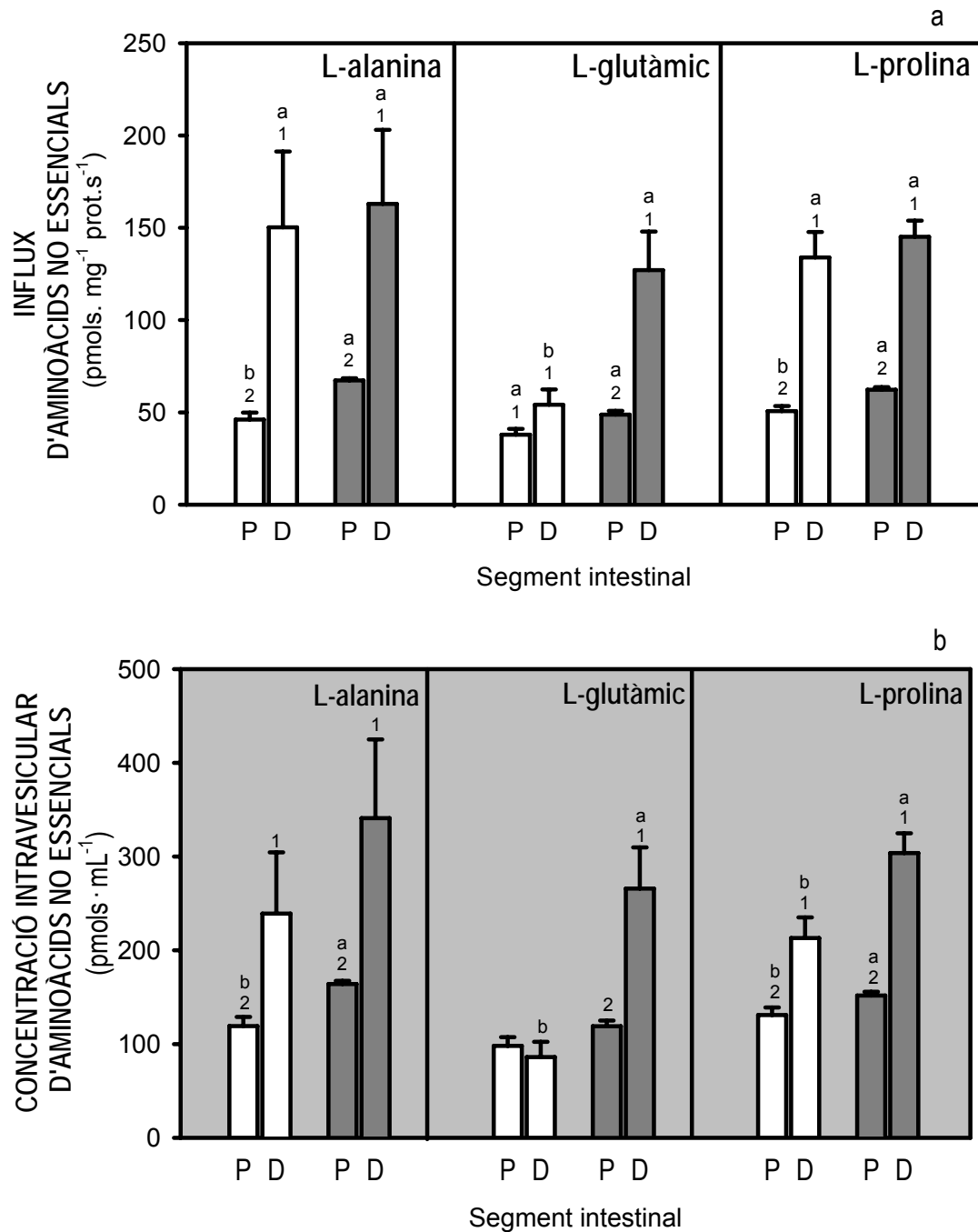


Figura 22. Captació d'aminoàcids no essencials en vesícules de membrana apical (VMAs) obtingudes d'intestí proximal (P) i intestí distal (D) a les 6 hores postingesta d'orades alimentades amb les dietes experimentals (a). Normalització dels fluxes en funció del volum vesicular als 5 s d'incubació (b). PV20 (barres blanques) i PV33 (barres grises). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números.

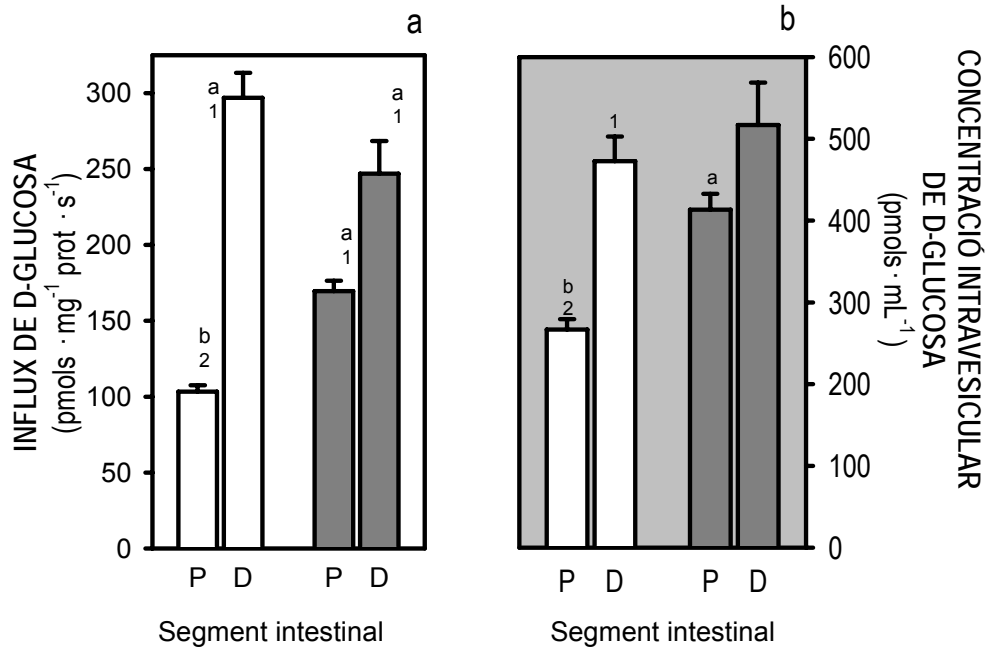


Figura 23. Captació de D-glucosa en vesícules de membrana apical (VMAs) obtingudes d'intestí proximal (P) i intestí distal (D) a les 6 hores postingesta d'orades alimentades amb les dietes experimentals (a). Normalització dels fluxes en funció del volum vesicular als 5 s d'incubació (b). PV20 (barres blanques) i PV33 (barres grises). Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números.

La figura 24 mostra talls transversals d'intestí proximal d'orades PV20 i PV33. Es poden veure de l'exterior cap a l'interior les capes serosa, muscular externa i mucosa, que presenta unes vellositats poc definides. No s'observaren diferències significatives en l'estructuració de les diferents capes, longitud de les vellositats o el número de cèl·lules mucoses entre els animals alimentats amb les dues dietes.

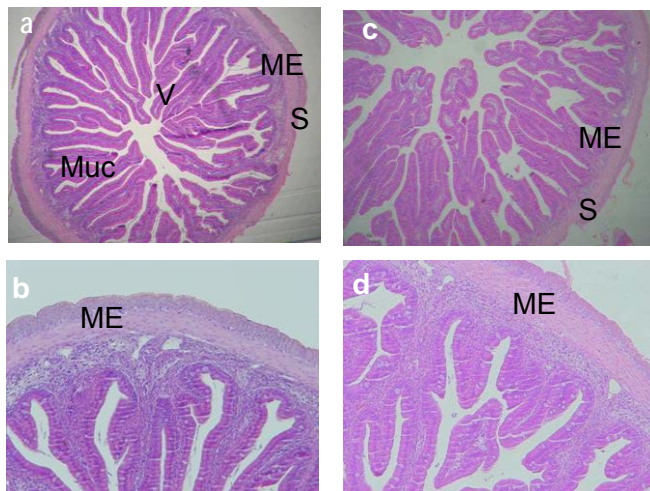


Figura 24. Talls transversals representatius de l'intestí proximal de les orades alimentades amb les dietes experimentals. a: PV20 H-E 4x; b: PV20 H-E 10x; c: PV33 H-E 4x; d: PV3 H-E 10x. S= serosa; ME= muscular externa; Muc= mucosa; V= vellositats.

**TRUITA**

## **DISSENY EXPERIMENTAL**

### **Animals**

Les truites (*Oncorhynchus mykiss*) usades en aquesta experiència provenien de la piscifactoria experimental de l'Institute National de la Recherche Agrobiologique (I.N.R.A., Donzacq, França).

### **Dietes**

Les dietes testades en truita irisada (Taula 14) van formular-se a l'Institute National de la Recherche Agrobiologique (St. Pée-sur-Nivell, França). En la dieta PV35, un 34.5% de proteïna era d'origen vegetal (gluten de blat, extrusionats de blat i de pèsol, i concentrat de soja); en la dieta PV47, la quantitat de font proteica vegetal s'incrementà fins a un 47% (s'utilitzaren en aquest cas extrusionats de blat i de pèsol, i concentrat de soja). Ambdues dietes eren isoproteiques, isolipídiques i isoenergètiques.

En PV35 i PV47 s'utilitzà, igual que en les dietes d'orada, una barreja d'ingredients vegetals per tal de reflexar la composició aminoacídica del múscul de l'espècie, minimitzar la necessitat de suplementació amb aminoàcids lliures i disminuir els efectes dels factors antinutricionals presents en les farines emprades. En la dieta PV47 s'addicionà àcid glutàmic lliure per tal d'incrementar la quantitat d'aminoàcids no essencials, essent la relació entre aminoàcids no essencials (NEAA) i aminoàcids essencials (EAA) entre les dietes PV47 i PV35 de 1.47. En ambdues dietes, però, el requeriment d'aminoàcids essencials es va cobrir.

### **Experiència de creixement amb les dietes experimentals**

Es portà a terme a l'estació experimental de Donzacq (Fig. 25), sota fotoperíode natural i aigua d'un sortidor també natural a una temperatura de  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Sis grups de 75 animals (pes inicial  $14.10 \pm 0.03$  g) es van distribuir de manera aleatòria en tancs circulars de fibra de vidre d' $1\text{m}^3$  de capacitat. Cada grup es va alimentar durant 12 setmanes (del 26 de març al 15 de juny de 2001) amb una de les dues dietes experimentals dues vegades al dia, de manera manual, fins a la sacietat. Els resultats de biomassa obtinguts després del període de cultiu (Taula 15) no van mostrar diferències entre els dos grups experimentals.



Taula 14. Composició aproximada (a), ingredients utilitzats (b) i percentatge de cadascuna de les fonts de proteïna (c) de les dietes experimentals de truita.

a	Composició Aproximada	PV35	PV47
	Matèria seca (MS, %)	92.2	90.5
	Proteïnes (% MS)	45.1	46.3
	Lípids (% MS)	15.6	16.4
	Energia Bruta (MJ/Kg)	22.4	22.1
b	Ingredients (g/kg)	PV35	PV47
Farines i extrusionats	Farina de peix (CP70%)	389.93	316.39
	CPSP G <sup>1</sup>	0	0
	Gluten de blat (Amylium)	71.39	0
	Extrusionat de blat	135.71	71.78
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	215.09	56.82
Grasses	Soja (CP 42%)	25.26	331.25
	Oli de peix	101.59	109.48
Vitamines i lligands	Lligand	10	10
	Mix Mineral <sup>2</sup>	10	10
	Mix de Vitamines <sup>2</sup>	10	10
	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10.89	16.06
Suplementació (aa lliures)	L-Histidina	1.77	1.75
	L-Lisina	6.46	5.94
	L-Meteonina	0.91	1.99
	L-Treonina	1.53	1.73
	L-Isoleucina	5.92	4.1
	L-Valina	3.54	2.71
	L-Glutàmic	0	50
	NEAA/EAA	0.7	1.03
NEAA/EAA PV47 / NEAA/EAA PV35 = 1.47			

<sup>1</sup>Concentrat de proteïna soluble de peix; <sup>2</sup>D'acord amb el National Research Council (1993).

c	Aport proteic individual (%)	PV35	PV47
Farines i extrusionats	Farina de peix (CP70%)	65.55	52.79
	CPSP G <sup>1</sup>	0	0
	Gluten de blat (Amylium)	4.38	0
	Extrusionat de blat	6.34	2.5
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	19.65	3.87
	Soja (CP 42%)	4.17	40.84

Aproximacions realitzades segons les dades aportades per I.N.R.A. (2002).

Taula 15. Pesos finals assolits i índexs de creixement específic (SGR).

	Truita	
	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
PV35	110.0 ± 2.0	2.54 ± 0.02
PV47	100.1 ± 3.9	2.42 ± 0.05

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels grups triplicats per a cadascuna de les dietes. No es van detectar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els paràmetres estudiats. PV35 i PV47 contenen un 35 i un 47% de fonts de proteïna d'origen vegetal, respectivament. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial;  $t$  és el període de creixement en dies. Dades Projecte PEPPA Q5RS-2000-30068.



Figura 25. Instal·lacions de l'estació experimental de Donzacq (Landes, França).

### Presa de mostres

Es va continuar alimentant als animals, i set dies després de finalitzar l'experiència de creixement es va realitzar un experiment postprandial. L'alimentació i la presa de mostres a diferents temps postingesta (1, 3, 6 i 12 hores) es va fer seguint el protocol ja descrit per les orades (pàgina 77)<sup>10</sup>. La figura 26 mostra els tancs usats en la recuperació de la ingesta forçada i l'experiment postprandial.



Figura 26. Tancs de recuperació i experiència postprandial de l'estació experimental de Donzacq (Landes, França).

<sup>10</sup> En aquesta espècie no es va analitzar la dispersió del contingut intestinal.

## Analítiques

Tipus d'anàlisi	Temps (h)	Mètode utilitzat	Referència (M&M)	Segment estudiat
Histologia	12	Tinció H-E	3.4.1	Proximal
Activitat proteolítica total	1, 3, 6 i 12	Walter (1984)	3.4.2.1	Proximal
Fluxes de nutrients	6	VMA (Modificació de Sala-Rabanal <i>et al.</i> , 2004)	3.4.3.3	Proximal, Distal

## RESULTATS

En la truita, el creixement amb les dues dietes experimentals fou similar, sense observar-se canvis significatius ni en el pes final assolit ni en l'SGR dels animals utilitzats en l'experiència postingesta (Taula 16), coincidint amb els resultats de biomassa obtinguts en l'experiència de creixement (Taula 15).

Taula 16: Pesos finals assolits i índexs de creixement específic (SGR) de les truites utilitzades en l'experiència postingesta.

Truita		
	pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
PV35	125.4 ± 4.05	2.13 ± 0.04
PV47	116.4 ± 2.28	2.12 ± 0.06

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels 50 animals utilitzats en l'experiència postprandial per a cadascuna de les dietes experimentals. No es van detectar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els paràmetres estudiats. PV35 i PV47 contenen un 35 i un 47% de fonts de proteïna d'origen vegetal, respectivament. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial;  $t$  és el període de creixement en dies.

L'estudi de la longitud intestinal relativa (Taula 17) no mostrà diferències significatives, encara que s'aprecià una tendència a l'alça d'aquest paràmetre en les truites PV47 (+7.8%).

Taula 17. Longitud intestinal relativa (LIR) de les truites mostrejades en l'experiència postingesta.

LIR (mm · g animal <sup>-1</sup> )	
PV35	0.89 ± 0.02
PV47	0.96 ± 0.03

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels 50 animals mostrejats per a cadascuna de les dietes experimentals. La longitud intestinal es va mesurar exclouent els cecs pilòrics i es va referir al pes de l'animal.

La figura 27 mostra l'evolució postingesta de l'activitat proteasa alcalina en els dos grups experimentals. Els animals PV35 i PV47 mostraren un perfil postprandial similar: en ambdós casos es detectà un pic d'APT 1 h després de la ingesta, i seguidament l'activitat va decreixer fins a les 6 h postingesta. Es detectà a les 12 h un increment en l'activitat proteolítica, que fou significatiu en les truites PV47 (relació 12h/6h = 2.14).

Només es registraren diferències entre els dos grups de peixos a les 3 hores postingesta, on l'activitat proteolítica del grup PV47 fou significativament superior a la de les truites PV35 ( $2.83 \pm 0.26$  vs  $1.99 \pm 0.43$  U · mg<sup>-1</sup> prot · min<sup>-1</sup>, respectivament).

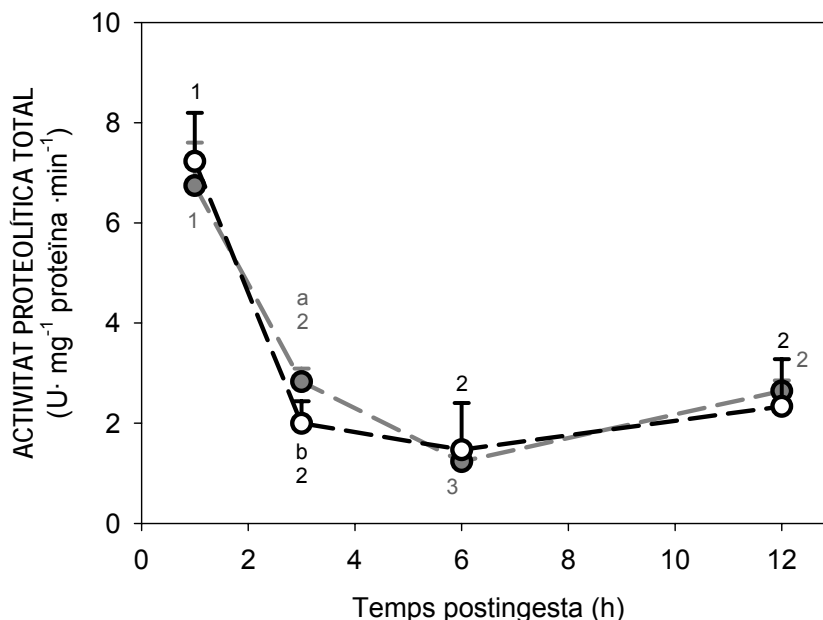


Figura 27. Seguiment postprandial de l'activitat proteolítica total al primer segment de l'intestí proximal de truites alimentades amb les dietes experimentals: PV35 (cercles blancs) i PV47 (cercles grisos). Els valors es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 10 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives entre els diferents temps postingesta es representen amb diferents números.

S'obtingueren vesícules de membrana apical d'enteròcits dels segments proximal i distal de l'intestí a les 6 h postingesta de truites alimentades amb les dietes PV35 i PV47. Es validaren les suspensions vesiculars obtingudes (Annex 2 al materials i mètodes, pàg. 59), i es determinaren els influxes d'aminoàcids essencials, aminoàcids no essencials i D-glucosa als 5 s, temps pertanyent a la zona de linealitat de captació (Annex 3 al materials i mètodes, pàg. 61). Per a cada suspensió es quantificà la quantitat de proteïna i es determinà la concentració de L-alanina retinguda en la situació d'equilibri per normalitzar els resultats com a concentració intravesicular de nutrient (veure Annex 4 del material i mètodes, pàg. 65). S'utilitzaren els dos sistemes d'expressió perquè es van trobar diferències en el volum entre els segments intestinals estudiats i entre les dietes experimentals testades per a un determinat segment (Taula 18).

Taula 18. L-alanina retinguda a l'equilibri i volum vesicular de les vesícules obtingudes a partir dels segments proximal i distal de l'intestí de truita.

	PV35		PV47	
	Int. Proximal	Int. Distal	Int. Proximal	Int. Distal
Concentració intravesicular de L-alanina a l'equilibri (pmols · µg prot <sup>-1</sup> )	188.4 ± 19.6 <sup>b,2</sup>	1059.5 ± 16.05 <sup>b,1</sup>	695.6 ± 33.0 <sup>a,2</sup>	1392.1 ± 59.5 <sup>a,1</sup>
Volum (V) (µL · µg prot <sup>-1</sup> )	0.62 ± 0.06 <sup>b,2</sup>	3.53 ± 0.05 <sup>b,1</sup>	2.45 ± 0.11 <sup>a,2</sup>	4.64 ± 0.19 <sup>a,1</sup>

Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 3 determinacions per a cada condició. Les diferències significatives (p<0.05) entre dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números. Càlculs realitzats segons la descripció de l'annex 4 del M&M. (pàg. 65). Int: intestí.

En les truites PV35, l'influx a les VMAs obtingudes a partir del segment distal de l'intestí fou superior al registrat en VMAs proximals per a tots els nutrients estudiats (L-aminoàcids i D-glucosa. Figs. 28a, 29a i 30a). En les truites PV47, en canvi, el patró de regionalització varià, i la captació de nutrients a la zona proximal superà l'influx registrat a les VMAs d'intestí distal. Aquest canvi de patró fou degut a un significatiu increment en els influxes de l'intestí proximal en les truites PV47, que augmentaren entre 3 i 5 vegades *versus* les truites PV35 (un mínim de 2.92 en la L-fenilalanina i un màxim de 5.07 en el cas de la L-lisina). La captació de la zona distal es mantingué estable, augmentant lleugerament només per la leucina (x1.48) i la prolina (x1.36).

La normalització dels fluxes de nutrients a unitats de concentració modificà el patró de regionalització en aquesta espècie (Figs. 28b, 29b i 30b) degut a les variacions registrades en el volum de les vesícules obtingudes (Taula 18). En emprar aquest sistema de representació, s'observa que la capacitat d'absorció fou superior en el segment intestinal proximal per a ambdós grups de peixos, amb l'excepció de la L-alanina, trobant-se només diferències entre dietes per a la L-fenilalanina i la D-glucosa. En aquesta espècie, els fluxes d'aminoàcids essencials (Fig. 28) foren superiors als fluxes d'aminoàcids no essencials i D-glucosa (Figs. 29 i 30).

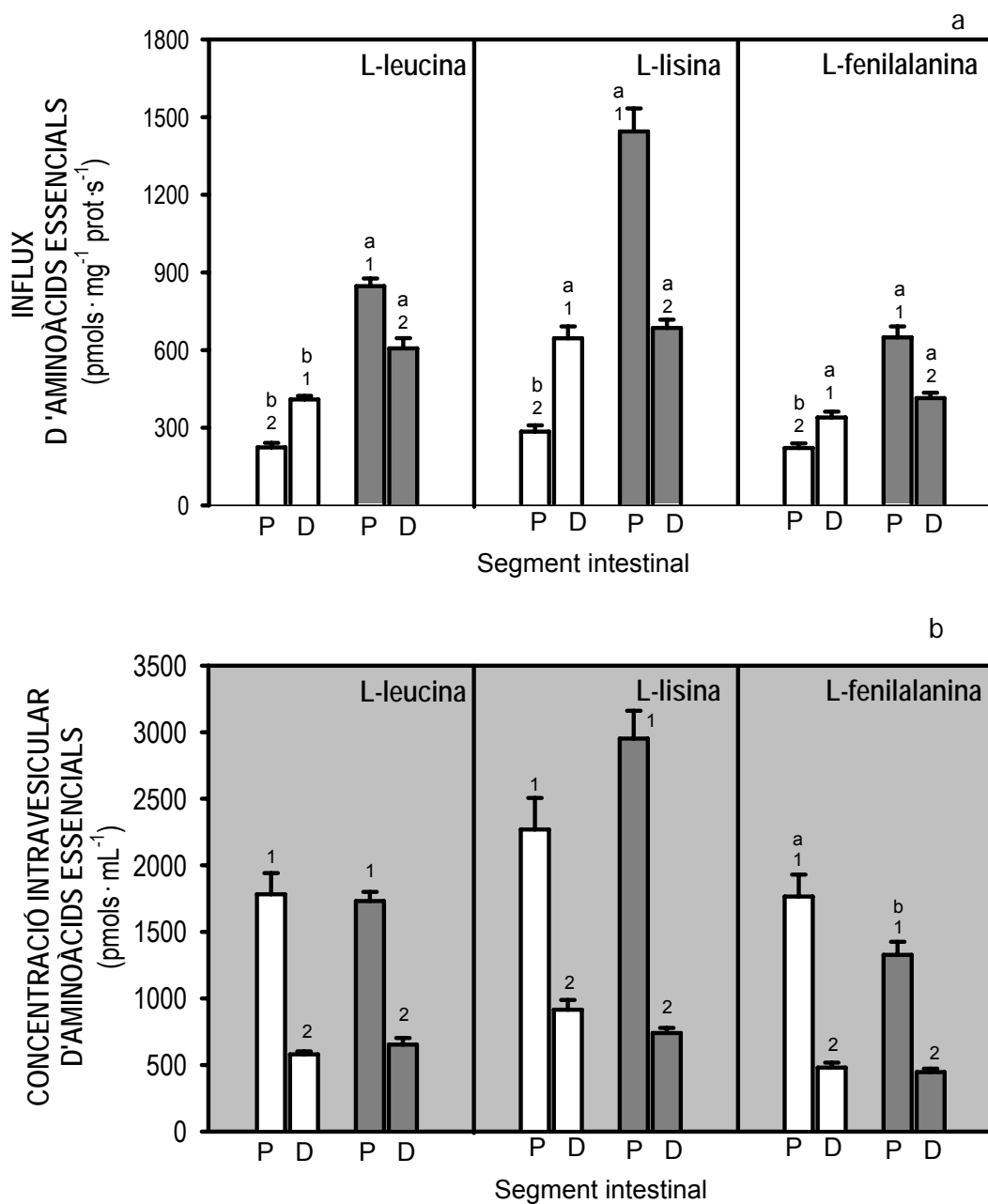


Figura 28. Captació d'aminoàcids essencials en vesícules de membrana apical (VMAs) obtingudes d'intestí proximal (P) i intestí distal (D) a les 6 hores postingesta de truites alimentades amb les dietes experimentals (a). Normalització dels fluxes en funció del volum vesicular als 5 s d'incubació (b). PV35 (barres blanques) i PV47 (barres grises). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números.

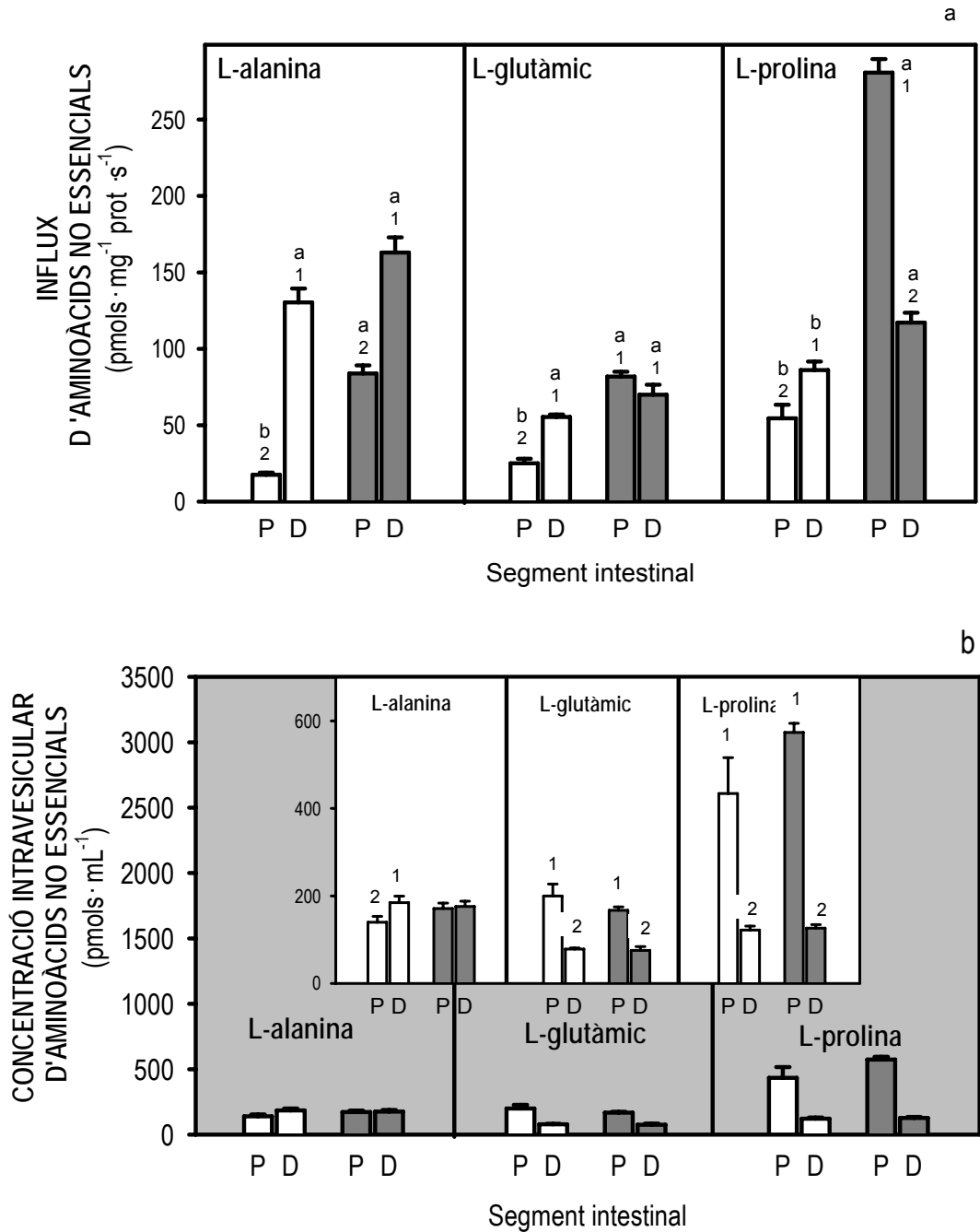


Figura 29. Captació d'aminoàcids no essencials en vesícules de membrana apical (VMAs) obtingudes d'intestí proximal (P) i intestí distal (D) a les 6 hores postingesta de truites alimentades amb les dietes experimentals (a). Normalització dels fluxes en funció del volum vesicular als 5 s d'incubació (b). PV35 (barres blanques) i PV47 (barres grises). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números.

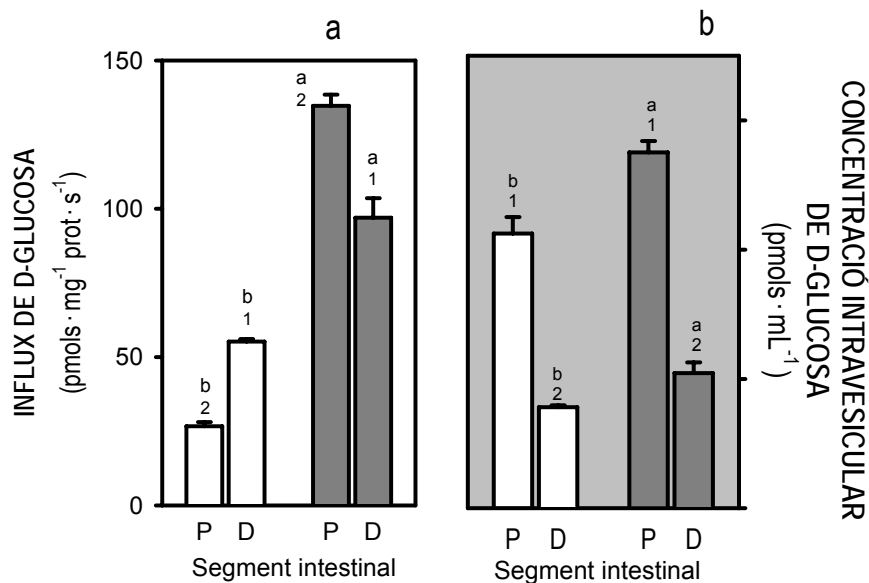


Figura 30. Captació de D-glucosa en vesícules de membrana apical (VMAs) obtingudes d'intestí proximal (P) i intestí distal (D) a les 6 hores postingesta de truites alimentades amb les dietes experimentals (a). Normalització dels fluxes en funció del volum vesicular als 5 s d'incubació (b). PV35 (barres blanques) i PV47 (barres grises). Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre segments intestinals es representen amb diferents números.

La figura 31 mostra talls transversals de l'intestí proximal de les truites alimentades amb les dietes experimentals. S'observen, a l'igual que en orada, de l'exterior cap a l'interior: les capes serosa (S), muscular externa (ME) i mucosa (Muc). Els peixos PV47 presenten un menor longitud i densitat de vellositats (V), així com una disminució en el nombre de cèl·lules mucoses (GC).

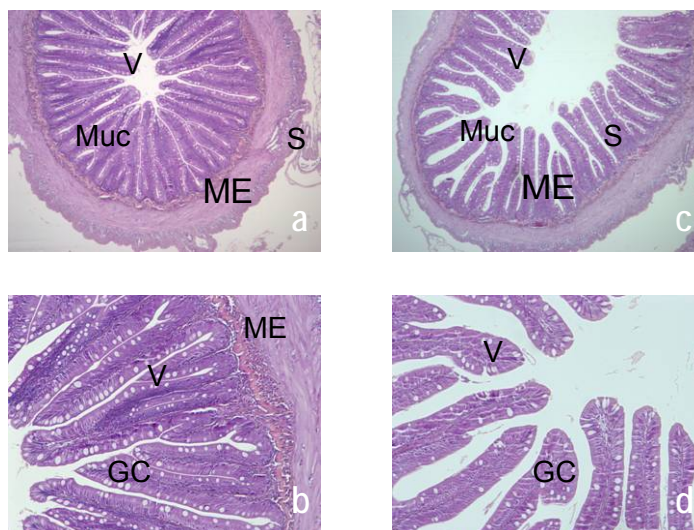


Figura 31. Talls transversals d'intestí proximal de truites alimentades amb les dietes experimentals. a: dieta PV35 H-E 4x; b: dieta PV35 H-E 10x; c: dieta PV47 H-E 4x; d: dieta PV47 H-E 10x. S= serosa; ME= muscular externa; Muc= mucosa; V= vellositats; GC= cèl·lules mucoses.



## DISCUSSIÓ

La farina de peix és una font primera limitant en la formulació de pinsos per a aquicultura; les farines obtingudes a partir d'ingredients vegetals, en canvi, són abundants i tenen un cost assumible. Per aquests motius, aquestes últimes s'han de tenir en compte com a fonts alternatives en la formulació de dietes per aquicultura (FAO, 2004). Però s'ha de considerar també la àmplia presència en les farines vegetals de factors antinutricionals (Francis *et al.*, 2001), molècules que afecten l'aprofitament de l'aliment en peixos, especialment en els d'hàbits carnívors (Makkar *et al.*, 1993). A més dels estudis on es descriu una disminució en la ingesta i el creixement en peixos alimentats amb dietes de substitució (Sanz *et al.*, 1994; Olvera-Novoa *et al.*, 1998), s'han descrit també efectes concrets d'aquests compostos sobre, per exemple, els processos de digestió i absorció. Així, s'ha vist que els factors antinutricionals poden disminuir l'activitat de les proteases d'origen pancreàtic (Robaina *et al.*, 1995; Alarcón *et al.*, 1999) per la formació de complexos amb proteïnes (Moyano *et al.*, 1999) o per la supressió del mecanisme de retroalimentació positiva sobre la alliberació de proteases a nivell pancreàtic (Dabrowski *et al.*, 1989). Poden també provocar dèficits de minerals per la formació de complexos (Teskeredzic *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1999) i provocar alteracions en la histologia de l'intestí (Hendriks *et al.*, 1990; Baeverfjord i Krogdahl, 1996; Krogdahl, 2003), afectant-se com a conseqüència l'absorció intestinal de nutrients.

L'increment de factors antinutricionals associat a l'augment de fonts vegetals en la dieta, es pot relacionar amb una disminució del pic postingesta d'activitat proteolítica en les orades PV33 *versus* les orades PV20. En aquest sentit, diversos treballs mostren en aquesta espècie una afectació de les activitats proteasa alcalina per la presència de fonts vegetals en la dieta, com els estudis de Robaina *et al.* (1995) en orades alimentades amb dietes on un 30% de la proteïna provenia de farina de tramussos o de soja; o de Venou *et al.* (2003) en substituir un 40% de la farina de peix per extrusionat de blat. També els assajos *in vitro* utilitzant extractes vegetals en preparacions intestinals d'orada (Moyano *et al.*, 1999; Alarcón *et al.*, 1999) han obtingut resultats similars.

En la carpa (Onishi *et al.*, 1976), l'anguila (Takii *et al.*, 1985) o el silur (Uys *et al.*, 1987), espècies que viuen en un rang tèrmic similar al de l'orada, s'han descrit màxims d'activitat proteolítica 5 h després de la ingesta voluntària. D'atra banda, Venou *et al.* (2003) va detectar en orades un pic d'APT 2 h després de la ingesta voluntària. Els valors màxims obtinguts en aquest treball són anteriors (pic 1 h postingesta forçada).

La diferència entre aquests dos darrers estudis podria deure's al tipus d'administració de l'aliment (en la ingesta forçada s'administra una ració fixa, molta, i directament a l'estómac).

D'altra banda, el repic d'APT a les 12 h postingesta de les orades PV33, suggereix una segona secreció d'enzims proteolítics per finalitzar els processos de digestió (Takii *et al.* 1995) que podria estar relacionat amb la presència d'aliment poc digerit a la zona intestinal proximal. En aquest sentit, amb la tècnica del pHstat i utilitzant ingredients vegetals i extractes intestinals d'orada, s'han descrit menors velocitats de digestió per a diferents farines vegetals emprades en la substitució versus la farina de peix (Alarcón *et al.*, 2002). No s'alterà de manera significativa, però, el temps de trànsit intestinal als moments estudiats, aquest paràmetre està relacionat, entre altres, amb l'origen de proteïna de la dieta i el temps de digestió (Buddington *et al.*, 1997).

L'increment de la capacitat de captació quan s'augmentà la quantitat de proteïna vegetal en la dieta podria estar relacionada amb un increment de la presència de transportadors a l'intestí, com ja suggereix en mamífers alimentats amb dietes de diferent composició Buddington *et al.*, (1991). Aquesta regulació permetria incrementar la capacitat de captació d'alguns nutrients per solventar un desequilibri nutricional degut a l'alteració de la digestió de les orades alimentades amb PV33. En altres espècies carnívores s'havia descrit ja una major absorció de nutrients a la zona més distal del tub digestiu utilitzant vesícules de membrana apical (Ferraris, 1982; Ferraris i Ahearn, 1983). Altres treballs descriuen un pic de captació de L-aminoàcids en la zona proximal o mitja de l'intestí utilitzant la tècnica de sacs invertits (Buddington *et al.*, 1997), i tot i que aquesta tècnica permet comparacions quan es normalitzen els resultats a unitats de concentració, la diferent nomenclatura dels segments intestinals i la diferent segmentació de l'intestí segons els estudis i grups fa difícil comparar els resultats, ja que en el present treball es considerà una primera zona proximal, i una segona zona distal que engloba el que molts autors defineixen zona intestinal mitja.

Les dietes PV20 i PV33 no van provocar alteracions significatives en la histologia de l'intestí proximal en comparar-les amb altres talls histològics d'orades salvatges (Elbal i Agulleiro, 1986), tot i que les dietes testades contenien farines vegetals (de soja, tramussos o pèsols) que són riques en factors antinutricionals, entre altres fitats (Francis *et al.*, 2001). Alguns autors descriuen una afectació de la integritat de l'intestí per ingesta d'ingredients vegetals. Per exemple, Richardson *et al.*, (1985) o Krogdahl *et al.*, (1994), descriuen enteritis a la zona més distal de l'intestí de salmons alimentats amb dietes que contenien soja. Però les orades alimentades amb la dieta PV33 usades en aquesta experiència van mostrar una disminució significativa del pes assolit

i l'índex de creixement específic. En aquest sentit, i per a orada, s'han descrit disminucions del pes assolit amb dietes on s'havia reemplaçat un 30% de la farina de peix per concentrat de proteïna de soja (Kissil *et al.* 2000) o farina de soja (Robaina *et al.* 1995).

En resum, el percentatge de substitució de la farina de peix per fonts proteïques vegetals en les dietes d'orada, tot i l'aparició de mecanismes de compensació com l'aparició d'un segon pic postingesta d'activitat proteasa per millorar la digestió de les proteïnes o l'increment de la capacitat de captació de nutrients, va afectar l'activitat digestiva dels animals PV33 en comparació a les orades PV20, provocant una disminució significativa en el pes final assolit després de 12 setmanes de creixement.

La truita irisada és considerada una espècie altament sensible a la presència d'inhibidors de proteasa a la dieta (Dabrowsky *et al.*, 1989; Kaushik *et al.*, 1995) i la soja, malgrat ser una proteïna d'alt valor biològic i digestibilitat (Forster, 2003), és alhora rica en aquest tipus de factors antinutricionals (Guillaume i Métallier, 2002). Diversos estudis realitzats en truita discrepen sobre les possibilitats reals de reemplaçar un percentatge important de farina de peix per farina de soja o els seus derivats. Així, Davies i Morris (1997) observaren una disminució del creixement a l'alimentar les truites amb dietes que contenen soja; en canvi, Kaushik *et al.* (1995), no detectaren diferències en substituir el 100% de farina de peix per concentrat de proteïna de soja. Tot i que les dietes PV35 i PV47 testades en aquesta experiència contenien un 4.8 i un 40.8% d'inclusió de concentrat de proteïna de soja, respectivament, no van presentar diferències en els pesos finals assolits. D'altra banda, Vielma *et al.*, (2000) registraren un increment del creixement en reemplaçar el 73% de farina de peix per productes derivats de la soja. La divergència entre els diferents treballs pot radicar, bé en el tipus de tractament usat per minimitzar la presència de factors antinutricionals de les dietes (Francis *et al.*, 2001), bé en l'origen i la qualitat dels derivats de soja emprats (Wee i Shu, 1989; Gomes *et al.*, 1995; Forster, 2003). L'APT de la zona proximal de les truites d'aquest treball no va mostrar diferències, indicant que tot i l'elevat percentatge d'inclusió de soja de la dieta PV47, els tractaments utilitzats en aquesta experiència foren adequats.

D'altra banda, tot i que Buddington i Hilton (1987) no van observar modificacions en el transport de D-glucosa en truites alimentades amb dietes amb diferents percentatges i

tipus de carbohidrats, les truites alimentades amb la dieta de major substitució van incrementar la capacitat de captació de D-glucosa a VMAs obtingudes d'intestí proximal i distal. En aquest sentit, altres treballs reporten una capacitat de regulació del transport intestinal en resposta al tipus de dieta administrada en espècies omnívores com la carpa (Buddington, 1987), i també en mamífers (Buddington, 1987; Buddington *et al.*, 1987; Ferraris i Diamond; 1989). L'afectació de la histologia intestinal observada en les truites PV47 podria indicar un canvi en el nombre de transportadors, com suggerí Houpe *et al.* (1997), però la no modificació del transport de nutrients, així com el manteniment de les taxes de creixement sembla desmentir aquesta idea amb les dietes i el període de creixement testats. Les alteracions histològiques, d'altra banda, indiquen que les fonts emprades en el present estudi contenien un excés en determinats factors antinutricionals, que coincideix amb resultats obtinguts per Storebakken *et al.*, (2000) en salmons alimentats amb dietes que contenien un 50% de reemplaçament amb gluten, o amb els treballs de Krogdahl *et al.*, (2003), també en salmons alimentats amb dietes que contenien fins a un 35% d'inclusió de soja. La reducció d'algunes de les fonts alternatives emprades, riques en fitats i compostos antigènics (Francis *et al.*, 2001), o una millora en els tractaments d'inhibició i/o la selecció de varietats més pobres en ANFs és un punt important a l'hora de formular noves dietes de substitució.

La suplementació de les dietes de truita amb àcid glutàmic lliure no tingué cap efecte sobre el creixement, com ja apuntaren Kirchner *et al.*, (2003) en suplementar dietes per a aquesta espècie amb alanina, aspartat o glutamat sense observar canvis significatius en el pes final assolit, l'índex de creixement específic o la ingesta. En la present experiència no es modificà tampoc l'activitat enzimàtica digestiva dels animals, i l'absorció de L-glutàmic a les VMAs obtingudes a les 6 h postingesta de les truites PV47 es modulà de manera igual a la resta d'aminoàcids estudiats, tot i que la seva major presència en forma lliure podria haver-se absorbit a nivell dels cecs pilòrics, que no foren estudiats en aquest bloc experimental, ja que en altres salmònids s'ha descrit una major absorció d'aminoàcids en aquest segment intestinal (Bakke-McKellep, 2000). Degut als presents resultats, la capacitat d'absorció d'aquest segment intestinal s'estudià en els següents blocs experimentals.

En la truita, doncs, l'increment de les fonts protèiques d'origen vegetal -principalment soja- no modificà l'activitat enzimàtica digestiva ni l'absorció de nutrients, però va reduir la longitud de les vellositat i el nombre de cèl·lules mucoses. Malgrat aquestes

modificacions, no es va afectar de manera significativa el creixement dels animals després de 12 setmanes de creixement.

Es pot concloure, doncs, que l'orada presenta capacitat per modular les activitats enzimàtiques digestives i la capacitat de transport de nutrients dels diferents segments intestinals, aconseguint un balanç en els processos de digestió i absorció de nutrients en resposta a la dieta administrada en per assolir una òptima disponibilitat de nutrients. En la truita, els processos de digestió i absorció no es modifiquen; s'observa una afectació de la integritat intestinal que no afecta però el creixement dels animals.



## 4.1.2. DIETES AMB ALTS PERCENTATGES DE SUBSTITUCIÓ. EL REEMPLAÇAMENT TOTAL DE LA FARINA DE PEIX PER FARINES VEGETALS

---

### DISSENY EXPERIMENTAL

#### Animals

Orades juvenils provinents d'una piscifactoria comercial (CUPIMAR, Cádiz, España) es van aclimatar a l'Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal (C.S.I.C., Castelló, Espanya) durant 20 dies en tancs de fibre de vidre (0.5 m<sup>3</sup>) en un sistema d'aigua marina interior.

Els juvenils de truita irisada es van obtenir de la piscifactoria experimental de l'I.N.R.A. (Donzacq, Landes, França), instal·lacions on també es portà a terme l'experiència de creixement.

#### Dietes

A l'Institute National de la Recherche Agrobiologique (I.N.R.A., St. Pée-sur-Nivelle, França) es van formular 4 dietes experimentals per a cada espècie (Taula 19). En la dieta FP la proteïna provenia de farina de peix, mentre que en les dietes PV50, PV75 i PV100 aquesta farina es va substituir per matèries primeres d'origen vegetal (farines de blat de moro, blat, pèsol, llavors de colza i tramussos blancs) en uns percentatges de 50, 75 i 100% respectivament. Igual que en l'experiència anterior, per a la substitució de la farina de peix es va emprar una barreja d'ingredients vegetals, minimitzant així les necessitats de suplementació i la presència d'una concentració elevada d'un determinat factor antinutricional. Malgrat això, en les dietes reemplaçades va ser necessària l'addició d'aminoàcids lliures (Taula 19) per tal d'aconseguir el perfil requerit per l'espècie (Jobling *et al.*, 2001). A més, s'usaren pèsols i blat prèviament extrusionats per reduir la presència de factors antinutricionals actius. Les dietes experimentals presentaven continguts similars de proteïna, grasses i energia, essent les mitjanes respectivament de 45.3%, 16.8% i 21.2 MJ·Kg<sup>-1</sup> per les dietes d'orada, i 49.9%, 19.5% i 23.4 MJ·Kg<sup>-1</sup> per a les de truita (Taula 19).

Taula 19. Composició aproximada, ingredients utilitzats i aportació de cada ingredient al contingut total de proteïna de les dietes experimentals d'orada i de tuita.

**ORADA**

Composició	FP <sub>0</sub>	PV50 <sub>0</sub>	PV75 <sub>0</sub>	PV100 <sub>0</sub>
Matèria seca (%)	93.7	94.3	91.9	90.1
Proteïna (% MS)	46.1	47.5	44.8	42.8
Lípid (% MS)	16.5	16.6	17.2	16.8
Energia (MJ · Kg <sup>-1</sup> )	20.4	21.3	21.4	21.7

Les anàlitiqes foren realitzades a l'Institute de la Recherche Agrobiologique (I.N.R.A; St-Pée-sur-Nivelle, França).

	Ingredients (g/kg)	FP <sub>0</sub>	PV50 <sub>0</sub>	PV75 <sub>0</sub>	PV100 <sub>0</sub>
Farines i extrusionats	Farina de Peix	703.7	352	176	0
	Gluten de blat de moro	0	120	180	250
	Gluten de blat	0	120	180	250
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	0	60	90	120
	Farina de colza (Primor 00)	0	30.9	67.2	27.3
	Trasmussos blancs dolços	0	0	0	6.9
	Extrusionat de blat <sup>1</sup>	142	94.9	30.6	15.5
Grasses	Oli de Peix	124.3	141.3	149.8	158
	Lligand (Alginat Na)	10	10	10	10
Vitamines i Lligands	Mix de Minerals <sup>2</sup>	10	10	10	10
	Mix de Vitamines <sup>2</sup>	10	10	10	10
	CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0	6.5	30.7	51.1
Suplementació	L-Arginina	0	7.6	11.3	15.9
	L-Histidina	0	2.3	3.4	4.8
	L-Lisina	0	15.9	23.6	32.5
	DL-Meteonina	0	2.5	3.6	5.4
	L-Triptòfan	0	1.4	2.2	2.9
	L-Treonina	0	50	7.4	10.4
	L-Isoleucina	0	4.2	6.2	8.4
L-Valina	0	5.4	8	11.1	

<sup>1</sup> En les 4 dietes experimentals s'utilitzà extrusionat de blat. L'aport proteic d'aquest ingredient a la dieta FP és del 3.6%; <sup>2</sup> D'acord amb el National Research Council (1993).

	Ingredients (g proteïna aportada · Kg <sup>-1</sup> pinso)	FP <sub>0</sub>	PV50 <sub>0</sub>	PV75 <sub>0</sub>	PV100 <sub>0</sub>
Farines i extrusionats	Farina de Peix	422.2	211.2	105.6	0
	Gluten de blat de moro	0	72.7	109.1	151.5
	Gluten de blat	0	86.6	127.8	180.0
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	0	13.1	19.7	26.3
	Farina de colza (Primor 00)	0	10.4	22.6	9.2
	Trasmussos blancs dolços	0	0	0	2.55
	Extrusionat de blat	15.9	10.6	3.4	1.7
Aminoàcids lliures (g · Kg <sup>-1</sup> pinso)		0	44.3	65.7	91.4

Aproximacions realitzades segons les dades aportades per I.N.R.A. (2002).



## TRUITA

Composició	FP <sub>t</sub>	PV50 <sub>t</sub>	PV75 <sub>t</sub>	PV100 <sub>t</sub>
Matèria seca (%)	94.4	92.2	91.5	91.6
Proteïna (% MS)	51.5	50.3	49.1	48.6
Lípid (% MS)	19.7	19.6	19.6	19.2
Energia (MJ · Kg <sup>-1</sup> )	22.7	23.5	23.9	23.6

Les anàlitiqes foren realitzades a l'Institut de la Recherche Agrobiologique (I.N.R.A; St-Pée-sur-Nivelle, França).

	Ingredients (g/kg)	FP <sub>t</sub>	PV50 <sub>t</sub>	PV75 <sub>t</sub>	PV100 <sub>t</sub>
Farines i extrussionats	Farina de Peix	637.9	319	159.5	0
	Gluten de blat de moro	0	116	177.1	232.4
	Gluten de blat	0	100	150	200
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	0	80	120	163.3
	Farina de colza (Primor 00)	0	46.9	75	100
	Trasmussos blancs dolços				
	Extrusionat de blat <sup>1</sup>	203.4	110.2	42.5	0
Grasses	Oli de Peix	128.6	143.6	151.1	158.7
Vitamines i Lligands	Lligand (Alginat Na)	10	10	10	10
	Mix de Minerals <sup>2</sup>	10	10	10	10
	Mix de Vitamines <sup>2</sup>	10	10	10	10
	CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0	16.1	37.8	40
Suplementació d'aminoàcids	L-Arginina	0	6.2	9.5	12.5
	L-Histidina	0	1.9	2.9	3.9
	L-Lisina	0	13.8	20.8	27.6
	DL-Meteonina	0	2	3.06	4.1
	L-Triptòfan	0	1.3	2.1	2.7
	L-Treonina	0	4.1	6.2	8.3
	L-Isoleucina	0	3.5	5.3	7.1
	L-Valina	0	4.7	7.0	9.4

<sup>1</sup> En les 4 dietes experimentals s'utilitzà extrusionat de blat. L'aport proteic d'aquest ingredient a la dieta FP és del 5.6%; <sup>2</sup> D'acord amb el National Research Council (1993).

	Ingredients (g proteïna aportada · Kg <sup>-1</sup> pinso)	FP <sub>t</sub>	PV50 <sub>t</sub>	PV75 <sub>t</sub>	PV100 <sub>t</sub>
Farines i extrussionats	Farina de Peix	382.7	191.4	95.7	0
	Gluten de blat de moro	0	70.3	107.3	233.0
	Gluten de blat	0	72.0	108.0	144.0
	Extrusionat de pèsol (Aquatex)	0	17.5	26.3	35.8
	Farina de colza (Primor 00)	0	15.8	25.3	33.7
	Trasmussos blancs dolços	0	0	0	0
	Extrusionat de blat	22.8	12.3	4.76	0
Aminoàcids lliures (g · Kg <sup>-1</sup> pinso)		0	37.5	57.4	75.6

Aproximacions realitzades segons les dades aportades per I.N.R.A. (2002).

### Període de Creixement

A l'Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal, 1080 orades ja aclimatades ( $16.5 \pm 0.07$  g) es van distribuir aleatòriament en 12 tancs experimentals de fibra de vidre circulars ( $0.5 \text{ m}^3$ ). Durant 12 setmanes (del 29 d'abril al 19 de juliol de 2002) es va realitzar una experiència de creixement: sota fotoperíode i temperatura naturals, cada dieta es va subministrar manualment a 3 grups de peixos dues vegades al dia fins a la sacietat.

A la piscifactoria experimental de Donzacq, setze grups de 75 peixos cadascun (pes inicial  $19.0 \pm 0.2$  g) es van distribuir de manera aleatòria en tancs de fibra circulars d' $1 \text{ m}^3$  i es van alimentar manualment amb una de les dietes experimentals 2 vegades al dia fins a la sacietat. El període de creixement va tenir lloc entre el 21 de març i el 7 de Juny de 2002 sota fotoperíode natural i aigua provinent d'un sortidor natural que es mantenia a una temperatura constant de  $17 \pm 1$  °C.

La taula 20 mostra els pesos assolits i l'SGR de les orades i les truites al final del període de creixement.

Taula 20. Pesos finals assolits i índex de creixement específic (SGR) per les orades i les truites.

	Orada		Truita	
	Pes final (g)	SGR (%· dia <sup>-1</sup> )	Pes final (g)	SGR (%· dia <sup>-1</sup> )
FP	$73.8 \pm 0.9^a$	$1.85 \pm 0.01^a$	$147.1 \pm 1.8^a$	$2.61 \pm 0.03^a$
PV50	$69.7 \pm 0.5^b$	$1.76 \pm 0.01^b$	$142.4 \pm 2.6^a$	$2.57 \pm 0.01^a$
PV75	$66.5 \pm 0.5^c$	$1.72 \pm 0.01^b$	$135.6 \pm 4.9^b$	$2.51 \pm 0.05^b$
PV100	$58.1 \pm 0.7^d$	$1.56 \pm 0.02^c$	$111.1 \pm 2.5^c$	$2.25 \pm 0.02^c$

Els valors es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de la biomassa dels 3 tancs de creixement per a cadascuna de les dietes experimentals després de 12 setmanes de creixement. Les diferències ( $p < 0.05$ ) entre les dietes per a cada paràmetre s'assenyalen amb diferents lletres. (FP) la proteïna prové de farina de peix; (PV50) 50% de substitució de farina de peix per ingredients vegetals; (PV75) 75% de substitució de la farina de peix; (PV100) 100% de substitució per ingredients vegetals. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \text{ dia}^{-1}) = 100 * (\ln W_t - \ln W_o) / t$ .  $W_t$  i  $W_o$  representen el pes final i el pes inicial; t és el període de creixement en dies. Dades Projecte PEPPA Q5RS-2000-30068.

### Presa de mostres

L'experiència de creixement es va allargar fins el dia 28 de juliol per a les orades, i fins el dia 14 de juny per a les truites. En aquest moment es realitzà una experiència postprandial. A animals dejunats 24 hores se'ls va practicar<sup>11</sup> una ingesta forçada, corresponent a l'1% del seu pes corporal amb el pinso experimental corresponent,

<sup>11</sup> Sota anestèsia lleugera (MS-222 0.1 g· L<sup>-1</sup>)

prèviament molt i barrejat amb aigua provinent dels tancs per tal de facilitar-ne l'administració (Taula 21).

A diferents temps postingesta: 1, 3, 6 h i un temps llarg (48 h en orada i 36 h en truita), els animals van anestesiar-se novament, van mesurar-se, i van sacrificar-se per seccionament de l'espina dorsal. De cadascun d'ells s'obtingué l'aparell digestiu, i es mesurà la longitud intestinal entre els cecs pilòrics i l'anús. Seguidament es va seccionar i congelar el primer segment proximal per als anàlisis d'enzims digestius. A les 6 hores, els cecs, la resta d'intestí proximal i l'intestí distal es van rentar<sup>12</sup> i van congelar-se ràpidament per als estudis d'absorció de nutrients (Taula 21); a temps llargs, s'obtingueren també mostres d'intestí proximal i distal. En orada, a més, s'estudià la dispersió del contingut intestinal als diferents moments estudiats, i a les 48 hores un segon segment proximal es va conservar en formol tamponat per als estudis histològics.

Taula 21. Dilucions de la ració administrada, temps de mostreig postingesta i mostres obtingudes en l'experiència d'alts percentatges de substitució per a les dues espècies estudiades (orada i truita).

Espècie	Dilució de la ració*		Temps mostreig (hores post-ingesta)		
	FP	PV	Anàlisis enzimàtics (int. proximal)	Histologia (int. proximal)	Transport de nutrients (cecs pilòrics <sup>13</sup> , int. proximal, int. distal)
Orada	1:2.5	1:3	1, 3, 6, 48	48	48
Truita			1, 3, 6, 36	-	6 36

\* Es va optar per fer dilucions diferents de les racions per tal de mantenir en els 4 casos la mateixa densitat de la mescla a administrar. Int = intestí. FP= dieta FP; PV= dietes PV50, PV75 i pV100.

## Analítiques

Tipus d'anàlisi	Espècie	Temps	Mètode utilitzat	Referència	Fragment estudiat
Histologia	Orada	48 h	Tinció H-E	3.4.1	Proximal
Activitat proteolítica total	Orada, truita	1, 3, 6, 48/36h	Mètode de Walter	3.4.2.1	Proximal
Activitats proteasa específiques	Orada, truita	1, 3, 6, 48/36h	Zimografia	3.4.2.2	Proximal
Activitat $\alpha$ -amilasa	Orada, truita	1, 3, 6, 48/36h	Mètode de Dold	3.4.2.3	Proximal
Fluxes de nutrients	Orada,	6,	VMAs	3.4.3.3	Cecs, proximal, distal
	truita	48/36h	VMAs	3.4.3.3	Proximal i distal

<sup>12</sup> Amb salí isosmòtic que contenia PMSF.

<sup>13</sup> Els cecs pilòrics es mostrejaren únicament a les 6 h postingesta.

## RESULTATS

Les orades alimentades amb les dietes PV50, PV75 i PV100 utilitzades en l'experiència postprandial, assoliren pesos finals significativament inferiors que el grup FP (-10.47, -14.27 i -27.98%, respectivament) (Taula 22); l'índex de creixement específic en aquesta espècie va disminuir també de manera significativa en els dos grups alimentats amb les dietes de major substitució (-9.4 i -19.8 % per a PV75 i PV100, respectivament). Aquestes dades estan en el rang de valors de biomassa reportats en l'experiència de creixement per les orades (Taula 20). D'altra banda, els pesos finals i els SGRs de les truites alimentades amb les dietes de substitució de l'experiment postingesta (Taula 22), mostaren una tendència a disminuir, essent aquesta disminució significativa només pel pes final assolit pel grup PV100 (21.9% inferior que en les truites FP). En canvi, les mesures de biomassa reportades després de 12 setmanes de creixement, van mostrar diferències en ambdós paràmetres estudiats per als animals PV75 i PV100 (Taula 20).

Taula 22. Pesos finals assolits i índex de creixement específic (SGR) per les orades i les truites mostrejades en l'experiència postingesta.

	Orada		Truita	
	Pes final (g)	SGR (%·dia <sup>-1</sup> )	Pes final (g)	SGR (%·dia <sup>-1</sup> )
FP	89.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.04 <sup>a</sup>	154.1 ± 4.5 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.07
PV50	80.3 ± 1.6 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.04 <sup>ab</sup>	138.3 ± 4.7 <sup>ab</sup>	2.16 ± 0.08
PV75	76.9 ± 1.7 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.04 <sup>b</sup>	136.3 ± 4.3 <sup>ab</sup>	2.14 ± 0.07
PV100	64.6 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.47 ± 0.04 <sup>c</sup>	120.3 ± 13.8 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.01

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels 40 animals mostrejats per a cadascuna de les dietes experimentals en l'experiència postingesta. Les diferències ( $p < 0.05$ ) entre les dietes per a cada paràmetre s'assenyalen amb diferents lletres. (FP) la proteïna prové de farina de peix; (PV50) 50% de substitució de farina de peix per ingredients vegetals; (PV75) 75% de substitució de la farina de peix; (PV100) 100% de substitució per ingredients vegetals. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 * (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial;  $t$  és el període de creixement en dies.

En les dues espècies, es va mesurar la longitud intestinal relativa (Taula 23). Aquest paràmetre incrementà gradualment a mesura que augmentà el percentatge de reemplaçament de la farina de peix, essent l'increment significatiu per a les orades alimentades amb les 3 dietes de substitució, i per a les truites alimentades amb les dietes PV75 i PV100.

Taula 23. Longitud intestinal relativa (LIR) per les orades i les truites.

	Orada	Truita
LIR (mm · g <sup>-1</sup> animal)		
FP	2.38 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>b</sup>
PV50	2.66 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>b</sup>
PV75	2.86 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.50 ± 0.01 <sup>ab</sup>
PV100	3.16 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M dels 40 animals mostrejats per a cadascuna de les dietes experimentals. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les dietes s'assenyalen amb diferents lletres. (FP) la proteïna prové de farina de peix; (PV50) 50% de substitució de farina de peix per ingredients vegetals; (PV75) 75% de substitució de la farina de peix; (PV100) 100% de substitució per ingredients vegetals. La longitud intestinal es va mesurar exclouent els cecs pilòrics i es va expressar en relació al pes de cada animal.

En orada es va estimar també la posició del bolus alimentari en els diferents temps de mostreig. A la figura 32 s'observa que la velocitat de trànsit intestinal mostra, a les 3 hores postingesta, una tendència a disminuir en els animals alimentats amb les dietes de substitució.

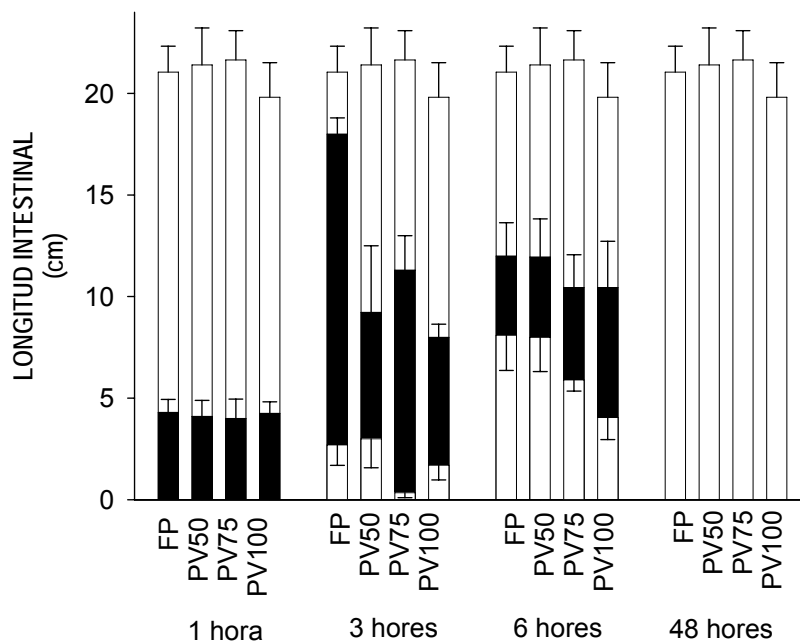


Figura 32. Dispersió del contingut intestinal a diferents temps postingesta en orades alimentades amb les 4 dietes experimentals. Les barres negres representen la presència d'aliment al tub digestiu (barres blanques). Els valors es mostren com la mitjana ± S.E.M. dels 10 animals mostrejats a cada temps.

L'activitat proteasa alcalina postprandial es presenta per a les dues espècies a la figura 33. Les orades alimentades tant amb la dieta FP com amb les PV van mostrar perfils similars d'APT postingesta, presentant un màxim a les 6 h, amb l'excepció de la dieta PV75, on aquest es detectà a les 3 hores. El pic registrat en les orades FP fou de  $6.93 \pm 1.03$  U proteasa·mg<sup>-1</sup> prot·min<sup>-1</sup>. La magnitud d'aquest va créixer gradualment a mesura que s'incrementà el percentatge d'ingredients vegetals en la dieta, fins a un mínim de  $4.33$  U proteasa·mg<sup>-1</sup> prot·min<sup>-1</sup> en les orades PV100. Les truites FP van

presentar un pic d'activitat proteasa alcalina a les 3 hores postingesta ( $7.17 \pm 1.63$  U proteasa·mg<sup>-1</sup> prot·min<sup>-1</sup>), mostrant una relació d'APT 3/36 hores de 2.07; les truites PV50 i PV75 presentaren un lleuger increment postingesta d'aquesta activitat, amb ratios d'APT 3/36 de 1.43 i 1.40, respectivament. En els temps estudiats, no es va detectar en les truites PV100 un pic postalimentació de proteases alcalines (relació 3/36 = 0.73).

D'altra banda, si considerem els temps llargs postingesta com la mesura dels nivells d'APT basals, s'observa que aquests foren significativament inferiors en orada que en truita ( $1.03 \pm 0.27$  versus  $3.66 \pm 0.66$  U proteasa·mg<sup>-1</sup> prot·min<sup>-1</sup> en les orades i les truites FP, respectivament).

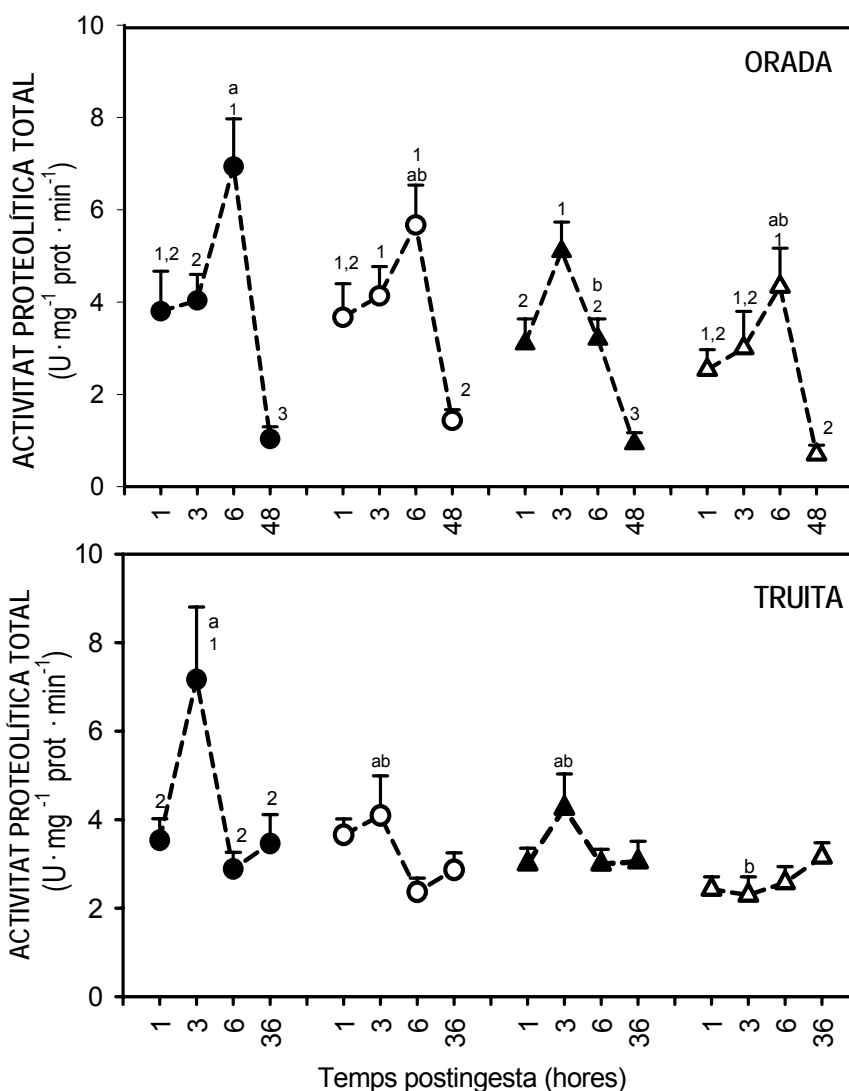


Figura 33. Seguiment postprandial de l'activitat proteolítica total a l'intestí proximal d'orada i de truita. Els valors es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M. de 10 animals. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les diferents dietes es representen amb lletres; les diferències significatives entre els diferents temps postingesta es representen amb diferents números. Dieta FP (●), dieta PV50 (○), dieta PV75 (▲), dieta PV100 (△).

L'ús de zimogrames (Fig. 34) va permetre identificar 5 bandes amb activitat proteasa alcalina en les orades alimentades amb la dieta FP, amb pesos moleculars d'entre 25 i 90 Kda. En les truites irisades FP, l'APT fou deguda a 8 bandes específiques, amb pesos moleculars d'entre 17 i 100 Kda.

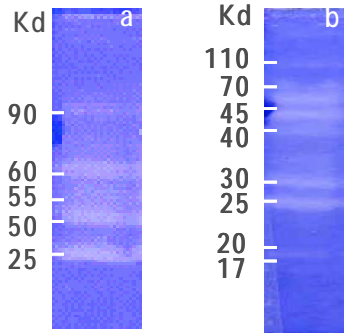


Figura 34. Zimogrames d'homogeneïtzat d'intestí proximal d'orada FP (a) i truita FP (b) amb els pesos moleculars corresponents a les bandes d'activitat proteasa.

La utilització als gels d'inhibidors específics de les diferents activitats proteasa alcalina (Fig. 35) clarificà que, en ambdues espècies, 3 de les bandes amb activitat detectades als zimogrames presentaven activitat tripsina: 90, 60 i 55 Kda en orada i 70, 45 i 40 Kda en truita. Es detectaren també dues bandes amb activitat quimotripsina (50 i 25 Kda) en orada, i 3 bandes amb aquesta activitat (30, 20 i 17 Kda) en truita. La banda de 25 Kda detectada en truita presentà activitat serin-proteasa no específica, mentre que la banda de 110 Kda no s'afectà per cap dels inhibidors testats, suggerint que no presentava activitat serin-proteasa. Per altra banda, totes les activitats s'afectaren quan l'homogeneïtzat es combinà amb EDTA, indicant la dependència d'aquestes proteases de la presència de cations divalents.

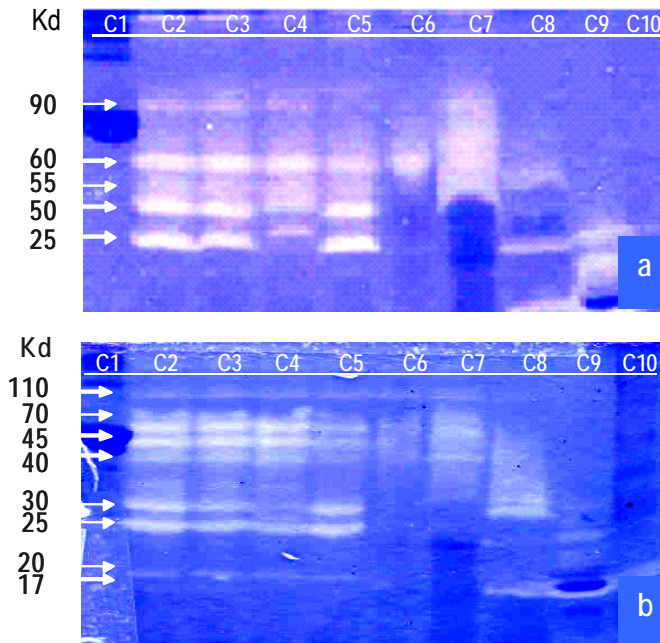


Figura 35. Zimogramas d'homogeneïtzats d'orada FP (a) i truita FP (b) combinats amb diferents solucions d'inhibició. Columna (C) 1 = BSA; C2 = Homogeneïtzat (H); C3 = H + TPCK (inhibidor de l'activitat quimotripsina-like); C4 = H + ZPCK (inhibidor de quimotripsina-like); C5 = H + TLCK (inhibidor de tripsina-like); C6 = H + PMSF (inhibidor de serin proteases); C7 = H + SBTI (inhibidor de serin proteases); C8 = H + EDTA (quelant de cations divalents); C9 = tripsina bovina; C10 = marcador de pes molecular. L'ús de les solucions d'inhibició específiques en els gels d'acrilamida permet determinar el tipus d'activitat de les bandes que apareixen al zimograma per un decrement de la intensitat de la banda en la columna de l'homogeneïtzat tractat amb un inhibidor específic quan es compara amb la columna de l'homogeneïtzat no tractat.

La figura 36 mostra zimogrames representatius d'homogeneïtzats intestinals d'orada i truita corresponents als pics d'APT (6 i 3 hores postingesta respectivament). Els resultats obtinguts mitjançant aquesta tècnica reforcen les mesures espectrofotomètriques abans descrites, observant-se una gradual atenuació de les bandes amb activitat proteasa que apareixen en les orades i una depressió de les bandes actives en les truites PV. En analitzar els zimogrames en profunditat, s'observà que la substitució de la farina de peix per fonts proteiques vegetals va disminuir les activitats quimotripsina (bandes de 50 i 25 Kda) en les orades PV50 i PV75, les quals van incrementar lleugerament les activitats tripsina (55 i 60 Kda). En les orades PV100 es detectà, a més, una disminució en la intensitat de la banda de major pes molecular (90 Kda). En la truita, el reemplaçament de la farina de peix pels ingredients vegetals testats va atenuar totes les bandes amb activitat tripsina i quimotripsina en els peixos alimentats amb les 3 dietes de substitució.

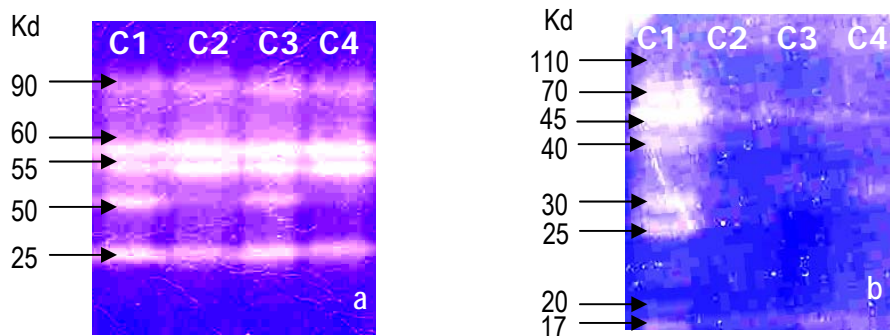


Figura 36. Zimogrames representatius corresponents als pics d'activitat proteolítica en orada (a; 6 h postingesta) i truita (b; 3 h postingesta) per a les 4 dietes experimentals estudiades. Columna (C) 1 = FP; C2 = PV50; C3 = PV75; C4 = PV100.

L'activitat  $\alpha$ -amilasa postingesta es mostra a la figura 37. S'observa que aquesta activitat fou superior en les orades que en les truites. Els dos grups de peixos FP presentaren un pic d'alliberació d'aquest enzim 3 h després de l'alimentació ( $1.01 \pm 0.12$  i  $0.30 \pm 0.03$  mU  $\alpha$ -amilasa  $\cdot$ mg<sup>-1</sup> prot $\cdot$ min<sup>-1</sup> per orada i truita, respectivament). En les orades PV, aquest pic no va aparèixer, i els nivells d' $\alpha$ -amilasa mesurats en aquest moment foren significativament més baixos. En canvi, les truites PV presentaren una activitat  $\alpha$ -amilasa similar a la de les truites FP, mostrant pics postingesta en els grups de peixos PV75 i PV100. L'activitat  $\alpha$ -amilasa fou inferior a l'APT en les dues espècies (Fig. 38).



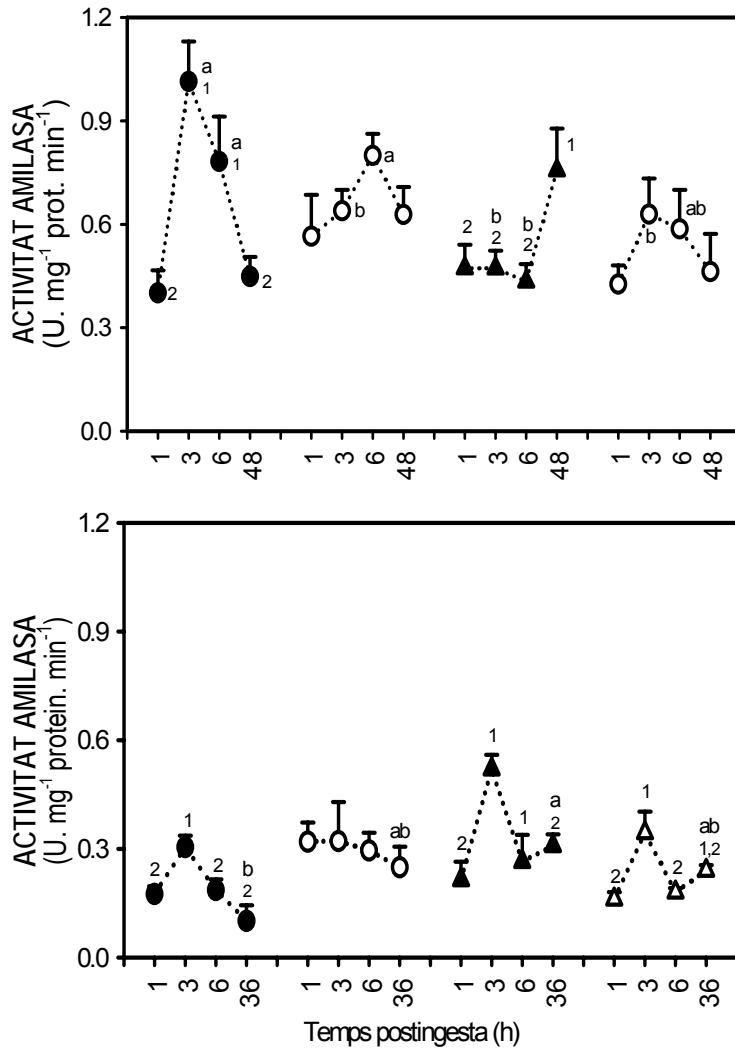


Figura 37. Activitat  $\alpha$ -amilasa a diferents temps postingesta per a les orades (gràfica superior) i les truites (gràfica inferior) alimentades amb les 4 dietes experimentals. Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 8 determinacions. (●) dieta FP, (○) dieta PV50, (▲) dieta PV75, (△) dieta PV100. Les diferències significatives entre les dietes (<0.05) es representen amb lletres; les diferències significatives entre els diferents temps postprandials han estat representades amb números.

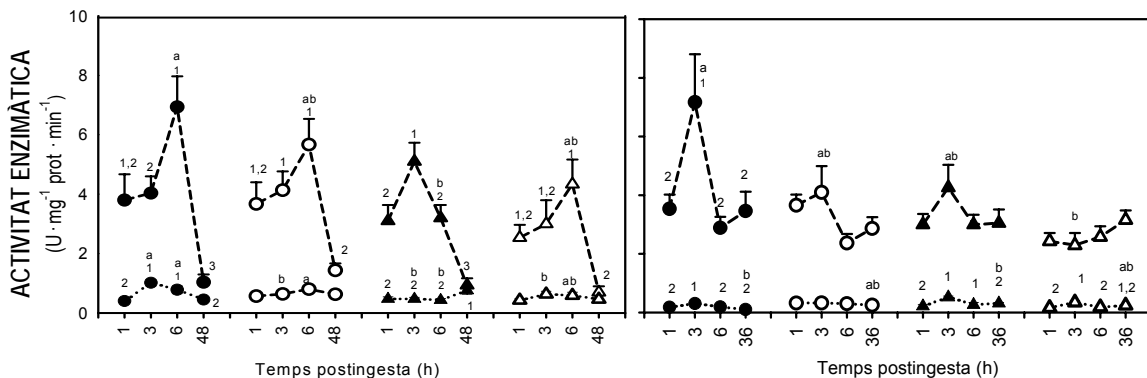


Figura 38. Activitat proteolítica total (línia discontinua) i activitat  $\alpha$ -amilasa (línia puntejada) a diferents temps postingesta per a les orades (a l'esquerra) i les truites (a la dreta) alimentades amb les 4 dietes experimentals. Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 10 determinacions per a l'APT i 8 determinacions per a l'activitat  $\alpha$ -amilasa. (●) dieta FP, (○) dieta PV50, (▲) dieta PV75, (△) dieta PV100. Les diferències significatives entre les dietes (<0.05) es representen amb lletres. Les diferències significatives entre diferents temps postprandials han estat representades amb números.

Per a les dues espècies, es van obtenir VMAs d'enteròcit a partir dels diferents segments intestinals (cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal) obtinguts a les 6 i a les 48/36<sup>14</sup> h (orada/truita) postingesta per a tots els grups experimentals. Per a cada condició es determinaren els influxes de nutrients (L-aminoàcids i D-glucosa) i el volum vesicular de les suspensions obtingudes en funció de la proteïna.

El volum vesicular en funció de la proteïna (Taula 24) mostrà diferències segons el segment estudiat, i també es modificà en variar la composició de la dieta administrada. Per aquest motiu, les captacions de nutrients es representaren com a influxes referenciats a la quantitat de proteïna de les suspensions i també com a concentracions intravesiculars als 5 s d'incubació.

Taula 24. L-alanina retinguda a l'equilibri i volum vesicular de les vesícules obtingudes a partir dels cecs pilòrics (C) intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada (a) i truita (b).

a		L-alanina intravesicular a l'equilibri (pmols · µg prot <sup>-1</sup> )	volum (µL · µg prot <sup>-1</sup> )
FP	C	348.76 ± 10.9 <sup>a,2</sup>	1.16 ± 0.06 <sup>a,2</sup>
	P	557.66 ± 20.35 <sup>a,1</sup>	1.86 ± 0.68 <sup>a,1</sup>
	D	493.82 ± 20.79 <sup>c,1</sup>	1.64 ± 0.12 <sup>c,1</sup>
PV50	C	193.95 ± 14.03 <sup>b,3</sup>	0.65 ± 0.08 <sup>b,3</sup>
	P	279.42 ± 11.26 <sup>b,2</sup>	0.93 ± 0.06 <sup>b,2</sup>
	D	1001.0 ± 4.96 <sup>b,1</sup>	3.33 ± 0.02 <sup>b,1</sup>
PV75	C	208.47 ± 4.64 <sup>b,3</sup>	0.69 ± 0.03 <sup>b,3</sup>
	P	325.72 ± 3.41 <sup>b,2</sup>	1.08 ± 0.02 <sup>b,2</sup>
	D	1268.8 ± 23.63 <sup>a,1</sup>	4.23 ± 0.13 <sup>a,1</sup>
PV100	C	124.65 ± 4.78 <sup>c,3</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>c,3</sup>
	P	272.14 ± 9.57 <sup>b,2</sup>	0.91 ± 0.05 <sup>b,2</sup>
	D	445.79 ± 10.4 <sup>c,1</sup>	1.48 ± 0.06 <sup>c,1</sup>

b		L-alanina intravesicular a l'equilibri (pmols · µg prot <sup>-1</sup> )	volum (µL · µg prot <sup>-1</sup> )
FP	C	345.26 ± 15.25 <sup>2</sup>	1.15 ± 0.05 <sup>2</sup>
	P	7739.6 ± 657.5 <sup>a,2</sup>	25.79 ± 2.19 <sup>a,1</sup>
	D	1798.8 ± 87.5 <sup>a,1</sup>	5.99 ± 0.29 <sup>a,2</sup>
PV50	C	316.7 ± 25.4 <sup>2</sup>	1.05 ± 0.08 <sup>2</sup>
	P	1185.11 ± 333.0 <sup>b,1</sup>	3.95 ± 1.10 <sup>b,1</sup>
	D	608.78 ± 4.55 <sup>c,1,2</sup>	2.03 ± 0.01 <sup>c,1,2</sup>
PV75	C	360.5 ± 99.4 <sup>3</sup>	1.20 ± 0.03 <sup>3</sup>
	P	617.58 ± 31.27 <sup>b,2</sup>	2.06 ± 0.10 <sup>b,2</sup>
	D	931.08 ± 6.46 <sup>b,1</sup>	3.10 ± 0.02 <sup>b,1</sup>
PV100	C	436.6 ± 17.22 <sup>3</sup>	1.45 ± 0.06 <sup>3</sup>
	P	2024.96 ± 11.18 <sup>b,1</sup>	6.75 ± 0.04 <sup>b,1</sup>
	D	1038.31 ± 19.6 <sup>b,2</sup>	3.46 ± 0.06 <sup>b,2</sup>

Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M. d'un mínim de 6 determinacions per a cada condició. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en entre les dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives entre els diferents segments intestinals es representen amb diferents números.

<sup>14</sup> No s'estudià l'absorció als cecs pilòrics als temps llargs postingesta.

Les figures 39, 40 i 43 per orada i 41, 42 i 44 per truita mostren els influxes d'aminoàcids i glucosa referenciats a la proteïna (Gràfiques sobre fons blanc), i la seva normalització a unitats de volum (Gràfiques sobre fons gris) a les VMAs obtingudes a les 6 h postingesta.

En les orades FP, el major influx d'aminoàcids essencials (Fig. 39) es localitzà a les VMAs d'intestí proximal. Les VMAs distals presentaren una captació intermitja entre les vesícules proximals (relació P/D d'aproximadament 1.4) i les de cecs pilòrics (relació P/C propera a 5). En les orades alimentades amb les dietes reemplaçades, aquest patró de regionalització es modificà, disminuint els influxes d'aminoàcids essencials a les vesícules obtingudes de cecs i intestí proximal, i augmentant o mantinguent-se estable a les VMAs distals, denotant un retard en la captació cap a zones més allunyades de l'intestí. En normalitzar els resultats a unitats de concentració intravesicular de nutrients (Fig. 39. Gràfiques sobre fons gris), es va mantenir per a la L-lisina el patró descrit, mentre que per a la L-leucina i la L-fenilalanina es van observar 3 regionalitzacions depenent dels percentatges de substitució emprats; així, en les orades PV50, la màxima concentració es registrà a les VMAs distals, seguida pels cecs pilòrics i mostrant una menor captació a vesícules proximals; els animals PV75 van mostrar un patró semblant al de les orades FP; i en els peixos PV100 es mantingué el patró observat en l'anterior sistema d'expressió.

Els influxes de L-alanina i L-prolina en aquesta espècie (Fig. 40) van mostrar un patró similar que el descrit per als essencials. El L-glutàmic no mostrà una regionalització definida, decreixent la captació essent la capacitat d'absorció a mesura que s'avançava en el tub intestinal en les orades FP i creixent en els peixos PV75 i PV100. La normalització dels resultats a unitats de concentració no mostrà una relació directa amb el percentatge de substitució. Així, en el cas de la L-alanina i la L-prolina, el 50% de substitució de la farina de peix provocà una disminució en la captació a VMAs proximals, que en canvi es va veure incrementada en les orades PV75. En els animals PV100 la capacitat de captació de L-alanina no mostrà diferències significatives al llarg de l'intestí mentre que la de L-prolina incrementà a mesura que s'avançava en el tub. L'estudi de l'L-glutàmic mostrà un patró similar per als 4 grups experimentals, essent la captació decreixent des dels cecs pilòrics fins a l'intestí distal, amb l'excepció de les orades PV50, on la capacitat d'absorció proximal fou significativament superior.

ORADA

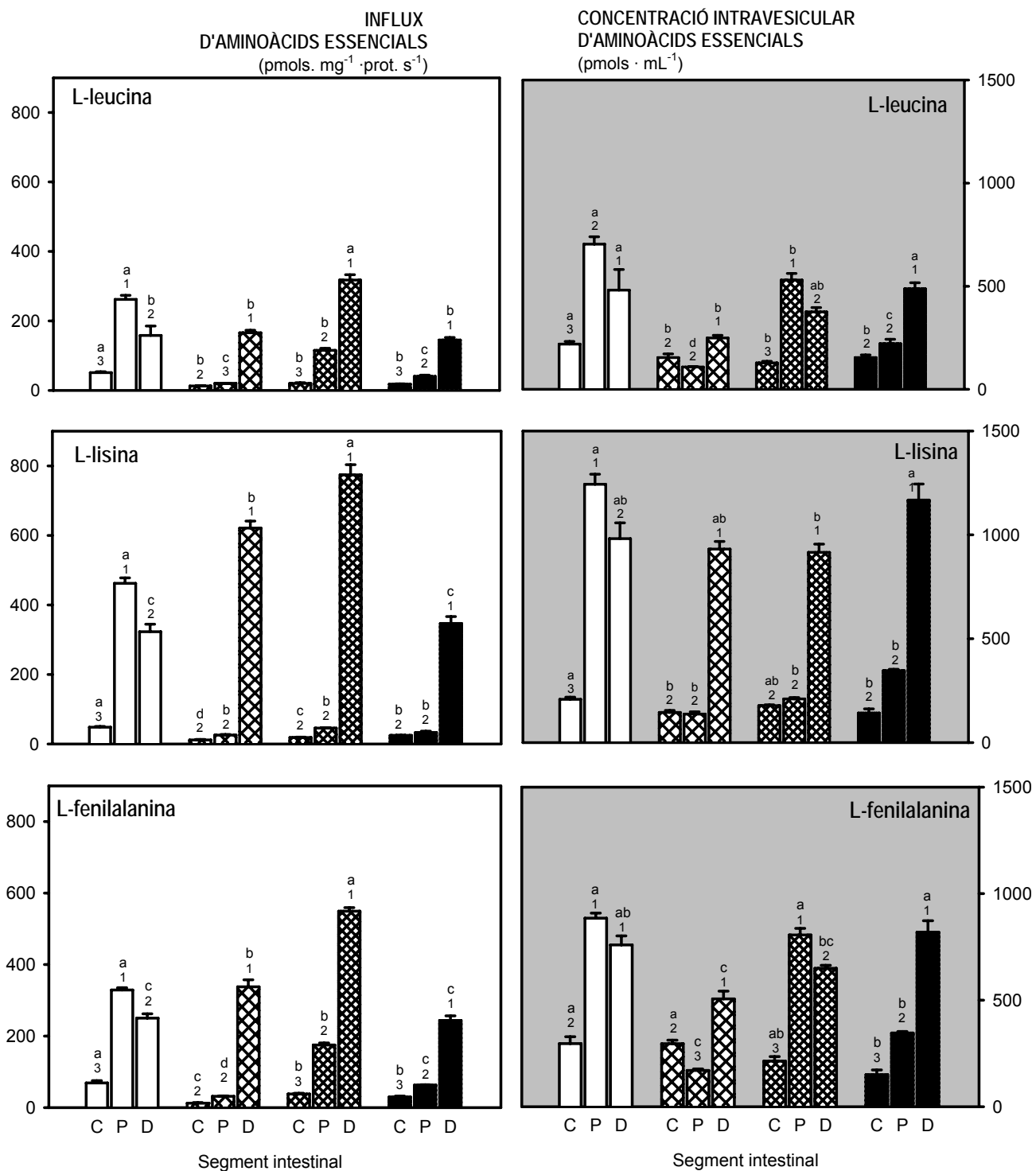


Figura 39. Influx i concentració d'aminoàcids essencials (temps = 5 s) a VMAs obtingudes a les 6 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orades alimentades amb les dietes experimentals: FP (barres blanques); PV50 (rombes grans); PV75 (rombes petits) i PV100 (barres negres). Les diferències significatives entre les dietes (<0.05) es representen amb lletres; les diferències significatives entre diferents segments es representen amb números.

ORADA

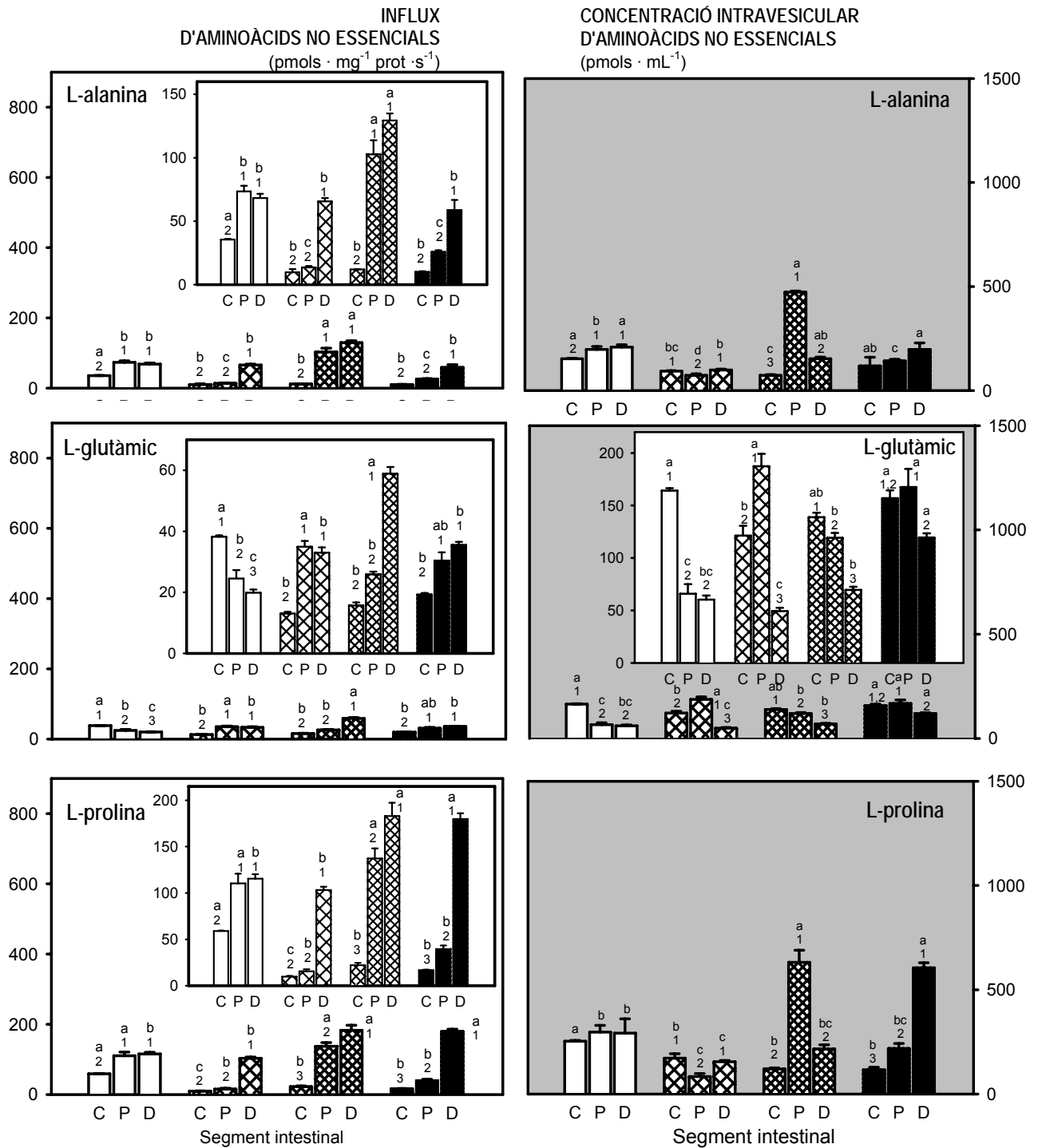


Figura 40. Influx i concentració d'aminoàcids no essencials (temps = 5 s) a VMAs obtingudes a les 6 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orades alimentades amb les dietes experimentals: FP (barres blanques); PV50 (rombs grans); PV75 (rombs petits) i PV100 (barres negres). Les diferències significatives entre les dietes (<math><0.05</math>) es representen amb lletres; les diferències significatives entre diferents segments es representen amb números.

TRUITA

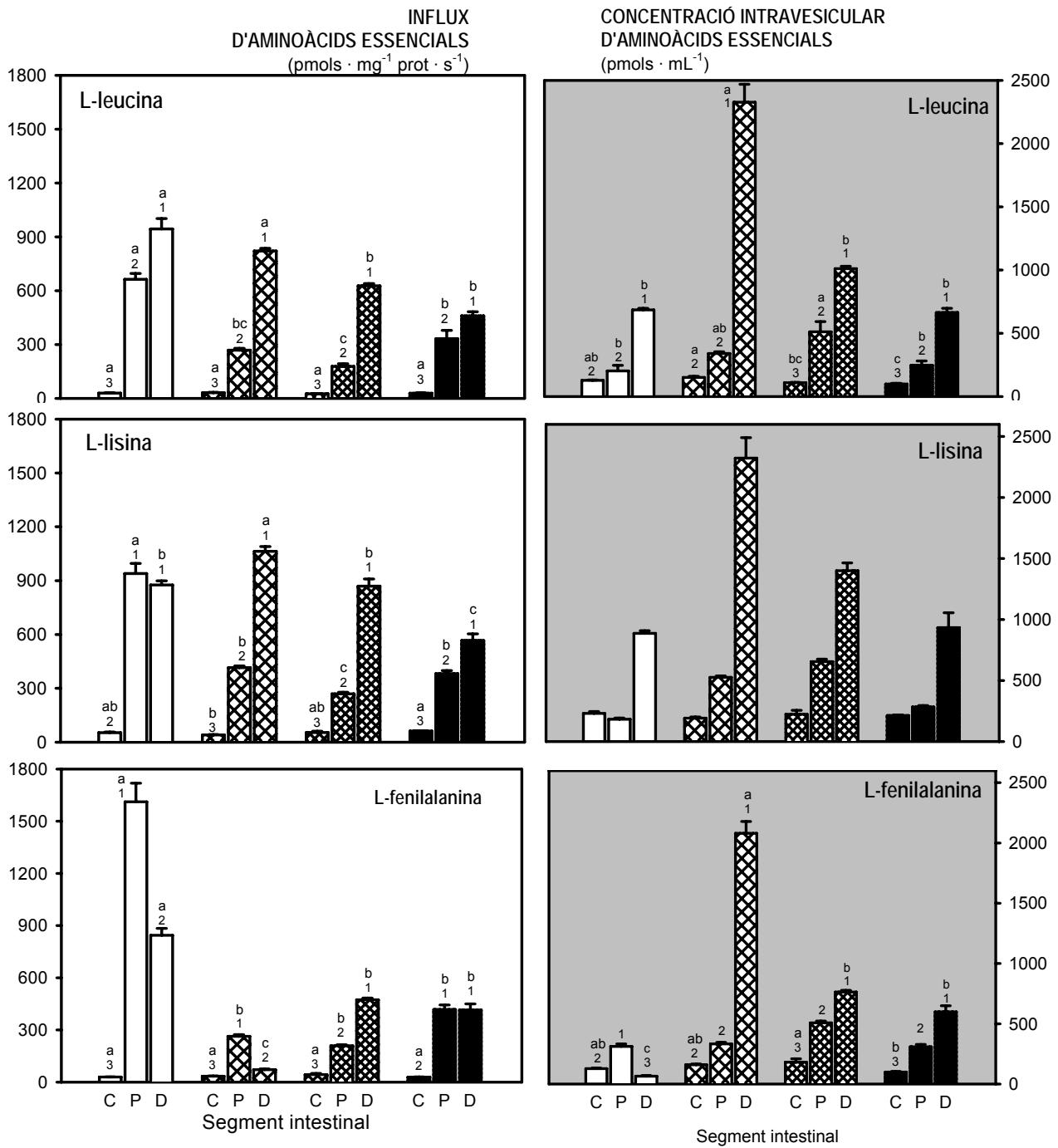


Figura 41. Influx i concentració d'aminoàcids essencials (temps = 5 s) a VMAs obtingudes a les 6 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) de truites alimentades amb les dietes experimentals: FP (barres blanques); PV50 (rombes grans); PV75 (rombes petits) i PV100 (barres negres). Les diferències significatives entre les dietes (<math><0.05</math>) es representen amb lletres; les diferències significatives entre diferents segments es representen amb números.

**TRUITA**

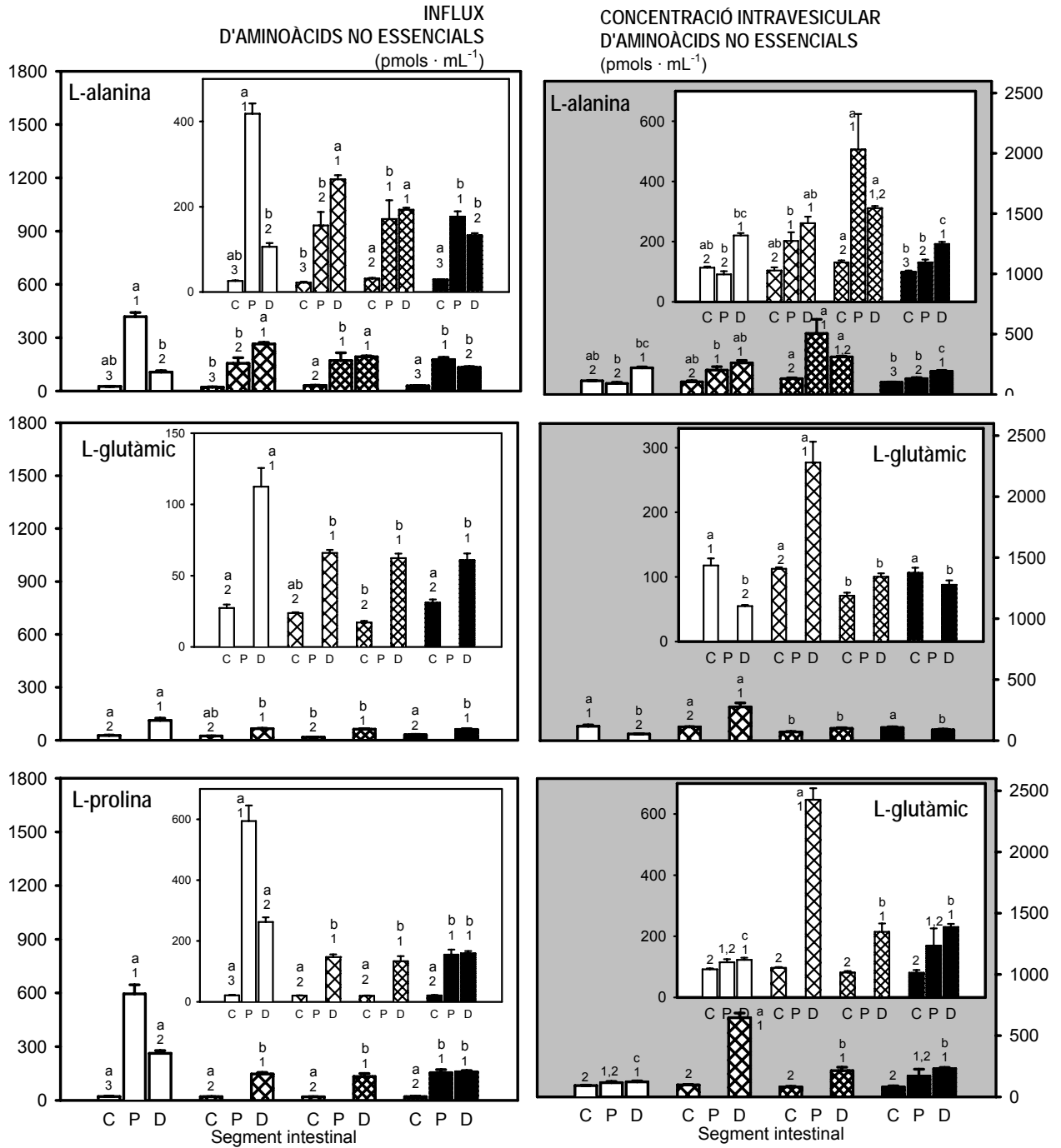


Figura 42. Influx i concentració d'aminoàcids no essencials (temps = 5 s) a VMAs obtingudes a les 6 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) de truites alimentades amb les dietes experimentals: FP (barres blanques); PV50 (rombes grans); PV75 (rombes petits) i PV100 (barres negres). Les diferències significatives entre les dietes (<math><0.05</math>) es representen amb lletres; les diferències significatives entre segments es representen amb números. L'estudi de la captació proximal de L-glutàmic i L-prolina no es determinà en algunes de les condicions per manca de mostra.

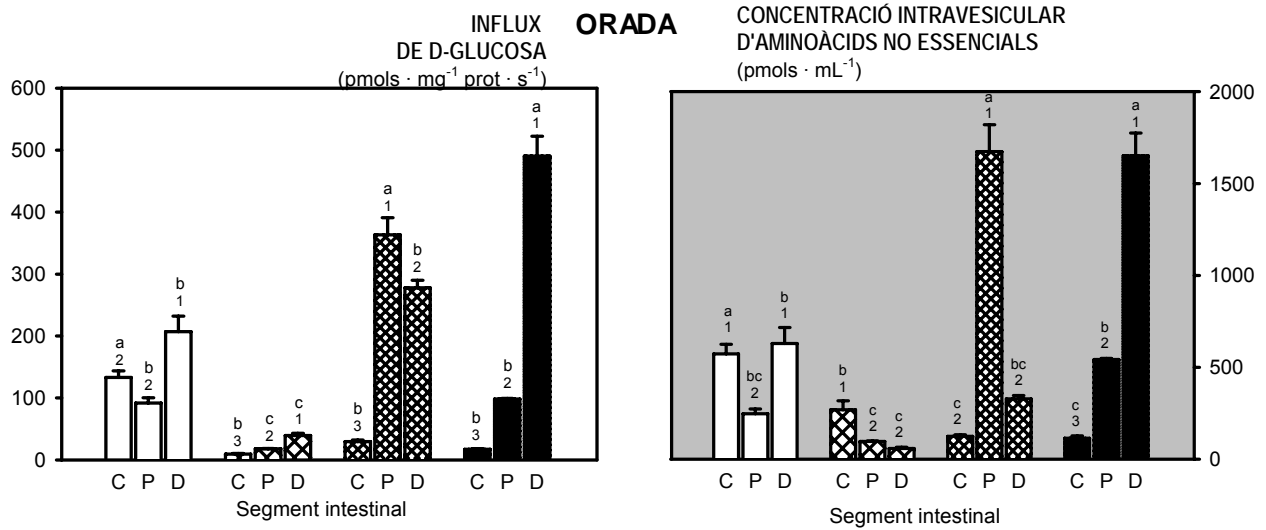


Figura 43. Influx i concentració de D-glucosa (temps = 5 s) a VMAs obtingudes a les 6 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orades alimentades amb les dietes experimentals: FP (barres blanques); PV50 (rombes grans); PV75 (rombes petits) i PV100 (barres negres). Les diferències significatives entre les dietes ( $<0.05$ ) es representen amb lletres; les diferències significatives entre diferents segments es representen amb números.

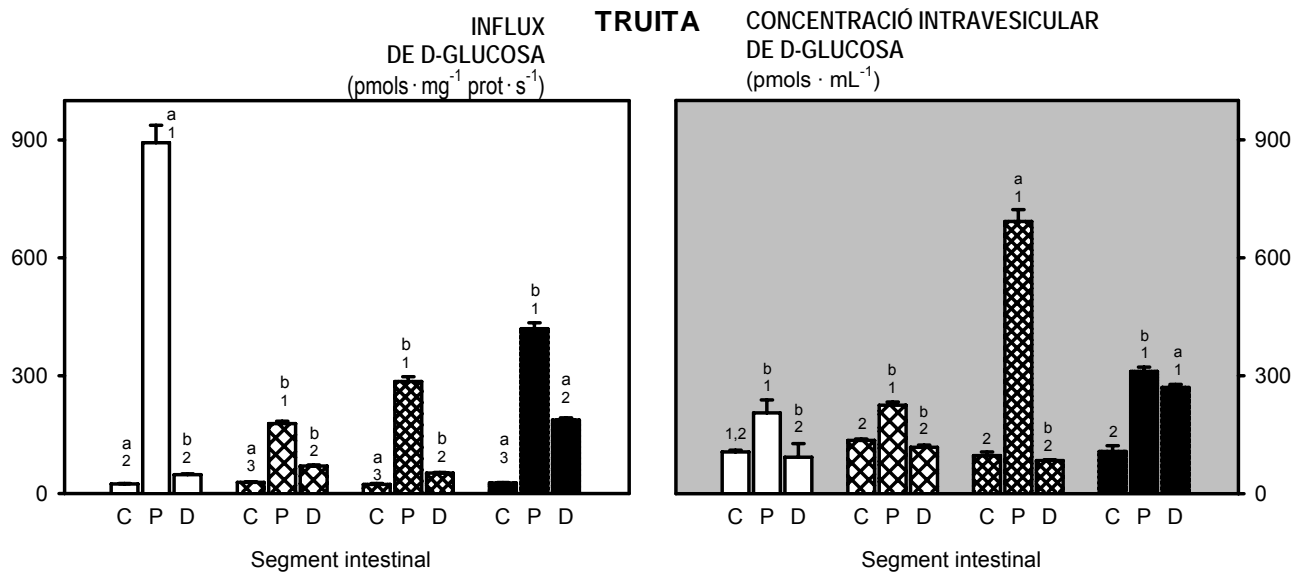


Figura 44. Influx i concentració D-glucosa (temps = 5 s) a VMAs obtingudes a les 6 hores postingesta partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) de truites alimentades amb les dietes experimentals: D.FP (barres blanques); D.PV50 (rombes grans); D.PV75 (rombes petits) i D.PV100 (barres negres). Les diferències significatives entre les dietes ( $<0.05$ ) es representen amb lletres; les diferències significatives entre segments es representen amb números.



Les orades FP van mostrar una major captació de D-glucosa (Fig. 43) a VMAs d'enteròcits distals, així com uns influxes notables a les VMAs de cecs pilòrics que disminuïren de manera significativa en els tres grups de peixos alimentats amb les dietes reemplaçades. Les orades PV50 mostraren captacions de D-glucosa molt baixes als 3 segments estudiats, suggerint una reducció de la capacitat d'absorció total del monosacàrid en aquest grup d'experimental. D'altra banda, les orades PV75 *versus* les FP van incrementar l'influx de D-glucosa a les suspensions vesiculars proximals i el mantingueren a les distals. En el grup d'animals PV100, en canvi, la captació de D-glucosa es va mantenir a la zona proximal i va incrementar a la distal. No es registraren variacions significatives en expressar els resultats com a influxes referenciats a proteïna o normalitzats a unitats de concentració.

En termes generals, la capacitat d'absorció d'aminoàcids essencials es veigué reduïda en les orades alimentades amb les dietes de substitució, especialment en el grup PV50, on aquesta capacitat disminuï de manera significativa per a tots els casos estudiats. En aquesta espècie, la capacitat d'absorció d'aminoàcids no essencials es va mantenir en els grups alimentats amb fonts proteïques vegetals, i a excepció del grup PV50, la capacitat de captació de D-glucosa incrementà.

Els influxes d'aminoàcids i les concentracions intravesiculars assolides en VMAs obtingudes dels diferents segments intestinals a les 6 h postingesta en truites es mostren a les figures 41 i 42. La captació a nivell de cecs fou baixa per als 4 grups experimentals, encara que cal considerar que en aquesta espècie els cecs, al ser nombrosos i llargs, representen una part important de la superfície absorptiva, essent per tant la seva contribució total a l'absorció considerable. En expressar els influxes d'aminoàcids en funció de la proteïna (Gràfiques sobre fons blanc), la captació a VMAs proximals i distals en les truites FP fou elevada; en les truites alimentades amb les dietes de substitució, la captació d'aminoàcids a les VMAs proximals va disminuir de manera significativa per als 4 aminoàcids estudiats<sup>15</sup>, i a les VMAs distals per la L-leucina, la L-fenilalanina, el L-glutàmic i la L-prolina en els grups PV75 i P100, així com per la L-lisina e pel grup P100. Els fluxes mesurats en VMAs distals, en canvi, foren més elevats per la captació de L-lisina en els animals PV50 i la de L-alanina en els grups PV50 i PV75. Les VMAs obtingudes a partir de la zona proximal dels animals FP, foren significativament més grans que les obtingudes apartir de les truites alimentades amb les 3 dietes de reemplaçament (25.8, 3.9, 2.1 i 6.7  $\mu\text{L} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  prot per FP, PV50, PV75 i PV100, respectivament; veure taula 24). En normalitzar les mesures

<sup>15</sup> No s'estudiaren els fluxes de L-glutàmic i L-prolina per manca de mostra.

d'influx a unitats de concentració (Gràfiques sobre fons gris), la captació d'aminoàcids a VMAs de cecs pilòrics seguí essent la menor, seguida per la capacitat de captació a intestí proximal i una gran captació en les VMAs distals. Aquesta darrera fou especialment important en el grup PV50, augmentant-se en aquest grup la capacitat de captació total respecte la resta de grups experimentals de truites.

Els influxes de D-glucosa registrats en les truites FP (Fig. 44) foren alts a les suspensions vesiculars d'intestí proximal, i menors a les obtingudes a partir de cecs pilòrics i intestí distal. En les truites PV, la captació del sacàrid a les VMAs de cecs pilòrics no es va modificar, però disminuï en les suspensions proximals i va incrementar en les VMAs distals de les truites PV100. La normalització mostrarà variacions en la magnitud de l'absorció del sacàrid als 3 tipus vesiculars estudiats, essent la capacitat de captació del sacàrid mantinguda en els grups PV50 i PV100 *versus* les truites FP, i incrementant-se en els peixos PV75 per un significatiu increment de la capacitat d'absorció del segment proximal.

Per a les dues espècies, s'analitzà també la captació de nutrients als segments proximal i distal a les 48 o 36 h postingesta (orada, Taula 25; i truita, Taula 26, respectivament). En les orades FP, la captació d'aminoàcids a VMAs proximals obtingudes 6 h després de la ingesta fou, en termes generals, superior o similar a la registrada 48 h després de l'alimentació forçada, indicant una típica situació postingesta. Els peixos alimentats amb les dietes de substitució mostraren en aquest segment un increment de la capacitat de captació en el temps llarg estudiat, suggerint una regulació a l'alça dels transportadors per efecte del dejú. En les VMAs distals s'observà el fenomen invers, essent la captació a les 48 h major en els animals FP, i mantinguent-se o disminuint en les orades alimentades amb les dietes substituïdes.

Les truites (Taula 26) mostraren influxes superiors a les 6 h en comparació als registrats a les 36 h, indicant un increment postingesta de la capacitat de transport, a excepció dels segments proximal del grup PV75 i distal del grup PV100, on els valors obtinguts als dos moments estudiats (6 i 48 h postingesta) foren similars.

Taula 25. Influxes d'aminoàcids i D-glucosa (pmols. mg<sup>-1</sup> proteïna. s<sup>-1</sup>) a VMAs obtingudes a partir d'intestí proximal (a) o distal (b) d'orada a les 6 i 48 hores postingesta.

a	Temps (h)	FP	PV50	PV75	PV100
L-leucina	6	261.9 ± 11.4 <sup>+</sup>	20.1 ± 0.3	115.1 ± 6.1	40.1 ± 3.4
	48	164.8 ± 9.9	185.6 ± 7.5 <sup>+</sup>	170.2 ± 10.3 <sup>+</sup>	81.0 ± 3.5 <sup>+</sup>
L-lisina	6	462.2 ± 15.7 <sup>+</sup>	25.5 ± 1.8	45.5 ± 1.3	33.1 ± 4.1
	48	198.4 ± 27.4	130.0 ± 12.7 <sup>+</sup>	84.3 ± 2.8 <sup>+</sup>	155.0 ± 9.3 <sup>+</sup>
L-fenilalanina	6	329.0 ± 6.2	31.7 ± 1.1	175.0 ± 5.9	62.8 ± 1.1
	48	459.4 ± 18.6 <sup>+</sup>	270.1 ± 11.5 <sup>+</sup>	242.4 ± 18.9 <sup>+</sup>	412.0 ± 17.5 <sup>+</sup>
L-alanina	6	73.7 ± 4.4	13.6 ± 1.1	102.7 ± 11.0	25.8 ± 1.2
	48	63.6 ± 5.0	104.48 ± 1.4 <sup>+</sup>	136.1 ± 7.7	27.4 ± 4.6 <sup>+</sup>
L-glutàmic	6	24.5 ± 2.8	34.9 ± 1.9	25.9 ± 0.9	30.4 ± 2.7
	48	28.1 ± 4.1	25.9 ± 1.6	42.6 ± 0.9 <sup>+</sup>	30.9 ± 0.7
L-prolina	6	110.3 ± 10.5	15.5 ± 2.3	137.2 ± 10.9	39.9 ± 3.8
	48	90.0 ± 9.0	196.3 ± 14.0 <sup>+</sup>	278.8 ± 18.4 <sup>+</sup>	117.7 ± 7.9 <sup>+</sup>
D-glucosa	6	91.8 ± 8.5	18.2 ± 1.9	363.4 ± 27.4	98.4 ± 0.9
	48	230.5 ± 14.6 <sup>+</sup>	555.7 ± 34.0 <sup>+</sup>	659.4 ± 52.1 <sup>+</sup>	195.2 ± 12.8 <sup>+</sup>

b	Temps (h)	FP	PV50	PV75	PV100
L-leucina	6	158.3 ± 26.9	165.9 ± 7.2	317.7 ± 15.3 <sup>+</sup>	144.8 ± 7.5
	48	372. ± 11.2 <sup>+</sup>	211.5 ± 11.0 <sup>+</sup>	227.3 ± 15.4	199.9 ± 8.8 <sup>+</sup>
L-lisina	6	323.2 ± 21.6 <sup>+</sup>	621.3 ± 20.2 <sup>+</sup>	774.4 ± 29.2 <sup>+</sup>	346.8 ± 20.0 <sup>+</sup>
	48	72.1 ± 3.0	301.6 ± 19.7	384.7 ± 36.6	54.5 ± 3.1
L-fenilalanina	6	250.1 ± 12.0	337.7 ± 19.7	549.4 ± 9.9	243.5 ± 13.1
	48	325.4 ± 7.1 <sup>+</sup>	725.0 ± 46.2 <sup>+</sup>	569.3 ± 20.1	254.2 ± 17.3
L-alanina	6	68.2 ± 3.4	65.6 ± 30.6 <sup>+</sup>	129.4 ± 5.5 <sup>+</sup>	58.7 ± 7.9
	48	261.8 ± 6.1 <sup>+</sup>	39.3 ± 1.4	81.8 ± 3.5	139.6 ± 11.3 <sup>+</sup>
L-glutàmic	6	19.9 ± 1.1	33.0 ± 1.8	58.9 ± 2.2 <sup>+</sup>	35.5 ± 1.0
	48	33.6 ± 1.6 <sup>+</sup>	36.4 ± 2.5	46.4 ± 2.8	35.5 ± 1.0
L-prolina	6	115.4 ± 4.8	103.2 ± 3.5	183.0 ± 14.3	179.8 ± 6.3
	48	231.2 ± 7.4 <sup>+</sup>	177.2 ± 10.0 <sup>+</sup>	231.2 ± 16.9 <sup>+</sup>	172.5 ± 3.9
D-glucosa	6	207.2 ± 24.9	39.9 ± 39.3	277.9 ± 12.2	490.6 ± 31.9
	48	676.0 ± 12.6 <sup>+</sup>	150.0 ± 4.9 <sup>+</sup>	482.2 ± 25.4 <sup>+</sup>	597.5 ± 14.3 <sup>+</sup>

Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M. de 4 determinacions. Les diferències significatives (p<0.05) en els fluxes de nutrients entre les 6 i les 48 h postingesta es representen amb una creu. Els volums vesiculars obtinguts a les 6 i a les 48 h postingesta no presenten diferències significatives (dades no mostrades).

Taula 26. Influxes d'aminoàcids i D-glucosa (pmols. mg<sup>-1</sup> proteïna. s<sup>-1</sup>) a VMAs obtingudes a partir d'intestí proximal (a) i distal (b) de truita a les 6 i 36 hores postingesta.

a	Temps (h)	FP	PV50	PV75	PV100
L-leucina	6	663.6 ± 32.4 <sup>+</sup>	268.7 ± 10.4 <sup>+</sup>	178.6 ± 14.6	332.7 ± 46.5 <sup>+</sup>
	36	124.9 ± 6.8	66.1 ± 3.3	207.9 ± 21.2	73.4 ± 3.9
L-lisina	6	939.8 ± 56.0 <sup>+</sup>	415.2 ± 9.3 <sup>+</sup>	269.3 ± 9.0 <sup>+</sup>	381.9 ± 17.2 <sup>+</sup>
	36	161.1 ± 7.6	88.5 ± 6.1	210.7 ± 10.0	116.5 ± 2.9
L-fenilalanina	6	1611.5 ± 106.8 <sup>+</sup>	263.5 ± 1.1 <sup>+</sup>	208.9 ± 6.6	418.0 ± 25.5 <sup>+</sup>
	36	346.9 ± 19.4	151.4 ± 10.6	400.5 ± 22.4 <sup>+</sup>	147.3 ± 7.0
L-alanina	6	418.5 ± 23.7 <sup>+</sup>	156.0 ± 31.7 <sup>+</sup>	171.3 ± 43.9 <sup>+</sup>	176.8 ± 12.5 <sup>+</sup>
	36	71.35 ± 4.3	45.0 ± 2.1	130.9 ± 5.5	48.0 ± 2.4

b	Temps (h)	FP	PV50	PV75	PV100
L-leucina	6	944.3 ±57.8+	821.2 ±14.9+	627.1 ±12.2+	459.7 ±23.0
	36	658.9 ±62.2	11.0 ±0.2	185.8 ±8.2	769.8 ± 194.3
L-lisina	6	875.9 ±22.8+	1063.2 ±26.9+	869.1 ±40.0+	565.7 ±37.6
	36	514.2 ±37.7	162.5 ±9.5	322.0 ±14.1	563.6 ±7.8
L-fenilalanina	6	844.2 ±39.9+	71.7 ±4.3	473.8 ±9.4+	414.7 ±35.1
	36	490.0 ±35.5	103.6 ±2.7+	141.0 ±4.7	400.3 ±22.2
L-alanina	6	106.1 ± 8.7+	264.4 ± 9.5+	193.1 ± 4.7+	133.0 ± 4.9+
	36	43.9 ± 2.3	73.5 ± 4.0	110.2 ± 1.8	100.5 ± 7.0
L-glutàmic	6	112.4 ± 13.1+	65.9 ± 2.2+	62.2 ± 3.3+	60.9 ± 4.7
	36	61.2 ± 5.6	42.8 ± 1.7	43.5 ± 1.8	71.2 ± 4.3
L-prolina	6	262.4 ± 15.3+	147.0 ± 8.9+	133.2 ± 17.1+	159.4 ± 7.1
	36	167.5 ± 34.7	33.3 ± 2.1	30.3 ± 0.9	154.4 ± 1.9
D-glucosa	6	47.9 ± 2.3	69.9 ± 3.0+	52.2 ± 1.2+	187.0 ± 5.4+
	36	36.3 ± 2.7	35.9 ± 1.0	41.2 ± 1.9	52.7 ± 3.9

Els resultats es presenten com la mitja ± S.E.M. of 4 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes de nutrients entre les 6 i les 48 h postingesta es representen amb diferents lletres. L'influx proximal de L-glutàmic i L-prolina no es determinà per manca de mostra. Els volums vesiculars obtinguts a les 6 i a les 48 h postingesta no presenten diferències significatives (dades no mostrades).

Finalment, a l'orada, es va estudiar l'efecte de la substitució de la farina de peix per ingredients vegetals sobre la histologia de l'intestí proximal (Fig. 45). Les orades alimentades amb la dieta PV100 mostraren una integritat de les capes serosa i muscular externa disminuïda en relació a les altres dietes, on aquestes zones apareixen ben estructurades. A més, la longitud de les vellositats va disminuir en la dieta de màxima substitució, i la presència de cèl·lules mucoses es veigué també reduïda.

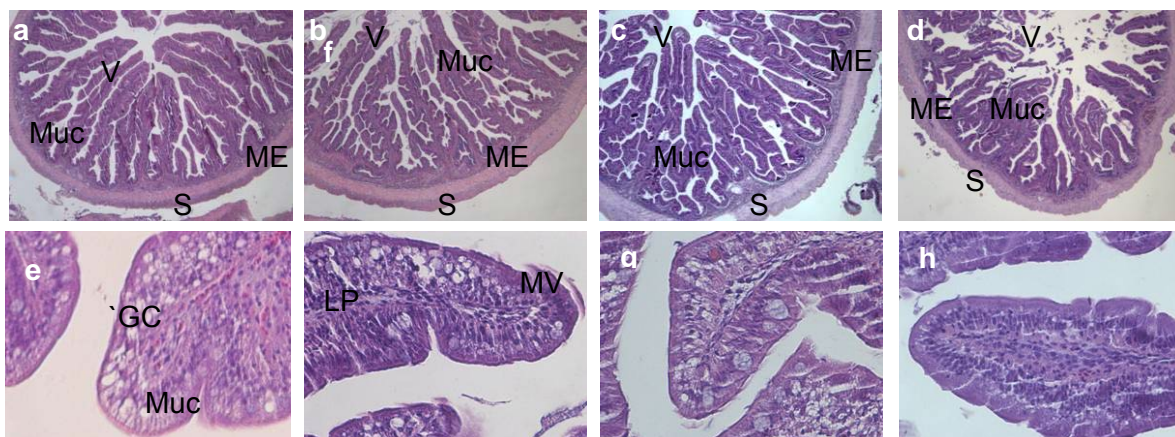


Figura 45. Talls transversals d'intestí d'orades alimentades amb les dietes FP (a; e), PV50 (b;f), PV75 (c; g) i PV100 (d; h) (4x; 10x). En les imatges es poden observar de fora cap a dins: serosa (S), muscular externa (ME), mucosa (Muc) i vellositats (V). H-E.

## DISCUSSIÓ

El reemplaçament d'alts percentatges de farina de peix per altres fonts proteiques en l'elaboració de pinsos per peixos carnívors és, ara per ara, una prioritat de l'aqüicultura. Les farines vegetals semblen ser bons substituents, però contenen factors antinutricionals (Tacon, 1995; Francis *et al.*, 2001) que afecten, entre molts altres, l'activitat digestiva (Guillaume i Métallier, 2002; Glencross, 2001), limitant la disponibilitat de nutrients per inhibició de les proteases intestinals (Alarcón *et al.*, 1999; Moyano *et al.*, 1999), per afectació de la motilitat del bolus alimentari (Storebakken *et al.*, 1998), o per afectació de la histologia intestinal (Robaina *et al.*, 1995); modificant en última instància l'absorció de nutrients.

D'altra banda, el diferent perfil aminoacídic de la farina de peix *versus* les fonts proteiques vegetals fa necessària la utilització de barreges d'ingredients (Smith *et al.*, 1988; Moyano *et al.*, 1992) que permetin aproximar la composició de la dieta al perfil requerit pels peixos, tot i que en molts casos cal addicionar aminoàcids que poden modificar també els processos d'absorció (Rodehutschort *et al.*, 1995a,b,c). Les diferents farines, a més, poden presentar diferents velocitats de digestió (Alarcón *et al.*, 2002), fent que, juntament amb els aminoàcids addicionats, la disponibilitat de nutrients al lumen intestinal difereixi tant en el temps com en l'espai en comparació amb la disponibilitat existent quan s'utilitza únicament farina de peix en la dieta (Krogdahl *et al.*, 1999).

Diversos autors han descrit disminucions de l'activitat proteolítica intestinal en utilitzar fonts vegetals en la dieta de l'orada (Venou *et al.*, 2003; Robaina *et al.*, 1995). Aquest descens de l'APT s'observà també en les orades alimentades durant 12 setmanes amb les dietes PV testades en el present treball, essent aquesta disminució dosi-dependent. El descens registrat està relacionat amb una disminució de l'activitat quimotripsina, i també d'una de les activitats tripsina (banda de 90 Kda) en les orades PV100. Però es detecta també un increment en algunes activitats tripsina, que podria estar relacionat amb l'aparició d'un mecanisme de compensació a mig termini, com el descrit a llarg plaç per Krogdahl *et al.* (1994) en salmons alimentats amb dietes que contenen inhibidor de tripsina de soja purificat. Com que les diferents proteases tallen les proteïnes en diferents punts (Guillaume i Métallier, 2002), aquests canvis en la relació tripsina/quimotripsina podrien implicar una disponibilitat diferencial d'oligopèptids i aminoàcids, que podria portar a un desequilibri de nutrients en aquesta espècie.

En truita, els nivells d'APT es van veure molt afectats per la inclusió d'alts percentatges de farina vegetal en la dieta, mostrant una dràstica disminució del pic d'activitat proteolítica postingesta en els animals PV, i essent el pic inexistent en el grup PV100. En aquest sentit, Sandholm *et al.*, (1976) i Kroghdal *et al.* (1994) van descriure la truita com una espècie altament sensible als inhibidors de proteases vegetals, mostrant una relació directa entre el percentatge de soja present a la dieta i el decrement de la disponibilitat de proteïna i energia. En aquest treball, la desaparició de totes les bandes proteolíquiques actives als zimogrames corresponents dels animals PV, suggereix una supressió del mecanisme de retroalimentació pancreàtic descrit per Dabrowsky *et al.*, (1989) en truites alimentades amb dietes suplementades amb soja, encara que les truites alimentades amb la dieta rica en soja (PV47) de l'experiència anterior no modificaren el perfil d'APT en comparar-les amb el grup de menor substitució.

D'altra banda, els nivells d'activitat proteolítica basals (considerats com els temps llargs mostrejats) foren més alts en les truites que en les orades, fet que podria explicar el manteniment de les taxes de creixement en les primeres malgrat la desaparició del pic d'activitat proteolítica postingesta.

S'ha descrit que existeix una relació entre els nivells d' $\alpha$ -amilasa i els hàbits alimentaris (Buddington *et al.*, 1997; Guillaume i Chourbet, 2002). En aquest sentit, les truites (carnívores) mostraren per aquest enzim valors inferiors en comparació a les orades (omnívor ocasional). A més, l'activitat  $\alpha$ -amilasa fou menor a l'APT en ambdues espècies, d'acord amb diferents treballs que indiquen que la capacitat de digestió dels carbohidrats en espècies carnívores sembla estar genèticament programada per ser baixa (Buddington *et al.*, 1997).

En les truites alimentades amb les dietes PV l'activitat  $\alpha$ -amilasa no es va modificar de manera significativa en comparar-los amb els peixos FP. En aquest sentit, Cahu i Infante (1995) ja la van descriure com una espècie que presenta una baixa capacitat per modificar aquestes activitats per canvis en la dieta. La disminució dels nivells d' $\alpha$ -amilasa en les orades alimentades amb les dietes PV podria d'altra banda relacionar-se amb la unió de les sals biliars a alguns factors antinutricionals de la dieta, com per exemple els oligosacàrids (Storebakken *et al.*, 1998), que afectarien aquest procés digestiu.

Les capacitats d'absorció dels carbohidrats en els peixos sí que poden presentar variacions en resposta a la dieta, tot i que les taxes de transport són molt inferiors en

comparació a les dels mamífers carnívors (Buddington *et al.*, 1991). Els estudis referents a la capacitat d'absorció de glucosa, però, difereixen segons els treballs. Així, Titus *et al.*, (1991) mostren un increment en l'absorció de D-glucosa en tilapes alimentades amb dietes riques en carbohidrats, i resultats similars es descriuen en carpa (Buddington *et al.*, 1987), mentre que les truites no semblen modular el transport d'aquest sacàrid en resposta a la dieta (Buddington i Hilton, 1987). En el present treball, les dues espècies responen a alts percentatges de substitució de la farina de peix incrementant la capacitat de captació de glucosa.

S'ha descrit que l'absorció dels aminoàcids, igual que l'absorció de sucres, està genèticament programada d'acord amb la composició natural de la dieta (Ferraris i Ahearn, 1983; Buddington *et al.*, 1987), i que a diferència dels mamífers, els transportadors d'aminoàcids estan presents al llarg de tot el tracte intestinal, encara que poden existir diferències entre les espècies (Collie i Ferraris, 1995, presents resultats). Malgrat que Buddington *et al.* (1987) descriuen taxes de captació d'aminoàcids comparables entre peixos amb diferents hàbits alimentaris, cal esmentar que existeixen marcades diferències entre els peixos d'aigua dolça, que poden acumular-los fins a concentracions superiors a les del lumen, i els peixos marins, que no poden acumular a l'enteròcit aminoàcids a concentracions superiors a les del lumen, bé per un gran reflux, bé per una metabolització intracel·lular important de les molècules una vegada captades (Ferraris, 1992; Ferraris i Ahearn, 1983) i que estan d'acord amb les diferents magnituds en les capacitats d'absorció de les dues espècies estudiades en aquest treball. Bakke-McKellep *et al.* (2000) atribueixen a l'intestí distal un paper poc important en l'absorció de nutrients en salmònids, encara que Ferraris i Ahearn (1984) postulen una important contribució d'aquest segment en la captació d'aminoàcids en peixos carnívors. Diferències en les tècniques usades en els diferents treballs, la diferent expressió de les dades, la manca d'informació dels moments postingesta en què s'han realitzat els estudis, i l'existència de pocs treballs en què s'abordin les modificacions en la capacitat d'absorció d'aminoàcids en administrar diferents dietes als peixos, fan difícil la comparació dels presents resultats.

El desplaçament de la capacitat de transport de nutrients des de la zona intestinal proximal fins a la part més distal de l'intestí en les dues espècies estudiades alimentades amb les dietes de substitució, suggereix la presència d'un mecanisme de compensació que permetria l'absorció de nutrients a la zona més allunyada de l'estómac, proporcionant més temps als processos de digestió que estan, com s'ha

descriu, empitjorats. La manca de treballs que utilitzin aquestes tècniques en peixos alimentats amb dietes de reemplaçament, però, en dificulta una vegada més la comparació, malgrat que s'ha descrit en mamífers carnívors la capacitat de regular el transport d'aminoàcids en resposta a una dieta rica en proteïna utilitzant sacs d'intestí invertits (Buddington *et al.*, 1991), o la disminució de les taxes de captació en cecs pilòrics de peixos sotmesos a dejú (Golovanova, 1992).

La disminució de la capacitat total de captació en les orades i les truites PV100 indica una menor absorció de nutrients en aquests animals. Aquesta menor captació portaria a un desequilibri o dèficit d'aminoàcids, que es veu reflexat en el menor pes assolit pels animals després de 12 setmanes de creixement. S'ha d'assenyalar, però, que l'aparició de mecanismes de compensació, com l'increment en la longitud intestinal relativa en les dues espècies o la tendència a augmentar el temps de trànsit intestinal i la producció de determinades activitats proteasa en l'orada, van permetre que les diferències en els pesos finals assolits pels diferents grups experimentals fossin menys acusades en experiències de cicle complet on s'utilitzaren les mateixes dietes (Gómez-Requeni *et al.*, 2004; de Francesco *et al.*, 2004).

L'increment de la capacitat de captació de nutrients als temps llargs estudiats en orada indica una regulació a l'alça dels transportadors en una situació de dejú a curt termini; en les truites aquest mecanisme no es detectà, encara que cal tenir en compte que els temps postingesta estudiats foren diferents i, per tant, els resultats no totalment comparables.

La presència d'ingredients vegetals en la dieta, d'altra banda, podria ser la causant de les alteracions en l'estructura de l'intestí proximal de les orades PV100, ja que en altres espècies s'ha relacionat l'aparició d'enteritis a la zona intestinal distal amb la presència de factors antinutricionals en la dieta (Krogdahl *et al.*, 1994).

En resum, malgrat l'afectació de les proteases digestives, principalment en la truita, una disminució de les capacitats d'absorció de nutrients en ambdues espècies, i l'alteració de la histologia intestinal descrita en orada, l'aparició de mecanismes de compensació en els animals després de 12 setmanes de creixement (l'increment de les activitats tripsina en l'orada i els augments de la capacitat d'absorció de nutrients a la zona distal i de la longitud intestinal relativa en les orades i les truites) va permetre taxes de creixement similars al grup FP en les dues espècies en incloure en la dieta fins a un 75% de proteïna d'origen vegetal.



### 4.1.3. DIETES DE DOBLE SUBSTITUCIÓ

#### DISSENY EXPERIMENTAL

##### Animals

Juvenils d'orades (*Sparus aurata*) provinents de Ferme Marine de Douhet (Ile d'Oleron, França) es van aclimatar a les instal·lacions de l'Institut d'Aqüicultura de Torre la Sal (C.S.I.C, Castelló) durant 20 dies en un sistema d'aigua marina interior.

##### Dietes

Després d'establir que la dieta de les orades podia contenir almenys un 75% de proteïna d'origen vegetal sense una disminució important del creixement (apartat 4.1.2; de Francesco *et al.*, 2004; Gómez-Requeni *et al.*, 2003), es van formular cinc dietes experimentals (Taula 27) per testar la substitució simultània de la farina i l'oli de peix. Quatre dietes contenien un 75% de proteïna d'origen vegetal (gluten de blat de moro, soja i extrusionat de blat), i diferents percentatges de substitució de l'oli de peix per oli d'origen vegetal (una mescla de llavor de colza, llinosa i oli de palma): 0, 33, 66 i 100% (dietes 75PV.OP, 75PV.33OV, 75PV.66OV, 75PV.OV, respectivament). Es formulà una cinquena dieta en què s'usà un 50% de proteïna d'origen vegetal (gluten de blat de moro i extrusionat de blat) i es substituï totalment l'oli de peix (dieta 50PV.OV). Les dietes eren isoproteiques, isoenergètiques i isolipídiques. El reemplaçament de l'oli de peix per olis vegetals va modificar el perfil d'àcids grassos de les dietes, disminuint gradualment la presència d'àcids grassos n-3 HUFA a mesura que incrementava la inclusió d'olis vegetals. La taula 28 mostra la composició detallada d'àcids grassos per a les 5 dietes experimentals testades.

##### Període de creixement

1200 animals ( $16.2 \pm 0.05$  g) es van distribuir aleatòriament en 15 tancs experimentals de fibra de vidre de  $0.5 \text{ m}^3$ , i es realitzà una experiència de creixement durant 10 setmanes (del 23 de maig al 5 d'agost de 2005) sota condicions de fotoperíode i temperatura naturals. Durant aquest temps les orades van alimentar-se manualment dues vegades al dia fins a la sacietat amb la dieta experimental corresponent. Els resultats de biomassa reportats es mostren a la taula 29.

Taula 27. Composició aproximada, ingredients utilitzats i aportació de cada ingredient al contingut total de proteïna de les dietes experimentals.

Composició aproximada	75PV. OP	75PV. 33OV	75PV. 66OV	75PV. OV	50PV. OV
Matèria seca (MS, %)	93.42	94.16	94.79	95.38	95.54
Proteïna (% MS)	48.98	48.78	49.03	48.65	49.61
Grasses (% MS)	22.19	22.26	22.11	22.31	22.04
Cendres (% MS)	6.54	6.57	6.62	6.41	6.91
Energia bruta (MJ· Kg MS <sup>-1</sup> )	24.72	24.71	24.65	24.49	24.41

	Ingredient (g/Kg)	75PV. OP	75PV. 33OV	75PV. 66OV	75PV. OV	50PV. OV
Farines i extrusionats	Farina de peix (CP70)	150	150	150	150	350
	CPSP 90	50	50	50	50	50
	Gluten de blat de moro	400	400	400	400	277.0
	Soja	143.0	143.0	143.0	143.0	0
	Extrusionat de blat	40	40	40	40	147.0
Olis	Oli de peix	155.0	101.5	51.5	0	0
	Oli de colza	0	8.5	17.0	25.8	23.1
	Oli de llinosa	0	29.0	58.0	88.0	79.0
	Oli de palma	0	12.5	25.0	38.8	34.0
Vitamines i Lligands	Lecitina de Soja	10	10	10	10	10
	Lligand	10	10	10	10	10
Suplementació	Mix de minerals	10	10	10	10	10
	Mix de vitamines	10	10	10	10	10
	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (18%P)	20	20	20	20	0
Suplementació	L-Lys	5.5	5.5	5.5	5.5	0

	Ingredient (g proteïna aprotats · Kg <sup>-1</sup> pinso)	75PV. OP	75PV. 33OV	75PV. 66OV	75PV. OV	50PV. OV
Farines i extrusionats	Farina de peix (CP70)			104.8		244.6
	CPSP 90 <sup>2</sup>			45		45.0
	Gluten de blat de moro			77.2		53.5
	Soja			50.3		-
	Extrusionat de blat			17.4		16.5
Suplementació	L-lisina lliure			5.5		-

Aproximacions realitzades segons les dades aportades per I.N.R.A. (2002).  
Les 5 dietes foren extrusionades.

Taula 28. Composició d'àcids grassos (% àcids grassos metil ésters) de les dietes experimentals.

% d'àcids grassos	75PV. OP	75PV. 33OV	75PV. 66OV	75PV. OV	50PV. OV
14:0	5.6	3.7	1.9	0.5	0.8
15:0	0.4	0.3	0.2	-	0.1
16:0	19.0	19.3	17.7	17.6	17.1
16:1n-7	4.7	3.1	1.5	-	1.0
16:2	0.2	0.1	-	-	-
16:3	-	-	-	0.1	-
16:4	0.4	0.3	-	-	-
17:0	0.3	0.2	-	0.2	0.3
18:0	2.4	2.8	2.8	3.2	3.2
18:1n-9	14.2	19.6	23.8	27.5	26.8
18:1n-7	1.2	0.8	-	-	-
18:2n-6	13.2	16.8	19.6	21.7	17.4
18:3n-3	1.6	9.2	16.2	23.9	23.1
18:4n-3	2.1	1.4	0.9	0.2	0.4
20:0	-	0.2	0.3	0.3	0.2
20:1n-9	6.89	4.61	2.95	1.06	1.89
20:2n-6	0.12	0.08	0.09	-	0.06
20:3n-6	-	-	-	-	0.04
20:3n-3	0.05	-	0.08	-	0.05
20:4n-6	0.29	0.19	0.28	0.07	0.12
20:4n-3	0.34	0.22	0.17	-	0.11
20:5n-3 (EPA)	6.6	4.34	2.4	0.75	1.66
22:1n-11	10.43	6.95	3.68	0.96	1.74
22:2n-6	0.17	-	0.11	0.07	0.07
22:5n-3	0.47	0.18	0.26	0.1	0.12
22:6n-3 (DHA)	7.1	4.74	2.72	0.75	2.21
24:0	-	-	-	0.21	-
24:1n-9	-	-	0.38	-	-
Total	97.8	99.1	9.81	99.2	95.5
Saturats	27.7	26.5	22.9	22	21.7
Monoenes	37.4	35.1	32.3	29.5	31.4
n-3 HUFA	14.56	9.48	5.63	1.6	4.1
n-6 HUFA	0.58	0.27	0.48	0.14	0.29
EPA + DHA	13.7	9.08	5.12	1.5	3.87

Taula 29. Pesos finals assolits i índex de creixement específic al final de l'experiència de creixement.

	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
<b>75PV.OP</b>	91.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>75PV.33OP</b>	91.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>75PV.66OP</b>	91.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.33 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>75PV.OV</b>	80.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.18 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>50PV.OV</b>	88.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.01 <sup>a</sup>

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M. de grups triplicats per a cada dieta experimental. Les diferències ( $p < 0.05$ ) per a cada paràmetre s'assenyalen amb lletres. En les dietes 75 el 75% de proteïna és d'origen vegetal. La dieta 75PV.OV conté oli de peix com a font de lípids, en les dietes 75PV.33OV, 75PV.66OV i 75PV.OV l'oli de peix s'ha reemplaçat en un 33, 66 i 100% per una mescla d'olis vegetals. En la dieta 50PV.OV el 50% de la proteïna i el 100% de l'oli són d'origen vegetal.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial respectivament;  $t$  és el període de creixement en dies. Dades projecte 56544851SR68007.

### Presa de mostres

7 dies després de finalitzar l'experiència de creixement, es va realitzar una prova postprandial: 5 i 24 h després de que els animals fossin alimentats de manera manual, 10 orades per condició es van sacrificar, pesar i mesurar. Els peixos es van disseccionar i es van obtenir els tractes digestius. A les 5 h postingesta, el primer segment proximal (de 0.5 cm aproximadament) va recollir-se per als anàlisis enzimàtics. Els cecs pilòrics, la resta d'intestí proximal i l'intestí distal es van rentar en salí isosmòtic que contenia PMSF, i es van congelar i conservar a -80°C per als estudis de transport de nutrients. A les 24 h postingesta, va obtenir-se un segment de 0.5 cm d'intestí proximal per a l'estudi histològic.

### Analítiques

Tipus d'anàlisi	Mètode utilitzat	Referència	Segment estudiat
<b>Histologia</b>	Tinció H-E	3.4.1	Proximal
<b>Activitat proteolítica total</b>	Mètode de Walter	3.4.2.1	Proximal
<b>Activitats proteasa específiques</b>	Zimografia	3.4.2.2	Proximal
<b>Fluxes de nutrients</b>	VMAs	3.4.3.3	Cecs, proximal, distal

## RESULTATS: DIETES AMB UN 75% DE PROTEÏNA VEGETAL. EFECTE DE LA INCLUSIÓ D'OLI VEGETAL

Només la substitució del 100% de l'oli de peix va provocar una disminució significativa del pes final assolit per les orades, i també de l'índex de creixement específic en els peixos utilitzats en l'experiència postingesta (-11.8 i -7.2%, respectivament. Taula 30) i en els valors de biomassa reportats en l'experiència de creixement (Taula 29).

Taula 30. Pesos finals i índex de creixement específic (SGR) dels animals mostrejats en l'experiència postingesta.

	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
<b>75PV.OP</b>	105.7 ± 2.1 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>75PV.33OP</b>	103.4 ± 2.0 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>75PV.66OP</b>	101.0 ± 3.0 <sup>ab</sup>	2.24 ± 0.04 <sup>ab</sup>
<b>75PV.OV</b>	92.4 ± 2.1 <sup>b</sup>	2.14 ± 0.03 <sup>b</sup>

Els valors es presenten com al mitjana ± S.E.M. dels 20 animals mostrejats per a cada dieta en l'experiment postprandial. Les diferències (p<0.05) per a cada paràmetre s'assenyalen amb diferents lletres. La dieta 75PV.OP conté oli de peix com a font de lípids; en les dietes 75PV.33OV, 75PV.66OV i 75PV.OV l'oli de peix s'ha reemplaçat en un 33, 66 i 100% per una mescla d'olis vegetals. SGR segons Dabrowsky et al. (1985).  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_i - \ln W_0) / t$ .  $W_i$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial respectivament; t és el període de creixement en dies.

La longitud intestinal relativa (Taula 31) mostrà una tendència a disminuir en els grups on l'oli de peix es va substituir, diferència que fou significativa en les orades 75PV.OV, denotant que aquest paràmetre està influenciat per la substitució de l'oli de peix.

Taula 31. Longitud intestinal relativa (LIR) dels animals mostrejats en l'experiència postingesta.

	LIR (mm intestí · g <sup>-1</sup> peix)
<b>75PV.OP</b>	4.06 ± 0.17 <sup>a</sup>
<b>75PV.33OP</b>	3.56 ± 0.15 <sup>ab</sup>
<b>75PV.66OP</b>	3.55 ± 0.19 <sup>ab</sup>
<b>75PV.OV</b>	3.35 ± 0.18 <sup>b</sup>

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M. dels 20 animals mostrejats per a cada dieta experimental. Les diferències (p<0.05) per a cada paràmetre s'assenyalen amb diferents lletres. La dieta 75PV.OP conté oli de peix com a font de lípids; en les dietes 75PV.33OV, 75PV.66OV i 75PV.OV l'oli de peix s'ha reemplaçat en un 33, 66 i 100% per una mescla d'olis vegetals.

S'estudià l'activitat proteolítica total a la zona proximal de l'intestí 5h després de la ingesta per als 4 grups experimentals (Fig. 46). En els peixos alimentats amb les dues dietes de major substitució, els valors d'APT foren significativament inferiors que els obtinguts en les orades 75PV.OP i 75PV.33OV. En aquests darrers grups, els zimogrames van mostrar 4 bandes amb activitat proteasa, amb pesos moleculars d'entre 60 i 25 Kda, presentant les dues bandes de major pes molecular activitat tipus tripsina, i les dues de menor pes molecular activitat de tipus quimotripsina (Veure pàg.

109). Les bandes de 55 i 25 Kda foren de major intensitat que les de 60 i 50 Kda. La intensitat de totes elles va disminuir en els peixos 75PV.66OV i 75PV.OV, desapareixent les bandes de 55 i 25 Kda en els peixos alimentats amb la dieta de reemplaçament total.

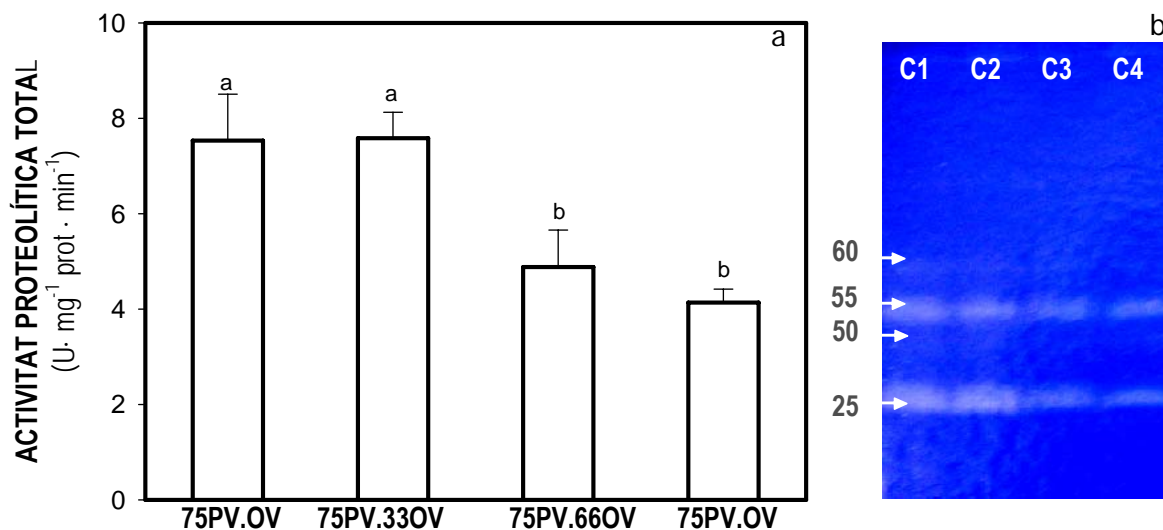


Figura 46. (a) Activitat proteolítica total a les 5 h postingesta. Els valors es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M. de 10 animals. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les diferents dietes es representen amb lletres. (b) Zimogrames d'homogeneïtzats d'intestí proximal a les 5 h postingesta en orades alimentades amb les 4 dietes experimentals. Columna (C) 1 = dieta 75PV.OP; C2 = 75PV.33OV; C3= 75PV.66OV; C4 = 75PV. OV.

Es van obtenir vesícules de membrana apical d'enteròcit a partir dels diferents segments intestinal de les orades alimentades amb les 4 dietes experimentals. En elles s'estudià la captació d'aminoàcids, glucosa i linolèic, i es va determinar el volum vesicular en funció de la proteïna. El volum de les VMAs obtingudes fou significativament superior en les suspensions vesiculars d'intestí distal en comparació a les suspensions de cecs pilòrics i intestí proximal (Taula 32). A més, el volum de les suspensions vesiculars proximals obtingudes en els peixos alimentats amb les dietes de doble substitució fou superior, essent significatiu en les orades 75PV.66OV i 75PV.OV. Tenint en compte aquestes dades, una vegada més, les captacions de nutrients es presenten com a influxes referenciats a la quantitat de proteïna de la mostra (Figs. 47, 48, 49 i 50. Gràfiques sobre fons blanc) i normalitzats a la concentració intravesicular (Figs. 47, 48, 49 i 50. Gràfiques sobre fons gris).

En funció de la proteïna de la suspensió vesicular, la captació d'aminoàcids essencials (Fig.47) i de L-prolina (Fig. 48) incrementà en substituir l'oli de peix de la dieta per olis d'origen vegetal, sense mostrar però una relació dosidependent amb els graus d'inclusió d'olis vegetals testats. L'estudi dels influxes de L-alanina, L-glutàmic (Fig. 48) i D-glucosa (Fig. 49) mostrà menors modificacions en resposta a la dieta administrada.

Taula 32. L-alanina retinguda a l'equilibri i volum vesicular en funció de la proteïna de les vesícules obtingudes a partir dels cecs pilòrics (C) segments proximal (P) i distal (D) d'orada.

		L-alanina intravesicular a l'equilibri (pmols · mg prot <sup>-1</sup> )	Volum (µL · mg prot <sup>-1</sup> )
75PV.OP	C	389.1 ± 41.5 <sup>2</sup>	1.29 ± 0.13 <sup>2</sup>
	P	426.7 ± 13.3 <sup>b,2</sup>	1.42 ± 0.04 <sup>b,2</sup>
	D	1492.5 ± 102.8 <sup>1</sup>	4.97 ± 0.34 <sup>1</sup>
75PV.33OV	C	495.5 ± 54.0 <sup>2</sup>	1.65 ± 0.18 <sup>2</sup>
	P	543.4 ± 158.7 <sup>b,2</sup>	1.81 ± 0.50 <sup>b,2</sup>
	D	1943.6 ± 197.3 <sup>1</sup>	6.48 ± 0.66 <sup>1</sup>
75PV.66OV	C	538.8 ± 120.3 <sup>2</sup>	1.79 ± 0.40 <sup>2</sup>
	P	1155.2 ± 190.2 <sup>a,1,2</sup>	3.85 ± 0.63 <sup>a,1,2</sup>
	D	1692.2 ± 282.5 <sup>1</sup>	5.64 ± 0.94 <sup>1</sup>
75PV.OV	C	631.6 ± 35.4 <sup>2</sup>	2.10 ± 0.12 <sup>2</sup>
	P	844.3 ± 87.5 <sup>a,b,2</sup>	2.81 ± 0.29 <sup>a,b,2</sup>
	D	1410.6 ± 50.2 <sup>1</sup>	4.70 ± 0.17 <sup>1</sup>

Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M. d'un mínim de 6 determinacions per a cada condició. Les diferències significatives (p<0.05) entre les dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre els segments intestinals es representen amb diferents números. Cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i distal (D).

S'estudià també el flux de linolèic a les vesícules (Fig. 50), observant-se que aquest disminuïa significativament en VMAs de cecs pilòrics i intestí distal en incloure en la dieta olis d'origen vegetal. Cal esmentar que la presència d'aquest àcid gras augmentà un 1.27, 1.48 i un 1.64 en la dieta quan l'oli de peix es reemplaçà en per un 33, 66 i 100% d'olis vegetals, respectivament. En corregir els influxes obtinguts per la quantitat de linolèic administrat, la capacitat d'absorció fou similar per als quatre grups experimentals (Fig. 50).

En estudiar la concentració assolida pels diferents aminoàcids a les VMAs després de 5 s d'incubació (Figs 47 i 48. Gràfiques sobre fons gris), s'observà que aquesta disminuïa en avançar al llarg del tracte intestinal. Aquesta disminució fou significativa per la L-lisina i la L-fenilalanina, mentre que en la L-leucina, L-glutàmic i L-prolina s'observà només una tendència. Per a la L-alanina no s'observà un patró clar de regionalització.

La concentració intravesicular de D-glucosa (Fig. 49) fou significativament més elevada les VMAs obtingudes de la zona proximal de les orades alimentades 75PV.OP que en les VMAs proximals de la resta de grups experimentals. En el cas del linolèic (Fig. 50), la major concentració es va assolir a les vesícules de cecs pilòrics dels animals alimentats amb la dieta que contenia oli de peix.

Cal assenyalar que el progressiu increment d'olis vegetals en la dieta de l'orada no modificà significativament la concentració intravesicular d'aminoàcids, indicant una capacitat d'absorció similar en els 4 grups d'animals. La capacitat d'absorció de D-glucosa i de difusió del linolèic, en canvi, fou inferior en el peixos OV.

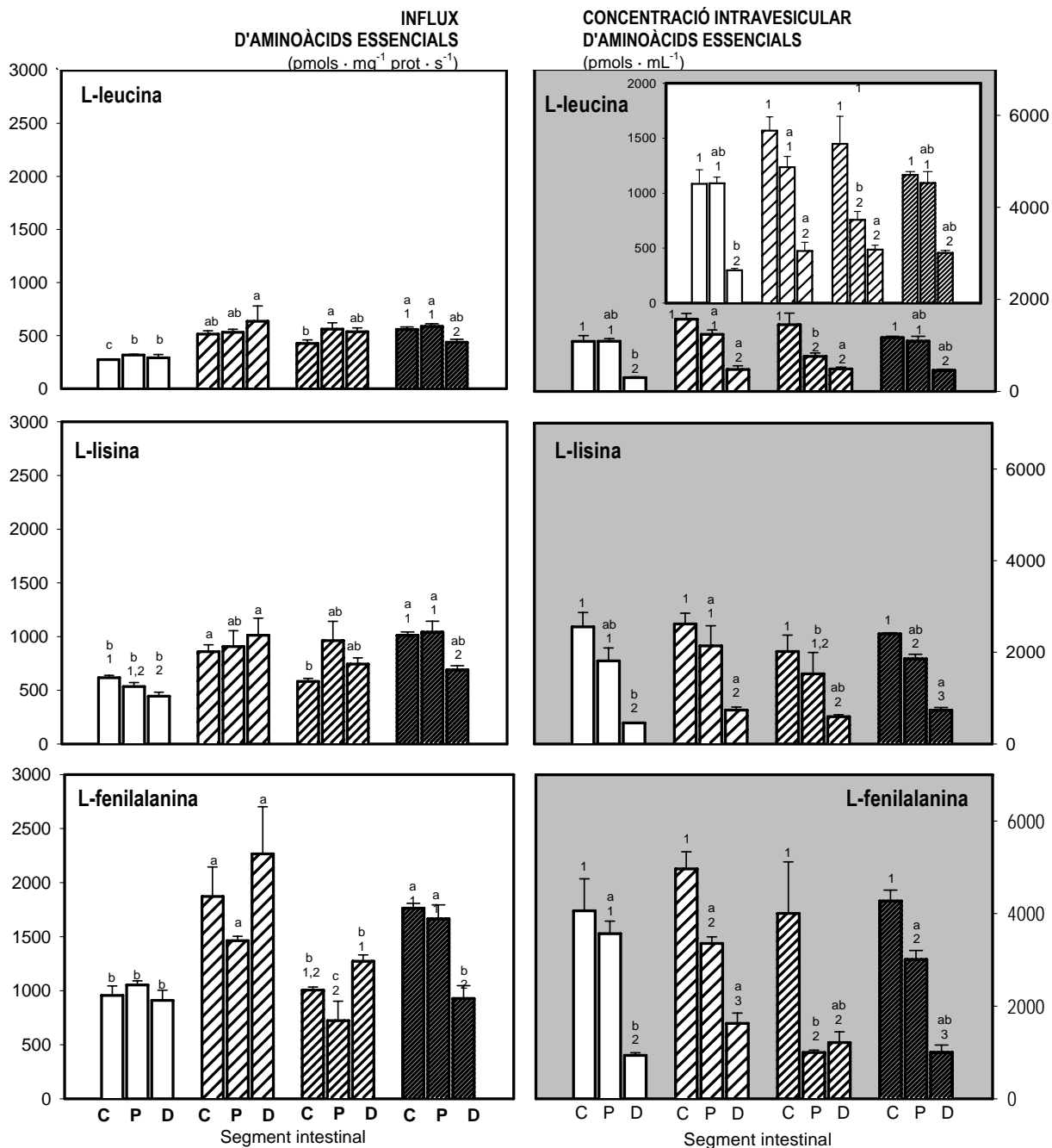


Figura 47. Influx i concentració intravesicular d'aminoàcids essencials en VMAs obtingudes a les 5 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitja ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Dietes: 75PV.OP (barres blanques); 75PV.33OV (diagonals grans); 75PV.66OV (diagonals petites) i 75PV.OV (diagonals negres).



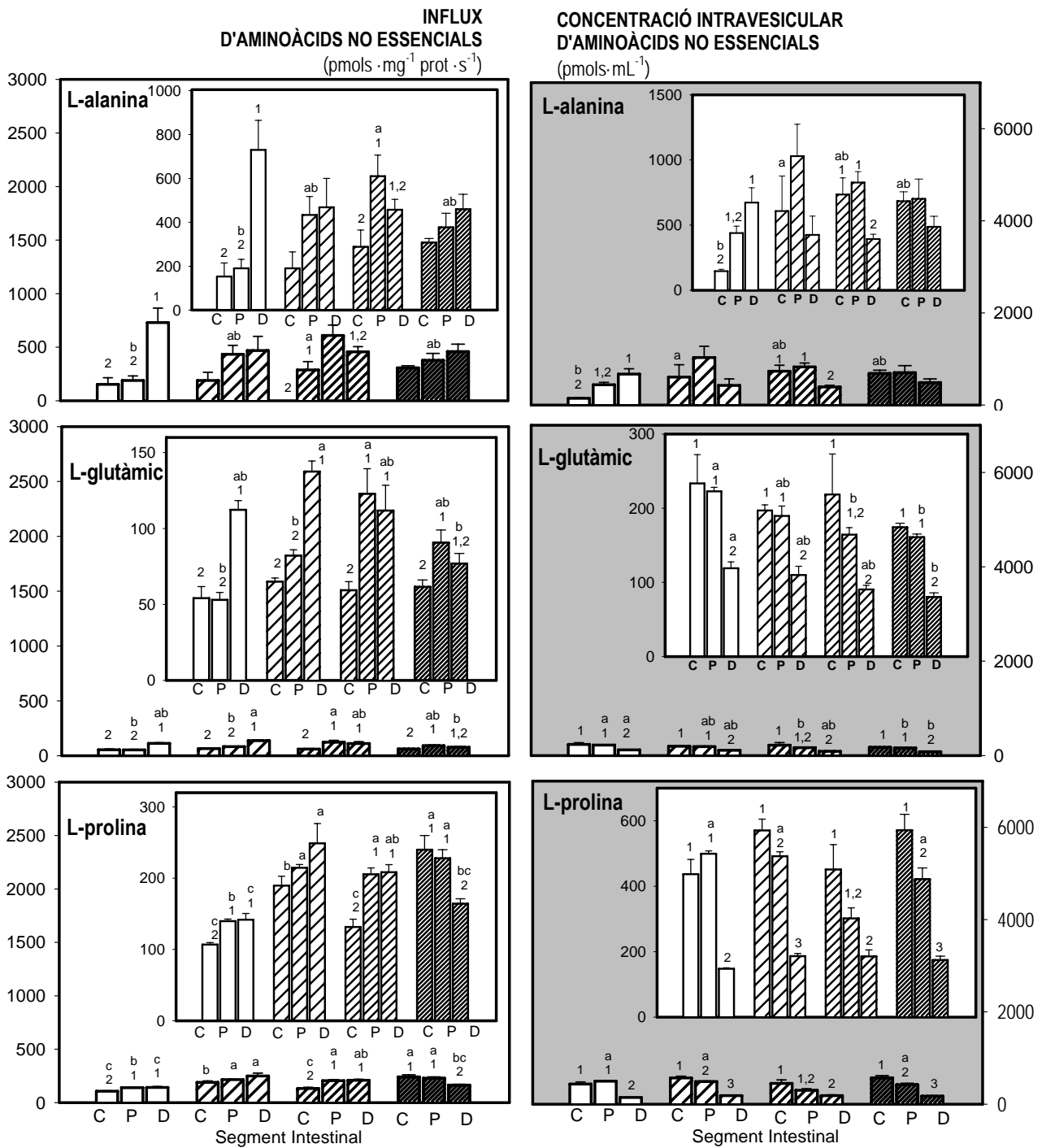


Figura 48. Influx i concentració intravesicular d'aminoàcids no essencials en VMAs obtingudes a les 5 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitja ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Dietes: 75PV.OP (barres blanques); 75PV.33OV (diagonals grans); 75PV.66OV (diagonals petites) i 75PV.OV (diagonals negres).

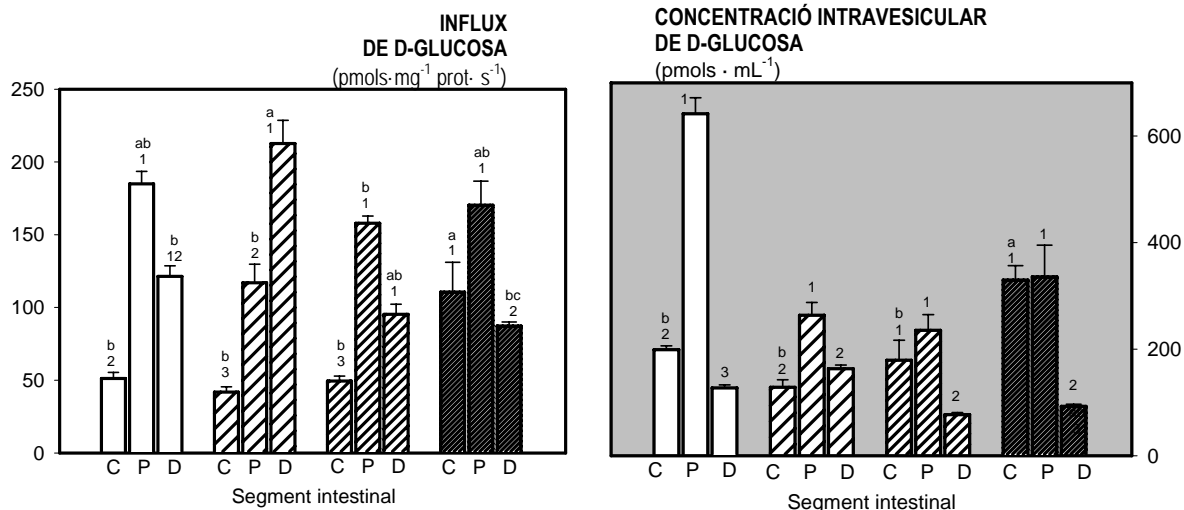


Figura 49. Captació i concentració intravesicular de glucosa en VMAs obtingudes a les 5 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitja ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències ( $p < 0.05$ ) en els fluxes entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Dietes: 75PV.OP (barres blanques); 75PV.33OV (diagonals grans); 75PV.66OV (diagonals petites) i 75PV.OV (diagonals negres).

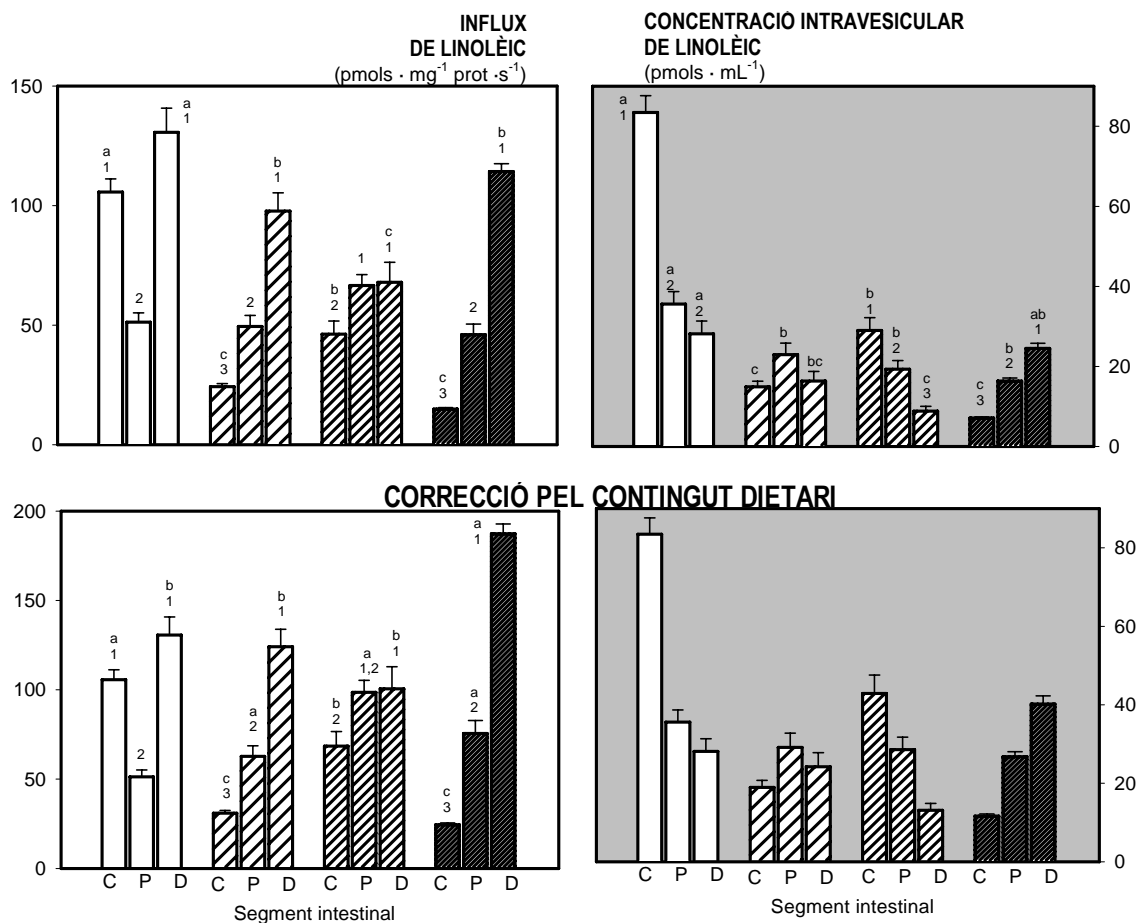


Figura 50. Captació i concentració intravesicular de linolèic en VMAs obtingudes a les 5 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitja ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Dietes: 75PV.OP (barres blanques); 75PV.33OV (diagonals grans); 75PV.66OV (diagonals petites) i 75PV.OV (diagonals negres). La correcció pel contingut dietari es féu tenint en compte el contingut de linolèic de la dieta administrada.

L'estudi histològic de l'intestí proximal dels animals alimentats amb les 4 dietes experimentals no va mostrar diferències en la longitud de les vellositats o la integritat de les capes muscular externa i serosa (Fig. 51), però s'observà un augment progressiu de l'acumulació de lípids en la part apical de les cèl·lules columnars de l'epiteli, així com una disminució del número de cèl·lules mucoses a mesura que augmentava la inclusió de l'oli d'origen vegetal en la dieta de les orades.

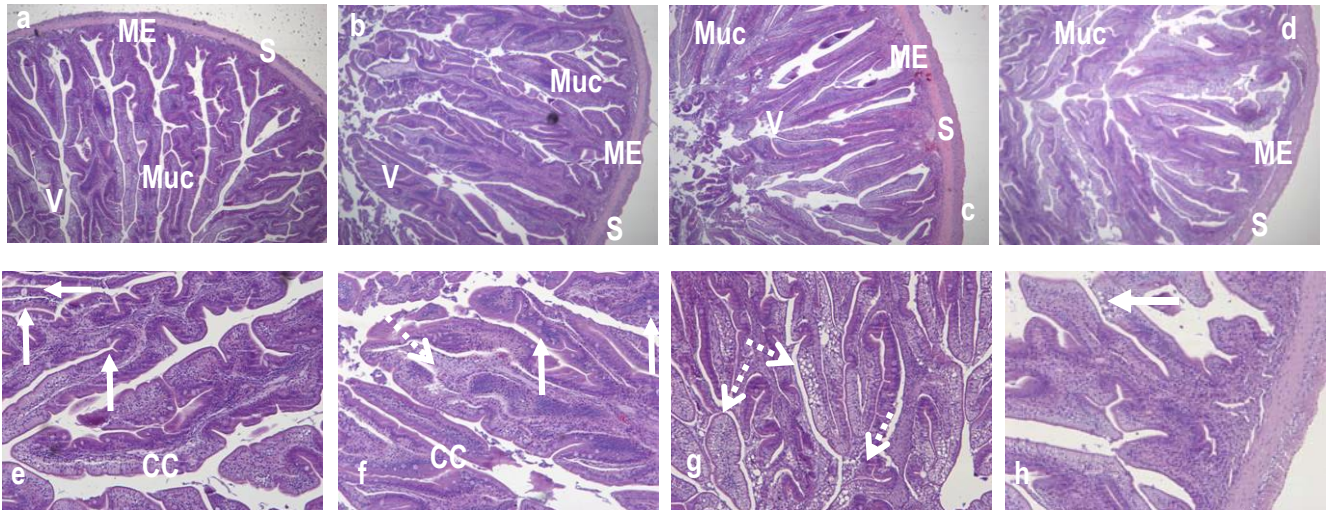


Figura 51. Talls transversals d'intestí proximal d'orades alimentades amb les dietes 75PV.OP (a; e), 75PV.33OV (b; f); 75PV.66OV (c; g) i 75PV.OV (d; h) (4x; 10x). En les imatges es poden observar de fora cap a dins: serosa (S), muscular externa (ME), mucosa (Muc), vellositats (V) i cèl·lules columnars (CC). Les fletxes sòlides indiquen acúmuls de lípids; les fletxes discontinues indiquen la presència de cèl·lules mucoses.

## DISCUSSIÓ

La limitació de la farina i l'oli de peix (Barlow, 2000; FAO, 2004) han obligat a buscar alternatives a aquests ingredients, tradicionalment usats en les dietes d'aqüicultura (Naylor *et al.*, 2000). Fins al moment, però, la majoria de treballs s'han centrat en els efectes produïts per la substitució, bé de la farina, bé de l'oli de peix. En aquest àmbit, en orada, s'han estudiat els efectes sobre el creixement, la digestió, la histologia o el metabolisme (Robaina *et al.*, 1995; Kissil *et al.*, 2000; Venou *et al.*, 2003; Kalogeropoulos *et al.*, 1992; Tocher i Ghioni, 1999), existint una limitada informació sobre els efectes de la doble substitució en aquesta o en altres espècies (Bouraoui *et al.*, 2006; Benedito-Palos *et al.*, 2006).

No existeixen en el nostre coneixement treballs referents a la possible modulació dels enzims digestius d'origen pancreàtic en resposta a la font de lípids de la dieta. En aquest estudi, la inclusió al pinso d'alts percentatges d'oli vegetal (66 i 100%) junt a un 75% de substitució de la farina de peix, sembla interferir en la digestió de les proteïnes, ja que provoca una disminució de l'activitat proteolítica total i de les proteases individuals, probablement per la presència de factors antinutricionals en l'oli, com per exemple els tanins, que poden unir-se de manera específica a alguns enzims digestius afectant-ne la funcionalitat (Liener, 1989).

La capacitat d'absorció d'aminoàcids i D-glucosa a les vesícules obtingudes dels animals 75PV.OP seguí un patró de regionalització diferent al registrat en els animals 75PV de l'experiència anterior. Aquests canvis poden relacionar-se amb la mescla de farines utilitzada en ambdós casos en el reemplaçament, ja que les dietes del present estudi contenen un 14.3% de soja, un ingredient altament digerible i de perfil proteic similar al de la farina de peix (Forster, 2003), mentre que el treball anterior no s'incloué soja en les dietes testades. D'altra banda, el progressiu increment d'olis vegetals en la dieta dels animals no afecta les capacitats totals d'absorció d'aminoàcids en les orades, suggerint que la inclusió d'oli vegetal no provoca imbalanços en la disponibilitat d'aminoàcids, com s'havia descrit en diferents estudis on es substituï la farina de peix per determinades barreges de proteïna d'origen vegetal (Dabrowsky *et al.*, 1989; Kaushik, *et al.*, 1995). La superior captació de D-glucosa a la zona proximal en comparació a la distal en la majoria de les condicions testades està d'acord amb altres estudis realitzats en orada (Sala-Rabanal *et al.*, 2004) i en altres espècies carnívores (Bakke-McKellep *et al.*, 2000). La disminució de la capacitat d'absorció del monosacàrid en les 3 dietes de doble substitució podria indicar

canvis bé en les densitats, bé en les activitats del transportador, com ja suggerí Houpe *et al.* (1997) en el transport de glucosa en el silur, i podria ser indicadora d' un dèficit energètic en els animals alimentats amb les dietes de doble substitució.

A diferència dels aminoàcids i la glucosa, el linolèic és captat únicament per difusió (Corraze, 2002), i en incrementar la seva presència en la dieta per la substitució progressiva de l'oli de peix, en disminueix la capacitat d'absorció, fet que podria relacionar-se amb canvis en la integritat de les membranes cel·lulars descrit per Houpe *et al.* (1997) o Caballero *et al.* (2003) en testar dietes amb diferent contingut de lípids.

Diversos autors (Olsen *et al.*, 1999; 2000; Caballero *et al.*, 2002; 2004) han descrit la formació de vacuoles lipídiques en enteròcits de peixos alimentats amb dietes que contenen diferents fonts de lípids vegetals com les que s'han detectat en el present treball. Tot i que s'ha considerat que l'acumulació de vacuoles lipídiques als enteròcits podria deure's a un emmagatzematge temporal per una síntesi insuficient de lipoproteïna (Loewe i Eckmann, 1988), estudis més recents ho posen en dubte, ja que no existeix una acumulació selectiva d'àcids grassos en aquestes vacuoles quan els olis vegetals tenen diferent origen i, per tant, diferent perfil d'àcids grassos (Caballero *et al.*, 2002) tot i que l'absorció d'àcids grassos als enteròcits és un mecanisme selectiu (Olsen i Ringo, 1991).

El creixement disminuï només en les orades alimentades amb la dieta amb major percentatge de doble substitució, indicant que un 100% de reemplaçament de l'oli de peix quan existeix un 75% de substitució de la farina de peix minva el creixement. Però cal considerar que els índex de creixement específics dels quatre grups experimentals foren superiors als de l'experiència anterior, suggerint un millor aprofitament de les fonts alternatives utilitzades, possiblement per l'extrusió de les dietes.

Es compararen seguidament les dues dietes amb substitució total de l'oli de peix i dos percentatges de reemplaçament amb fonts proteïques d'origen vegetal.

## RESULTATS: DIETES AMB UN 100% D'OLI VEGETAL. EFECTE DE LA SUBSTITUCIÓ DE LA FARINA DE PEIX

Les taules 33 i 34 mostren, respectivament, els pesos finals i l'SGR, i la longitud intestinal relativa, de les orades utilitzades en l'experiència postingesta. En les orades 75PV.OV, els valors obtinguts foren significativament inferiors que els registrats en orades alimentades amb la dieta 50PV.OV tant en els peixos utilitzats en l'experiència postingesta com en els reportats a les 10 setmanes de cultiu (Taula 29). La longitud intestinal relativa fou superior en les orades alimentades amb menor quantitat de proteïna d'origen vegetal (Taula 31).

Taula 33. Pesos finals i index de creixement específic (SGR) de les orades usades en l'experiència postingesta.

	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
<b>75PV.OV</b>	92.4 ± 2.1 <sup>b</sup>	2.14 ± 0.03 <sup>b</sup>
<b>50PV.OV</b>	104.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.05 <sup>a</sup>

Els valors es presenten com al mitjana ± S.E.M dels 20 animals mostrejats per a cada dieta. Les diferències (p<0.05) per a cada paràmetre s'assenyalen amb diferents lletres. En la dieta 50PP.OV el 50% de la proteïna prové d'una mescla vegetal; en la dieta 75PV.OV el 75% de la proteïna és d'origen vegetal. En ambdues dietes la font de lípid de la dieta és una mescla d'olis vegetals. SGR segons Dabrowsky et al. (1985):  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial respectivament; t és el període de creixement en dies.

Taula 34. Longitud intestinal relativa per les orades usades en l'experiència postingesta.

	LIR (mm intestí · g <sup>-1</sup> peix)
<b>75PV.OV</b>	3.35 ± 0.18 <sup>b</sup>
<b>50PV.OV</b>	4.64 ± 0.35 <sup>a</sup>

Els valors es presenten com al mitjana ± S.E.M. dels 20 animals mostrejats per a cada dieta. Les diferències (p<0.05) s'assenyalen amb diferents lletres. En la dieta 50PP.OV el 50% de la proteïna prové d'una mescla vegetal; en la dieta 75PP.OV el 75% de la proteïna és d'origen vegetal. En ambdues dietes la font de lípid de la dieta és una mescla d'olis vegetals.

L'activitat proteolítica total a l'intestí proximal 5 h després de la ingesta (Fig. 52) fou significativament superior en els animals 50PV.OV en comparar-la amb l'APT de les orades 75PV.OV. En ambdós casos, es van detectar als zimogrames 2 bandes actives de 55 i 25 Kda, amb activitats tipus tripsina i quimotripsina, respectivament (veure proves d'inhibició específica. Pàg 109). En la dieta 50PV.OV, la intensitat de les bandes detectades fou més elevada, reafirmant els resultats obtinguts mitjançant tècniques espectrofotomètriques.

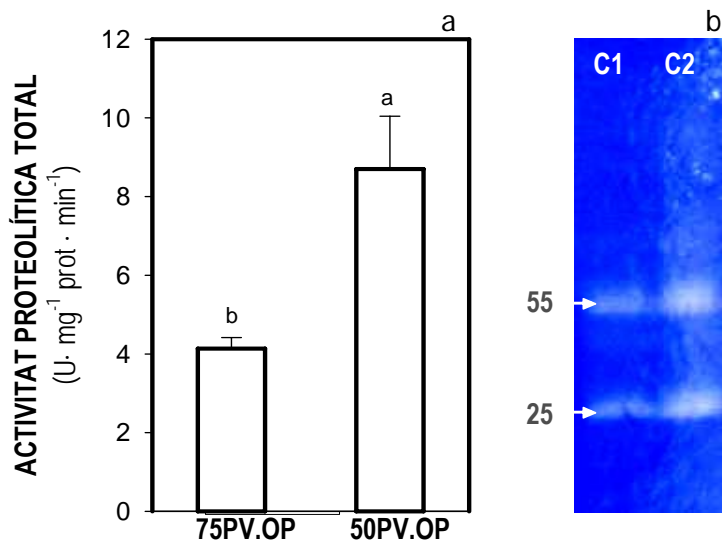


Figura 52. (a) Activitat proteolítica total a les 5 h postingesta. Els valors es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M. de 10 animals. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les diferents dietes es representen amb lletres. (b) Zimogrames d'homogeneïtzats d'intestí proximal a les 5 h postingesta en orades alimentades amb les dietes experimentals. Columna (C) 1 = dieta 75PV.OV; C2 = 50PV. OV.

Es van obtenir vesícules de membrana apical d'enteròcit a partir dels diferents segments intestinals recol·lectats a les 5 h postingesta per als dos grups experimentals. Es determinaren en les VMAs els influxes d'aminoàcids, glucosa i linolèic, així com el volum vesicular en funció de la proteïna. Igual que en els apartats anteriors, s'utilitzà la doble representació per a l'expressió dels resultats de captació de nutrients (Fig. 53 i 54), ja que tot i que la composició de la dieta no provocà canvis significatius en el volum vesicular, en ambdós grups d'orades les VMAs distals foren més grans que les de cecs pilòrics i intestí proximal (Taula 35). La no modificació del volum de les suspensions vesiculars en resposta a la dieta va fer que en els dos tipus de representacions emprades el perfil obtingut fos similar.

Taula 35. L-alanina retinguda a l'equilibri i volum vesicular en funció de la proteïna de les vesícules obtingudes a partir dels cecs pilòrics (C) intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada.

		L-alanina intravesicular a l'equilibri ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ )	volum ( $\mu\text{L} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ )
75PV.OV	C	$631.6 \pm 35.4^2$	$2.10 \pm 0.12^2$
	P	$844.3 \pm 87.5^2$	$2.81 \pm 0.29^2$
	D	$1410.6 \pm 50.2^1$	$4.70 \pm 0.17^1$
50PV.OV	C	$561.24 \pm 38.6$	$1.87 \pm 0.12$
	P	$704.6 \pm 40.9$	$2.35 \pm 0.14$
	D	$1080.9 \pm 343.5$	$3.60 \pm 1.14$

Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M. d'un mínim de 6 determinacions per a cada condició. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en entre dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives entre els segments intestinals es representen amb diferents números.

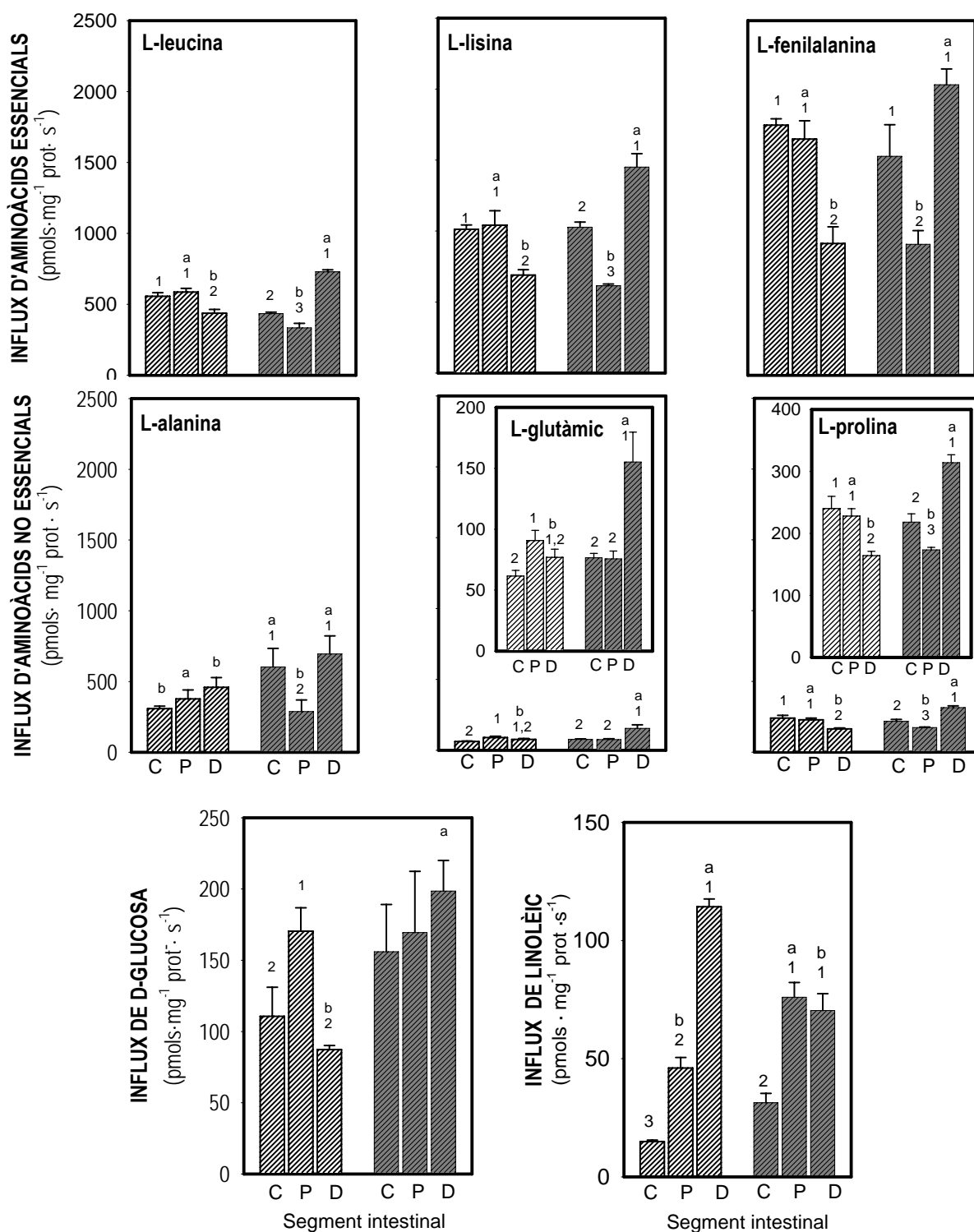


Figura 53. Captació d'aminoàcids, D-glucosa i linolèic en VMAs obtingudes a les 5 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitja ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes de nutrients entre dietes es representen amb diferents lletres; les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Dietes: 75PV.OV (barres clares); 50PV.OV (barres fosques).



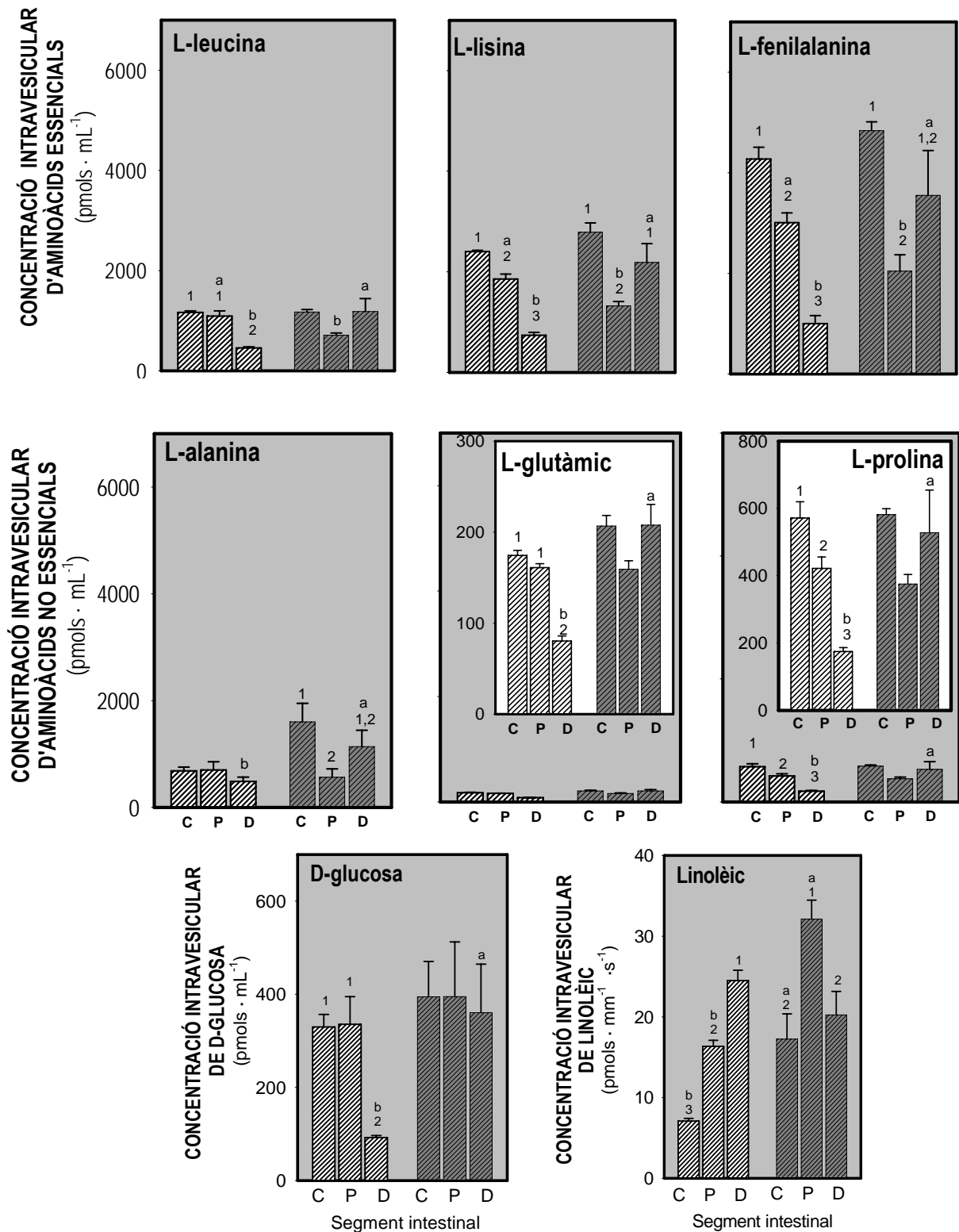


Figura 54. Concentració intravesicular d'aminoàcids, D-glucosa i linolèic (temps = 5s) en VMAs obtingudes a les 5 hores postingesta a partir de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitja  $\pm$  S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Dietes: 75PV.OV (barres clares); 50PV.OV (barres fosques).

La concentració d'aminoàcids assolida a les vesícules (Fig. 54) mostra, com ja s'ha comentat, una regionalització en l'absorció d'aminoàcids i D-glucosa en les orades 75PV.OV, essent aquesta superior en els cecs pilòrics i el segment proximal, i inferior en la zona distal; la captació de linolèic mostrarà un patró diferent, incrementant la captació a mesura que s'avançava en la zona del tracte intestinal estudiada. En els peixos 50PV.OV, la regionalització de la capacitat d'absorció de nutrients fou diferent, disminuint significativament la captació dels aminoàcids essencials en les VMAs proximals i incrementant la de tots els aminoàcids i la D-glucosa en les distals en comparar-la amb les VMAs obtingudes de les orades 75PV.OV. L'absorció de linolèic dels animals 50PV.OV fou similar en VMAs proximals i distals i inferior en les VMAs de cecs pilòrics.

La figura 55 mostra talls transversals d'intestí proximal de les orades 75PV.OV i 50PV.OV. Les vellositats van aparèixer més replegades en els animals alimentats amb la dieta 50PV.OV, mostrant a més una desestructuració de l'epiteli de cèl·lules columnars respecte la lamina propia. En ambdós casos, la població de cèl·lules mucoses fou pràcticament inexistent i es van detectar vacuoles lipídiques a la mucosa, que foren de tamany superior en les orades 50PV.OV.

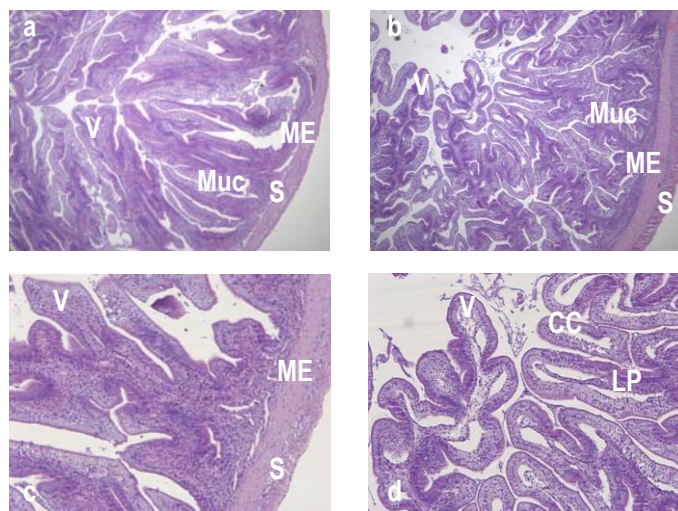


Figura 55. Talls transversals d'intestí proximal d'orades alimentades amb les dietes 75PV.OV (a; c), 50PV.OV (b; d) (4x; 10x). Es poden distingir les capes serosa (S), muscular externa (ME), mucosa (Muc), les vellositats (V), cèl·lules columnars (CC) i la lamina propia (LP).

## DISCUSSIÓ

L'increment d'activitat proteolítica total de les orades 50PV.OV suggereix una superior digestió en els peixos alimentats amb la dieta que contenia menor percentatge de reemplaçament de la farina de peix per fonts proteiques vegetals. Aquesta millora de la digestió pot relacionar-se bé amb una menor presència de factors antinutricionals en la dieta (Francis *et al.*, 2001), bé amb el tipus de fonts vegetals emprades en la substitució de la farina de peix. En aquesta experiència, per ajustar els pinsos als requeriments específics de les orades i minimitzar la necessitat de suplementació amb aminoàcids lliures, s'utilitzà soja en la dieta 75PV.OV però no en la 50PV.OV. La soja, com ja s'ha comentat anteriorment, és rica en inhibidors de proteases (Francis *et al.*, 2001; Tacon *et al.*, 1995), que afecten l'activitat digestiva per la inhibició de les tripsines i quimotripsines d'origen pancreàtic (Moyano *et al.*, 1999).

D'altra banda, la comparació d'aquests zimogrames amb els d'altres orades on s'havia substituït únicament el 50 o el 75% de la farina de peix (pàg. 110), mostrà una disminució en el nombre de bandes actives detectades. Aquest decrement en l'activitat podria relacionar-se amb la utilització de diferents tipus de farines vegetals en el reemplaçament (Alarcón *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 1999), especialment l'esmentada farina de soja, rica en inhibidors de proteases (Francis *et al.*, 2001; Tacon *et al.*, 1995), encara que la inactivació de les mateixes activitats específiques en els dos grups de peixos d'aquesta experiència (75PV.OV i 50PV.OV) sembla indicar la presència de factors antinutricionals en els olis utilitzats.

La dieta 50PV.OV, a més de no contenir soja, contenia 4 vegades més d'extrusat de blat que la dieta 75PV.OV. Aquest ingredient és menys digerible que la soja i és ric en oligosacàrids i polisacàrids diferents del midó (Francis *et al.*, 2001), que poden provocar moviments anormals del bolus o dificultar els processos digestius per unió amb les sals biliars (Storebakken *et al.*, 1998). Malgrat l'extrusió de les dietes, aquesta presència de glúcids complexos a la dieta 50PV.OV podria provocar una digestió més lenta com ja suggerí Alarcón *et al.* (2002), que podria relacionar-se amb la major capacitat de transport d'aminoàcids a la zona distal de l'intestí detectada en els animals 50PV.OV, que permetria una captació més tardana de nutrients evitant possibles imbalanços (Kaushik *et al.*, 1995; Rodehutschrod *et al.*, 1995a,b,c) i suggerint que els processos de digestió i absorció intestinal poden modular-se per permetre un òptim creixement (Guillaume i Choubet, 2002), de manera similar a la descrita en l'experiència anterior de substitució de la farina de peix, i com s'ha observat també en altres espècies (Buddington, 1987; Buddington *et al.*, 1987; Ferraris i Diamond, 1989).

Igualment, la capacitat d'absorció de D-glucosa en els animals 50PV.OV incrementà en la zona intestinal distal, suggerint una modulació del transport d'aquest nutrient en aquesta espècie, encara que d'altres estudis utilitzant dietes amb alt contingut de carbohidrats no han trobat canvis en el transport d'aquest sacàrid en altres espècies carnívores (Buddington i Hilton, 1987). L'increment en l'absorció de linoleic dels animals 50PV.OV. en comparació a les orades 75PV.OV pot estar relacionat amb una major presència d'ANFs que interfereixin amb l'entrada de l'àcid gras per unió a les sals biliars en els animals amb major percentatge de substitució (Francis *et al.*, 2001; Storebakken *et al.*, 1998), o amb canvis en la composició de la membrana (Houpe *et al.*, 1997). En aquest sentit, l'increment de la superfície absorbent de la zona proximal de les orades 50PV.OV podria suggerir un mecanisme de compensació per pal·liar possibles dèficits nutricionals que permetria obtenir les bones taxes de creixement registrades.

En resum, les diferències en el creixement entre els dos grups alimentats amb pinsos amb inclusió total d'olis d'origen vegetal semblen degudes al reemplaçament diferencial de la farina de peix per fonts proteiques d'origen vegetal, mostrant una vegada més que tant els percentatges com els ingredients utilitzats en la substitució de la farina de peix poden afectar els processos digestius dels animals carnívors, encara que en aquests apareixen mecanismes de compensació que permeten un correcte balanç nutritiu per assolir, després de 10 setmanes de cultiu, bones taxes de creixement. Els resultats obtinguts indiquen que és possible la substitució simultània d'un 100% de l'oli de peix sense detriment de les taxes de creixement si es disminueix a la dieta el percentatge de substitució de la farina de peix.

## 4.2. DIETES DE PREPARACIÓ A L'HIVERN

El síndrome d'hivern afecta els cultius d'orades en zones de la costa Nord-Mediterrània (Padrós *et al.*, 1998), quan la temperatura de l'aigua baixa durant l'hivern i es recupera a l'inici de la primavera (Tort *et al.*, 2004). Aquesta malaltia sembla tenir un origen multifactorial (Tort *et al.*, 2005), relacionat amb el confinament dels animals en gàbies on la temperatura pot disminuir per sota del rang òptim per a l'espècie, les altes densitats de cultiu, i també possibles manipulacions. Aquests factors deriven en danys tissulars, i una immunosupressió que comporta major susceptibilitat a patògens oportunistes.

Els animals afectats per aquest síndrome presenten, entre altres, una severa infiltració lipídica al fetge, i una alteració de l'aparell digestiu (Galeotti *et al.*, 1999; Tort *et al.*, 1998a; Contessi *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2003). S'ha descrit que quan la temperatura de l'aigua és inferior als 12°C, els animals rebutgen l'aliment i s'enfronten a una situació de dejuni prolognat (Sala-Rabanal *et al.* 2003; Ibarz *et al.*, 2004), que comporta una movilització del greix perivisceral. Els àcids grassos alliberats són captats pel fetge, que no els redistribueix i els acumula (Ibarz *et al.*, en premsa; Ibarz *et al.*, en revisió). El dejuni voluntari porta també a l'aparició de material fibromucós a l'interior de l'intestí (Sala-Rabanal *et al.*, 2003) i a la hiperplàsia de les cèl·lules mucoses de l'epiteli intestinal (Sala-Rabanal *et al.*, 2003).

Per aconseguir bones taxes de creixement, els pinsos comercials són rics en lípids. Aquest tipus de dieta afavoreix l'acúmulo de grassa perivisceral, amb el consegüent increment del risc de que tingui lloc la infiltració lipídica hepàtica amb l'arribada de l'hivern.

L'objectiu d'aquest estudi és determinar si les orades alimentades amb dietes comercials amb baixos i alts percentatges de lípids arriben amb diferents condicions per enfrontar-se al fred. S'estudia també l'efecte d'un exercici moderat sobre els animals. L'objectiu s'aborda des d'un punt de vista multidisciplinar; i en aquest apartat es mostren i discuteixen els estudis realitzats a nivell intestinal.



## DISSENY EXPERIMENTAL

### Animals

Al Centre d'Aqüicultura de Sant Carles de la Ràpita (CA-IRTA, Espanya), 160 orades (*Sparus aurata*) es van aclimatar durant 15 dies en 4 tancs experimentals de fibra de vidre de 2 m<sup>3</sup>, en un sistema interior, a 20°C, amb aigua marina airejada (3.8% d'oxigen) i filtres sòlids i biològics.

### Dietes

Es van testar 2 dietes comercials isoproteiques (Taula 36) que diferien entre altres en la quantitat de lípids que contenien (un 14% en la dieta 14 i un 22% en la dieta 22) i en l'energia digerible.

Taula 36. Composició de les dietes comercials (ProAqua) usades en l'experiència de preparació al fred.

Composició	Dieta 14	Dieta 22
Grassa (%)	14.0	22.0
Proteïna (%)	44.0	45.0
Carbohidrats (%)	28.6	23
Cel.lulosa (%)	2.5	1.3
Cendres (%)	9.6	11.0
P total (%)	1.3	1.3
Vitamina A (UI)	10000	10000
Vitamina D <sub>3</sub> (UI)	1500	1500
Vitamina E (α-tocofenol) (mg)	150	150
Energia digerible (MJ/Kg)	16.5	18.9

Composició facilitada per la casa comercial.

### Períodes de creixement i fred

El Novembre de 2003, les orades (pes inicial 104.9 ± 7.1 g) van ser distribuïdes de manera aleatòria en 4 tancs experimentals. Durant 75 dies es van mantenir a 20°C i cadascuna de les dietes es va administrar manualment a dos grups d'animals dues vegades al dia fins a la sacietat. En un dels tancs de cada condició, els animals van ser sotmesos a un exercici moderat (2 longituds · sg<sup>-1</sup>) induït per l'increment del flux d'entrada d'aigua (Fig. 56). La Taula 37 mostra l'energia diària ingerida pels animals dels 4 grups experimentals.

A continuació, la temperatura de l'aigua va disminuir-se gradualment a raó de 2 °C·dia<sup>-1</sup> fins a 10°C (caiguda en 5 dies), mantenint-se a 10 ± 0.5 °C durant 35 dies. Els canvis de temperatura es van controlar de manera manual mitjançant unitats de fred EA-2000 (CUBIJET, Bologna, Itàlia).



Figura 56. Instal·lacions experimentals del Centre d'Aqüicultura de Sant Carles de la Ràpita (a); fluxe normal d'entrada d'aigua (b); fluxe incrementat d'entrada d'aigua (c).

Taula 37. Ingesta dels 4 grups experimentals.

	Energia ingerida (KJ · dia <sup>-1</sup> · peix <sup>-1</sup> )
dieta 14	60.1
dieta 14.E	65.3
dieta 22	68.5
dieta 22.E	75

Durant el període de creixement la ingesta fou mesurada diàriament. D.14 és la dieta amb baix contingut de lípid; D. 22 és la dieta amb major percentatge lipídic; E indica la condició d'exercici moderat per a cada dieta testada. Dades projecte CIRIT 036043.

Es van realitzar dos mostrejos al llarg de l'experiència (Fig. 57): un al final del període d'engreix de 75 dies, i un segon després de 40 dies de l'inici del descens tèrmic.

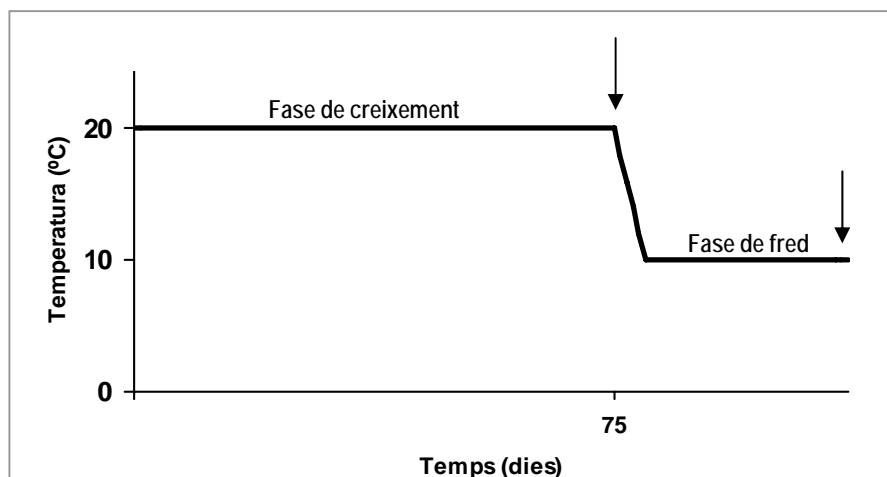


Figura 57. Esquema del disseny experimental utilitzat en l'experiència de preparació a l'hivern. Les fletxes indiquen els moments de presa de mostres.



## Presa de mostres

.En cadascun dels mostratges, 16 animals sotmesos a un dejuni previ<sup>16</sup> van sacrificar-se per desmedul·lació, es van pesar i se'n va extreure l'aparell digestiu. Es va medir la longitud intestinal excloent els cecs pilòrics i es van prendre mostres per a l'estudi del transport de nutrients a nivell intestinal. No es van obtenir mostres per a l'anàlisi d'enzims digestius perquè, malgrat l'interès d'un seguiment postprandial, les orades rebutgen l'aliment quan la temperatura de l'aigua està per sota de 12°C.

## Analítiques

Tipus d'anàlisi	Mètode utilitzat	Referència	Fragment estudiat
Fluxes de nutrients	VMA's	3.4.3.3	Cecs, proximal, distal

## RESULTATS

La taula 38 mostra els pesos finals assolits i els índex de creixement específic (SGR) al final del període de creixement; la taula 39 la longitud intestinal relativa (LIR) per a les 4 condicions experimentals i els 2 mostrejos realitzats. No es van trobar diferències significatives per cap d'aquests paràmetres entre els grups experimentals.

Taula 38. Pesos finals assolits, índex de creixement específic (SGR) dels animals al final del període de creixement.

	CREIXEMENT	
	Pes final (g)	SGR (% · dia <sup>-1</sup> )
dieta 14	177.0 ± 7.1	0.663 ± 0.05
dieta 14.E	163.1 ± 6.4	0.597 ± 0.04
dieta 22	151.4 ± 7.5	0.540 ± 0.06
dieta 22.E	168.6 ± 7.7	0.600 ± 0.06

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M. dels 16 animals mostrejats per a cada condició. No es van detectar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els paràmetres estudiats. D.14 és la dieta amb baix contingut de lípid; D. 22 és la dieta amb major percentatge lipídic; E indica la condició d'exercici moderat per a cada dieta testada. SGR segons Dabrowski *et al.*, 1985.  $SGR (\% \cdot dia^{-1}) = 100 \cdot (\ln W_t - \ln W_0) / t$ .  $W_t$  i  $W_0$  representen el pes final i el pes inicial;  $t$  és el període de creixement en dies.

Taula 39. Longitud intestinal relativa (LIR) dels animals al final dels períodes de creixement i de fred.

	CREIXEMENT	FRED
	dieta 14	6.24 ± 0.28
dieta 14.E	6.55 ± 0.34	6.89 ± 0.37
dieta 22	5.79 ± 0.24	6.04 ± 0.36
dieta 22.E	5.24 ± 0.44	6.67 ± 0.31

Els valors es presenten com la mitjana ± S.E.M. dels 16 animals mostrejats per a cada dieta experimental. No es van trobar diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els grups. D.14 és la dieta amb baix contingut de lípid; D. 22 és la dieta amb major percentatge lipídic; E indica la condició d'exercici moderat per a cada dieta.

<sup>16</sup> 24 hores per al mostreig de final de creixement i 35 dies pels animals sotmesos a fred.

Es van obtenir vesícules de membrana apical d'enteròcit a partir de cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal per a les 4 condicions experimentals i els 2 mostrejos realitzats per a cadascuna. En aquestes suspensions vesiculars es van determinar els influxes d'aminoàcids i glucosa, i el volum vesicular en funció de la proteïna.

Els valors obtinguts en estudiar el volum vesicular es resumeixen a la taula 40. En l'experiència de creixement, van aparèixer diferències entre els segments intestinals dels animals 22.E; d'altra banda, la dieta va modificar el volum de les suspensions vesiculars distals, que foren significativament més grans en les orades 14.E. A més, el fred incrementà el volum de la majoria de tipus vesiculars obtinguts (Taula 40). Aquest augment fou molt important (entre 7 i 20 vegades) en les vesícules obtingudes a partir dels cecs pilòrics, suggerint una afectació de l'estructura de l'intestí en els peixos sotmesos a una situació prolongada de fred.

Taula 40. L-alanina retinguda a l'equilibri i volum vesicular en funció de la proteïna de les vesícules obtingudes a partir dels cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal(D) d'orada.

		CREIXEMENT		FRED		
		L-alanina intravesicular a l'equilibri (pmols · µg prot <sup>-1</sup> )	Volum (V) (µL · µg prot <sup>-1</sup> )			
		L-alanina intravesicular a l'equilibri (pmols · µg prot <sup>-1</sup> )	Volum (V) (µL · µg prot <sup>-1</sup> )			
dieta 14	C	458.1 ± 102.3	1.5 ± 0.34	+	4364.9 ± 1015.1 <sup>1</sup>	12.8 ± 3.51 <sup>1</sup>
	P	3421.0 ± 1496.9	1.1 ± 0.48		652.8 ± 73.0 <sup>2</sup>	2.1 ± 0.29 <sup>2</sup>
	D	546.4 ± 14.5 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.05 <sup>b</sup>	+	1667.0 ± 180.8 <sup>a,2</sup>	5.6 ± 0.60 <sup>a,1,2</sup>
dieta 14.E	C	565.1 ± 123.5	1.9 ± 0.99	+	5526.3 ± 420.8 <sup>1</sup>	18.4 ± 1.40 <sup>1</sup>
	P	548.0 ± 160.9	1.8 ± 0.53		627.7 ± 80.20 <sup>2</sup>	2.1 ± 0.26 <sup>2</sup>
	D	781.6 ± 67.5 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.72 <sup>a</sup>		950.8 ± 169.9 <sup>b,2</sup>	3.2 ± 0.56 <sup>b,2</sup>
dieta 22	C	472.6 ± 103.1	1.6 ± 0.34	+	3564.3 ± 782.9 <sup>1</sup>	11.9 ± 2.60 <sup>1</sup>
	P	359.0 ± 50.5	1.2 ± 0.16	+	628.6 ± 16.6 <sup>2</sup>	2.1 ± 0.05 <sup>2</sup>
	D	440.4 ± 52.8 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.17 <sup>b</sup>	+	701.7 ± 66.4 <sup>b,2</sup>	2.3 ± 0.22 <sup>b,2</sup>
dieta 22.E	C	280.9 ± 57.8 <sup>2</sup>	0.9 ± 0.19 <sup>2</sup>	+	5018.9 ± 554.0 <sup>1</sup>	16.7 ± 1.8 <sup>1</sup>
	P	418.0 ± 47 <sup>1,2</sup>	1.4 ± 0.15 <sup>1,2</sup>	+	967.2 ± 162.5 <sup>2</sup>	3.2 ± 0.54 <sup>2</sup>
	D	546.3 ± 40.8 <sup>b,1</sup>	1.8 ± 0.13 <sup>b,1</sup>	+	749.8 ± 23.3 <sup>b,2</sup>	2.5 ± 0.07 <sup>b,2</sup>

Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M. d'un mínim de 8 determinacions per a cada condició. Les diferències significatives (p<0.05) entre les dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives entre els diferents segments intestinals es representen amb diferents números. Les diferències significatives entre la fase de creixement i la de fred per a una dieta i segment intestinal es representa amb una creu.

Les figures 58 a 63 mostren els influxes de nutrients i la seva normalització en unitats de concentració en les VMAs obtingudes en les diferents condicions experimentals. En aquest bloc, malgrat presentar-se la doble representació, s'ha optat per comentar únicament les gràfiques normalitzades degut a les importants diferències trobades en el volum vesicular entre les preparacions obtingudes (veure taula 40).

Després de 75 dies de creixement, la concentració intravesicular d'aminoàcids essencials (Fig. 59) va mostrar una disminució gradual des dels cecs pilòrics fins a

l'intestí distal per a les 4 condicions experimentals testades; no trobant-se diferències importants en la capacitat total d'absorció entre els 4 grups. Després del període de fred les captacions dels nutrients estudiats van igualar-se entre els 3 tipus de suspensions vesiculars, excepte per la L-lisina dels peixos alimentats amb la dieta 14, on el patró s'invertí, incrementant la capacitat d'absorció a mesura que s'avançava al tub intestinal, i de la L-fenilalanina per a els animals 22, on el patró es mantingué. El fred va disminuir la capacitat de captació de L-leucina, essent aquesta disminució significativa en els cecs pilòrics. La capacitat total de captació de L-lisina i L-fenilalanina en sotmetre els animals a una situació prolongada de fred es mantingué en termes generals, malgrat variar-se el patró de regionalització.

La concentració intravesicular d'aminoàcids no essencials es mostra a la Fig. 61. Després del període de creixement, la dieta només va modificar els influxes a les VMAs d'intestí distal per a L-glutàmic, que foren més alts en els animals 22. L'exposició al fred incrementà les capacitats de captació en alguns per a la L-alanina (cecs pilòrics 22) i el L-glutàmic (cecs pilòrics 22 i 22.E; intestí distal 22.E) i minvà la captació de L-alanina a les VMAs proximals de les orades 22. En les orades sotmeses a 35 dies de fred, la captació de L-prolina disminuï significativament en les VMAs distals de tots els grups i les VMAs proximals dels grups no sotmesos a exercici.

Després del període de creixement, la capacitat d'absorció de D-glucosa (Fig. 63) augmentà gradualment des dels cecs pilòrics fins a l'intestí distal per a les 4 condicions testades, no trobant-se diferències entre les condicions experimentals ni pels cecs pilòrics ni per l'intestí proximal; el tractament diferencial, però, incrementà la capacitat de captació en les VMAs distals dels peixos 22E *versus* els 14, 14E i 22. Després de 40 dies de fred, la capacitat de captació a les vesícules incrementà als cecs pilòrics per a les 4 condicions experimentals testades i disminuï a les suspensions vesiculars obtingudes d'intestí proximal i intestí distal, mostrant un patró típic d'una situació de dejuni.

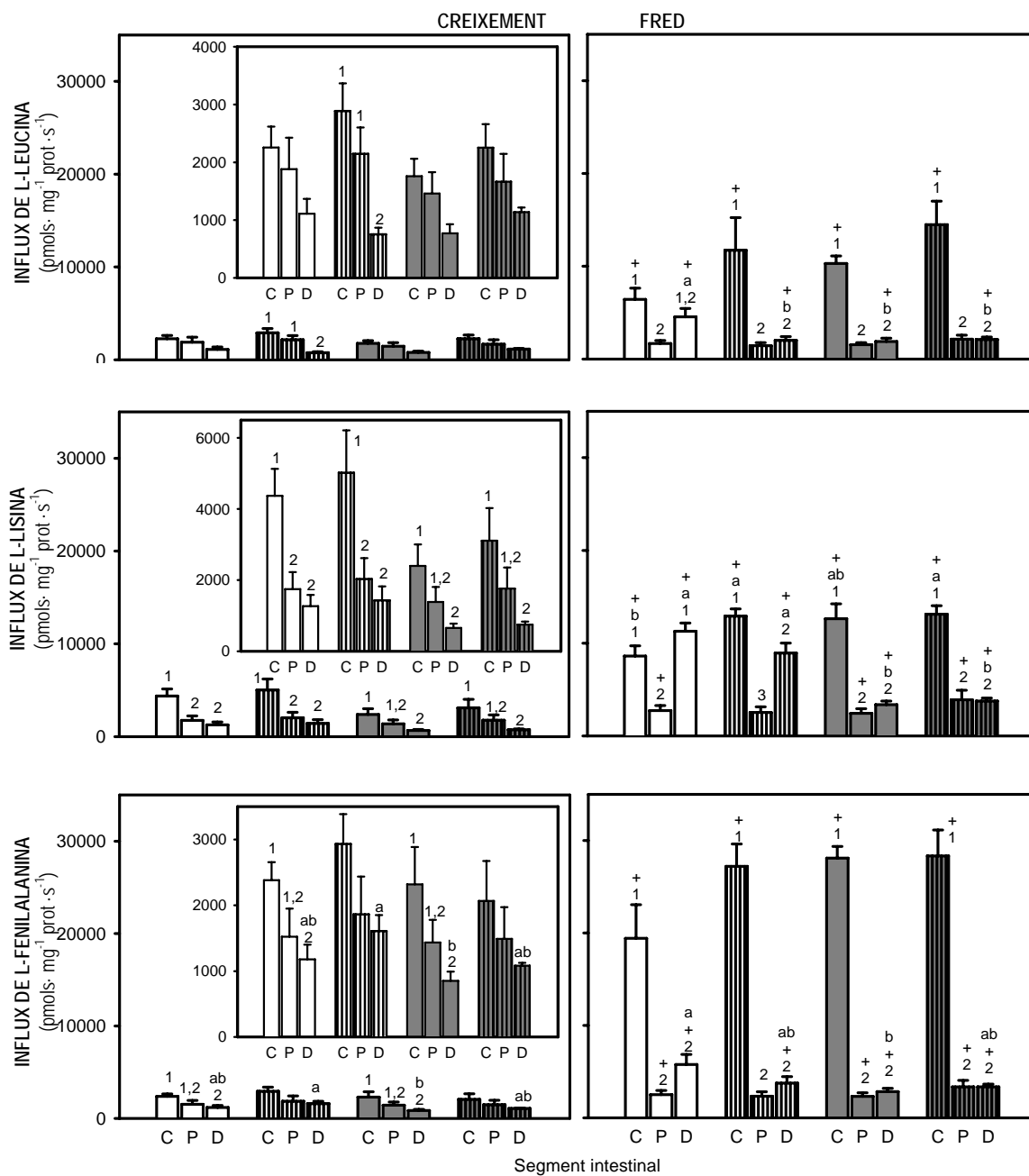


Figura 58. Captació d'aminoàcids essencials en VMAs obtingudes de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Dieta 14 (barres blanques); dieta 22 (barres grises); animals sotmesos a un exercici moderat (línies verticals). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Les diferències significatives entre creixement i fred s'assenyalen amb una creu.

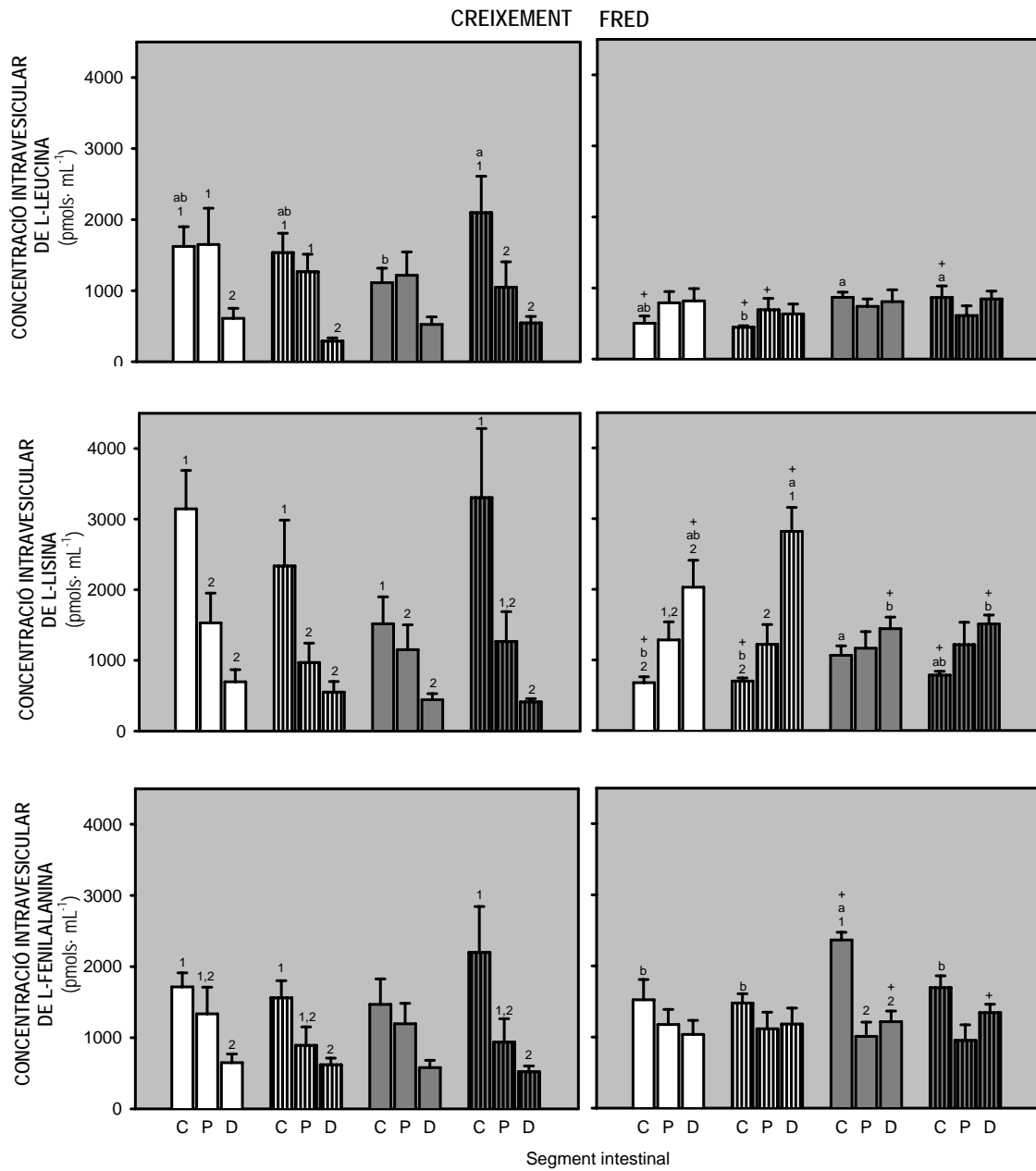


Figura 59. Concentració d'aminoàcids essencials als 5 s d'incubació en VMAs de cecs pilòrics (C), intesti proximal (P) i distal (D) d'orada. Dieta 14 (barres blanques); dieta 22 (barres grises); animals sotmesos a un exercici moderat (línies verticals). Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en les concentracions d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la concentració entre segments intestinals es representen amb números. Les diferències significatives entre creixement i fred s'assenyalen amb una creu.

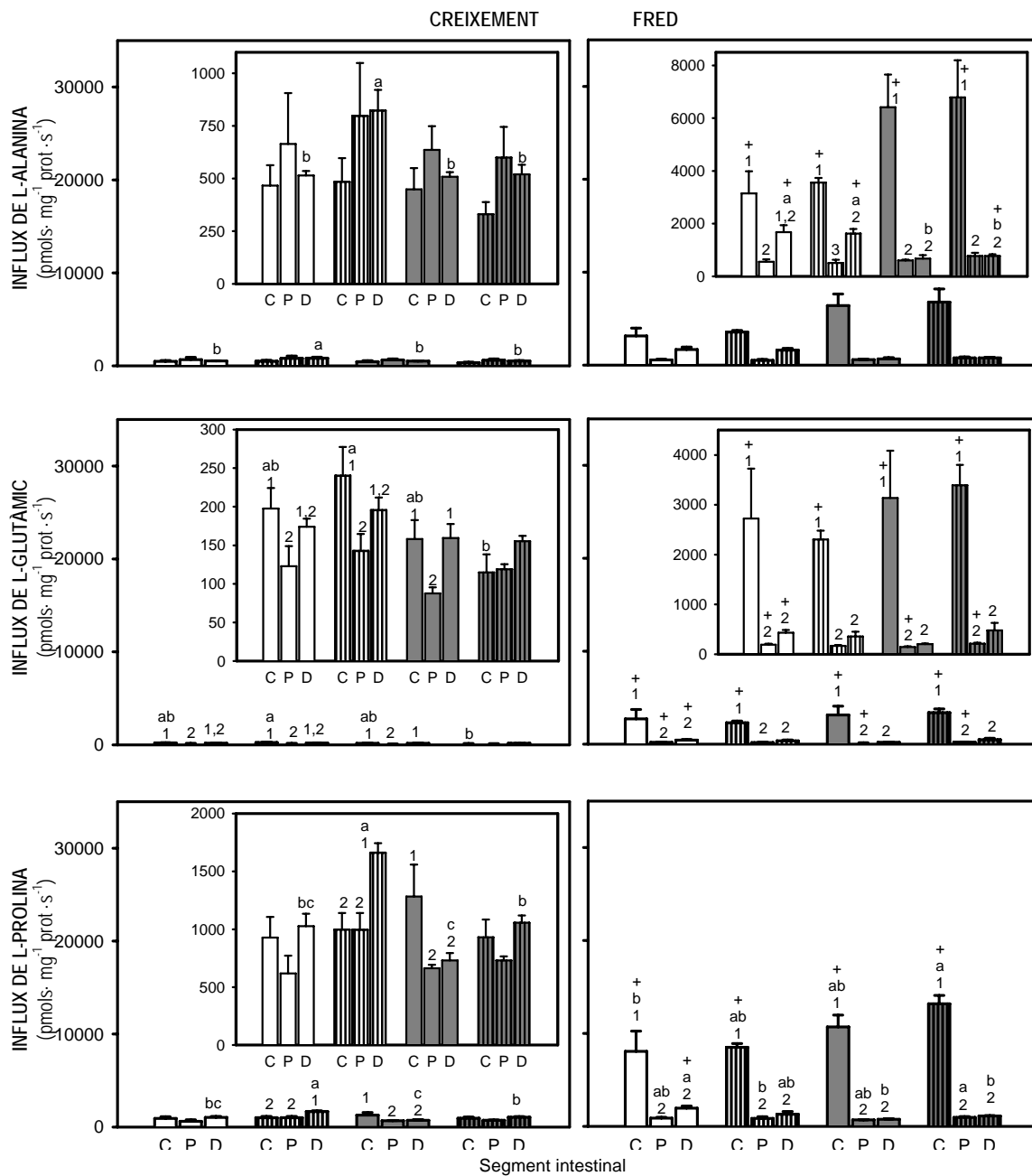


Figura 60. Captació d'aminoàcids no essencials en VMAs obtingudes de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Dieta 14 (barres blanques); dieta 22 (barres grises); animals sotmesos a un exercici moderat (línies verticals). Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxes d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Les diferències significatives entre creixement i fred s'assenyalen amb una creu.

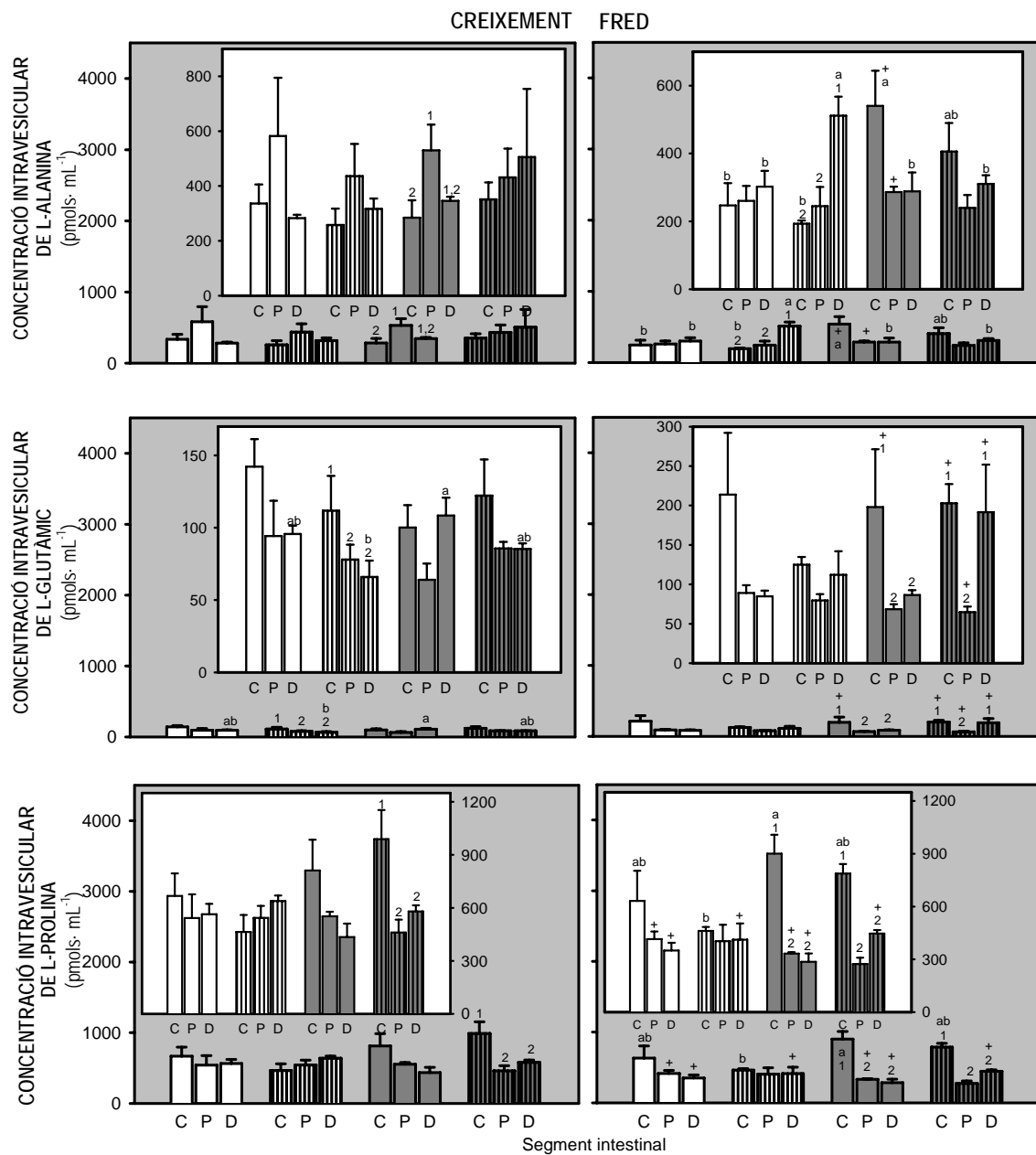


Figura 61. Concentració intravesicular d'aminoàcids no essencials als 5 s d'incubació en VMAs obtingudes de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Els resultats es presenten com la mitjana  $\pm$  S.E.M de 8 determinacions. Dieta 14 (barres blanques); dieta 22 (barres grises); animals sotmesos a un exercici moderat (línies verticals). Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en les concentracions d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la concentració entre segments intestinals es representen amb números. Les diferències significatives entre creixement i fred s'assenyalen amb una creu.

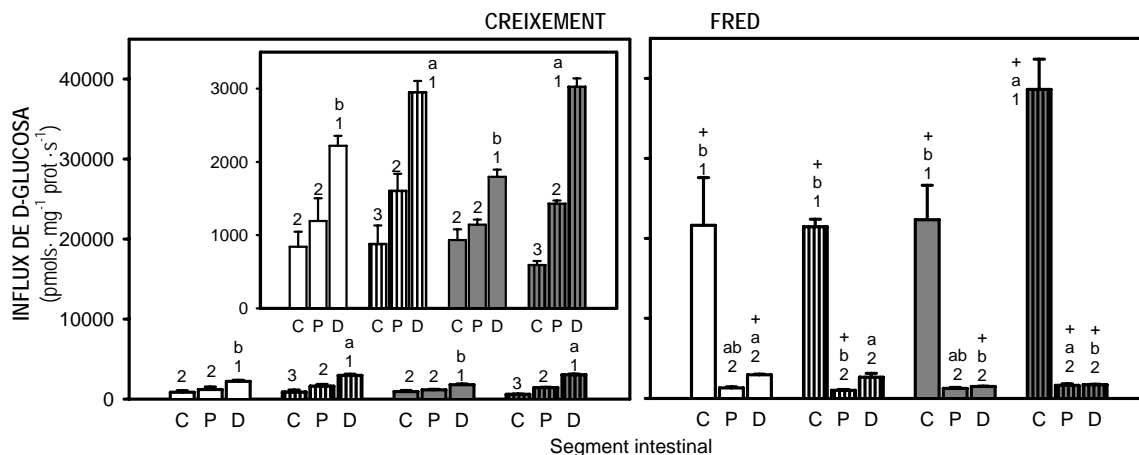


Figura 62. Captació de D-glucosa a VMAs obtingudes de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Dieta 14 (barres blanques); dieta 22 (barres grises); animals sotmesos a un exercici moderat (línies verticals). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en els fluxos d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la captació entre segments intestinals es representen amb números. Les diferències significatives entre creixement i fred s'assenyalen amb una creu.

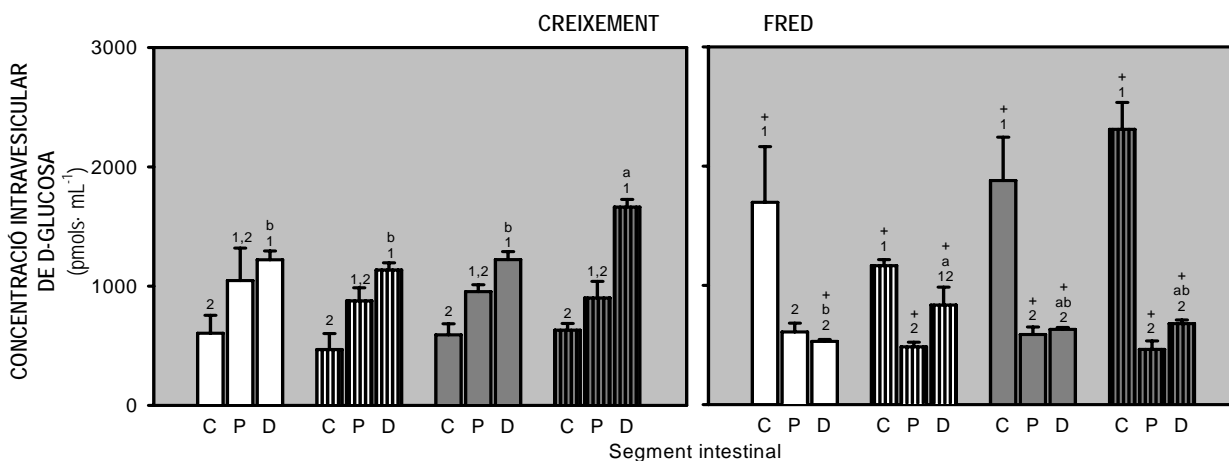


Figura 63. Concentració intravesicular de D-glucosa als 5 s d'incubació en VMAs obtingudes de cecs pilòrics (C), intestí proximal (P) i intestí distal (D) d'orada. Dieta 14 (barres blanques); dieta 22 (barres grises); animals sotmesos a un exercici moderat (línies verticals). Els resultats es presenten com la mitjana ± S.E.M de 8 determinacions. Les diferències significatives ( $p < 0.05$ ) en les concentracions d'aminoàcids entre dietes es representen amb diferents lletres. Les diferències significatives en la concentració entre segments intestinals es representen amb números. Les diferències significatives entre creixement i fred s'assenyalen amb una creu.



## DISCUSSIÓ

Diversos treballs en peixos han suggerit que algunes espècies tenen habilitat per modular les seves capacitats de transport d'aminoàcids i sucres en resposta al contingut de proteïnes i carbohidrats de la dieta (Buddington *et al.*, 1997; Ferraris i Diamond, 1989). Malgrat l'existència de pocs estudis que abordin aquestes possibles modulacions en resposta a la quantitat de lípids administrada, dels lípids depèn la integritat de les membranes cel·lulars (Corraze, 2002; Sargent *et al.*, 1999), i una variació en la ingesta d'aquests compostos podria modificar els fenòmens d'absorció per alteració de les propietats de la membrana o per una acumulació de lípids a l'enteròcit, com ja va descriure Houpe *et al.*, 1997 en silur. En les orades estudiades en el present treball, però, l'administració de dietes amb diferent percentatge de lípids no va afectar les capacitats de captació de nutrients, suggerint la no afectació del nombre de transportadors en les condicions experimentals testades.

Estudis a diferents nivells han permès establir l'àmplia simptomatologia relacionada amb el síndrome d'hivern (Bovo *et al.*, 1995; Tort *et al.*, 1998; Gallardo *et al.*, 2003 entre altres). Però pocs treballs han aportat informació sobre les alteracions funcionals que pateixen els animals (Galeotti *et al.*, 1999; Sala-Rabanal *et al.*, 2003; Ibarz *et al.*, 2004; Ibarz *et al.*, 2005), essent nul·la, en el nostre coneixement, la informació referent a la afectació de les capacitats digestiva i absorptiva malgrat l'existència de treballs on es descriuen alteracions histològiques a l'intestí (Bovo *et al.*, 1995; Contessi *et al.*, 2000; Tort *et al.*, 1998; Gallardo *et al.*, 2003), així com, un rebuig de l'aliment quan l'orada es troba per sota de 12°C (Sala-Rabanal *et al.*, 2003; Ibarz *et al.*, 2005; presents dades). Aquest rebuig del pinso podria estar relacionat amb alteracions en l'alliberació postprandial d'enzims digestius d'origen pancreàtic al lumen del tub digestiu, o bé amb una afectació de la capacitat de captació de nutrients al llarg del tracte intestinal. El dejuni voluntari podria ser també degut a una combinació d'aquests processos digestius, que alhora podrien relacionar-se amb canvis en la histologia intestinal per efecte de les baixes temperatures. En aquest sentit, els treballs de Golovanova *et al.*, (1992) van descriure una disminució en les taxes d'absorció de nutrients en peixos d'aigua dolça sotmesos a dejuni. Malgrat l'interès de l'estudi dels enzims digestius, aquests no s'analitzaren degut al rebuig de l'aliment per part dels animals, que únicament permetria l'estudi postprandial de les activitats digestives després de realitzar una ingesta forçada, que no correspondria a la situació fisiològica real dels moments.

Tot i que l'administració de dietes amb diferent percentatge de lípids durant 75 dies no modificà el tamany de les vesícules obtingudes de manera important, el descens de la temperatura sí que n'alterà les propietats. L'increment de volum de les vesícules obtingudes en els animals exposats al fred, indica una alteració en les propietats de la membrana, ja que les característiques de les VMAs depenen d'aquestes propietats (Argiles i Soriano, 1990). Així, l'increment dels fluxes d'aminoàcids a VMAs de cecs pilòrics després de l'exposició dels animals a 35 dies de fred podria ser indicador d'un augment de la capacitat de captació de nutrients, com a resposta a la manca de nutrients deguda a la situació de dejú. Però la normalització a concentració intravesicular de nutrients, suggereix una modificació en la quantitat de proteïna per unitat de teixit en els animals sotmesos a fred, associada a alteracions en la membrana. D'altra banda, la possible regulació a l'alça dels transportadors de glucosa, als cecs pilòrics en les orades exposades al fred, pot relacionar-se amb la importància de l'absorció d'aquest segment establerta en algunes espècies de peixos carnívors (Buddington i Diamond, 1987; Bakke-McKellep *et al.*, 2000) i podria actuar com a mecanisme de compensació de captació de nutrients, que seria beneficiosa en el moment de recuperació de la temperatura i la conseqüent realimentació.

D'altra banda, l'exercici no afectà de manera significativa els paràmetres digestius estudiats en els dos mostrejos realitzats. Altres paràmetres analitzats, com per exemple la grassa perivisceral, les activitats enzimàtiques hepàtiques, o la composició del fetge no mostraren tampoc variacions significatives en incrementar l'activitat dels animals (Villanueva *et al.*, 2005), encara que aquests paràmetres sí que es van veure modificats durant la fase de creixement en funció de la dieta administrada. Així, la grassa perivisceral i l'activitat lipoproteïna lipasa en les orades engreixades amb la dieta 22 fou significativament superior, encara que el fred homogeneïtzà aquests paràmetres després de 35 dies a 10 °C.

Els resultats obtinguts indiquen que l'administració de dietes amb diferent contingut de lípids (14 o 22%) no modifica les capacitats d'absorció de nutrients després de 75 dies de creixement. El fred modifica les capacitats de captació en les 4 condicions experimentals testades, bé per una regulació del nombre de transportadors, bé per la modificació de les propietats de la membrana. Malgrat aquestes modificacions, els peixos són capaços de transportar nutrients a través de la membrana apical de l'enteròcit, indicant que el rebuig de l'aliment a baixes temperatures no està relacionat amb problemes absortius a nivell intestinal. Sotmetre els animals a un exercici moderat

no millora els paràmetres estudiats ni estableix una situació metabòlica més favorable per a la realimentació.

En resum, ni l'administració de dietes amb diferent contingut de lípids ni l'exercici moderat fan que els animals assoleixin una situació digestiva diferencial després de 75 dies de creixement. La resposta dels animals al fred no presenta variacions significatives després de 35 dies de baixes temperatures, suggerint que les dietes comercials de preparació a l'hivern testades no són les adequades per combatre el síndrome d'hivern.



## **5. CONCLUSIONS**



1. La tècnica basada en la precipitació selectiva per clorur de magnesi és adequada per a la obtenció de vesícules de membrana apical d'enteròcits de cecs pilòrics, intestí proximal i intestí distal d'orada i truita, purificades i funcionals, que permeten l'estudi de la regionalització de la capacitat d'absorció d'aminoàcids, glucosa i linolèic.
2. L'increment del percentatge de substitució en la dieta d'orada i truita de la farina de peix (de 20 a 33 i de 35 a 47, respectivament) per una barreja de fonts proteiques vegetals (blat, pèsol i soja) durant un període de creixement de 12 setmanes modifica, en orada, el perfil postingesta de l'activitat proteasa, i incrementa la capacitat d'absorció de nutrients a la zona intestinal distal; en truita, no produeix canvis en l'activitat enzimàtica o la capacitat d'absorció d'aminoàcids i glucosa en els temps postprandials estudiats.
3. La modificació de la relació aminoàcids essencials/aminoàcids no essencials en la dieta (1.10 i 1.47 en orada i truita, respectivament) no modifica significativament els processos digestius en les espècies estudiades.
4. La substitució en la dieta de la orada de fins a un 75% de la farina de peix per una barreja de fonts proteiques vegetals (blat, blat de moro, pèsol, colza i tramussos) durant 12 setmanes provoca una disminució de l'activitat proteolítica total per la inhibició selectiva de les bandes proteolítiques actives i una reducció de la capacitat d'absorció de nutrients a la zona proximal de l'intestí. L'increment de la longitud intestinal relativa, la disminució de la velocitat de trànsit intestinal, l'increment d'algunes activitats tipus tripsina i l'augment de la capacitat d'absorció de nutrients a l'intestí distal, permeten taxes de creixement de només un 9% aproximadament inferiors a les del grup control.
5. En la truita, la substitució en la dieta de fins a un 75% de la farina de peix per una barreja de matèries primeres d'origen vegetal (blat, blat de moro, pèsol, colza i tramussos) durant 12 setmanes deprimeix el pic d'alliberació postingesta de proteases alcalines degut a una afectació de totes les activitats detectades als zimogrames. L'absorció de nutrients es retarda a zones més distals de l'intestí i incrementa la longitud intestinal relativa, permetent bones taxes de creixement (-8% *versus* el grup alimentat amb la dieta farina de peix).

6. La substitució total de la farina de peix en la dieta d'orada i truita pels ingredients vegetals abans esmentats, afecta negativament l'activitat proteolítica total i disminueix la capacitat de captació dels nutrients estudiats a vesícules de membrana apical d'enteròcit. En experiències de creixement de 12 setmanes, el reemplaçament total disminueix les taxes de creixement al voltant d'un 20% en ambdues espècies.
7. La substitució simultània en dietes per a orada del 75% de la farina de peix (blat de moro, soja i blat) i un 33, 66 o 100% d'oli de peix (colza, llinosa i palma) durant 10 setmanes, deprimeix l'activitat proteasa alcalina en incloure més d'un 66% d'olis d'origen vegetal per una afectació de les bandes proteolítiques actives i provoca l'acumulació de lípids als enteròcits. El reemplaçament de l'oli de peix disminueix també la capacitat total d'absorció de D-glucosa i linolèic però no afecta el patró de captació d'aminoàcids. Els resultats obtinguts indiquen que es pot incloure en el pinso fins a un 66% d'olis d'origen vegetal quan s'ha reemplaçat un 75% de farina de peix sense perjudicar el creixement.
8. La substitució total de l'oli de peix ( per olis de colza, llinosa i palma) en la dieta d'orada conjuntament amb la substitució d'alts percentatges de farina de peix (75 o 50%; blat de moro, soja i blat o blat de moro i blat, respectivament) durant 10 setmanes provoca en les orades 50 *versus* les 75 l'increment de l'activitat de les tripsines i quimotripsines d'origen pancreàtic i causa canvis en el patró d'absorció intestinal de nutrients, obtinguent-se creixements un 13% superiors en utilitzar la dieta amb major contingut de farina de peix. Per tant, el reemplaçament total de l'oli de peix és factible substituint fins a un 50% de la proteïna de la dieta per les fonts proteiques vegetals testades.
9. Les experiències realitzades indiquen que la substitució de la farina i l'oli de peix per matèries primeres d'origen vegetal afecta els processos digestius i, en darrera instància, el creixement dels animals cultivats en major o menor grau depenent de les barreges d'ingredients vegetals emprades, així com dels tractaments que hagin rebut les matèries primeres i el producte final per minimitzar els efectes dels factors antinutricionals i ajustar-se als requeriments nutritius de les espècies a alimentar.



10. L'ús de dietes comercials amb diferent quantitat de lípids (14 i 22%) com a pinsos de preparació a l'hivern per orades cultivades no modifica la capacitat d'absorció dels nutrients estudiats després de 75 dies de creixement. L'exposició al fred durant 40 dies disminueix la regionalització en l'absorció de nutrients però no mostra diferències significatives importants entre els tractaments. Les orades mostren capacitat per a absorbir l'aliment, descartant-se que aquesta sigui la causa o un dels motius de que rebutgin l'aliment quan la temperatura disminueix per sota dels 12°C.
  
11. Sotmetre les orades a un exercici moderat durant l'administració de dietes amb diferent contingut de lípids no provoca canvis en la capacitat d'absorció de nutrients entre els animals estudiats després de 75 dies de creixement o després d'una exposició llarga al fred.



## **6. BIBLIOGRAFIA**



- Adibi S A.** The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology* 1997; (113): 332-340.
- Ahearn G A, Storelli C.** Use of membrane vesicle techniques to characterize nutrient transport processes of the teleost gastrointestinal tract. *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 1994.
- Alarcon F J, Diaz M, Moyano F J, Abellan E.** Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 1998; (19): 257-267.
- Alarcon F J, Moyano F J, Diaz M.** Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquatic Living Resources* 1999; (12): 233-238.
- Alarcon F J, Moyano F J, Diaz M.** Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2002; (82): 697-704.
- Argiles J M, Soriano F J.** Intestinal amino-acid-transport - an overview. *International Journal of Biochemistry* 1990; (22): 931-937.
- Arzel J, Lopez F X M, Metailler R, Stephan G, Viau M, Gandemer G, Guillaume J.** Effect of dietary-lipid on growth-performance and body-composition of brown trout (*Salmo-Trutta*) reared in seawater. *Aquaculture* 1994; (123): 361-375.
- Baeverfjord G, Krogdahl A.** Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar L*, distal intestine: A comparison with the intestines of fasted fish. 158. *Journal of Fish Diseases* 1996; (19): 375-387.
- Bakke-Mckellep A M, Nordrum S, Krogdahl A, Buddington R K.** Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Fish Physiology and Biochemistry* 2000; (22): 33-44.
- Bangoula D, Parent J P, Vellas F.** Nutritive-value of white lupin (*Lupinus-Albus Var Lutop*) fed to rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). Effects of extrusion-cooking. *Reproduction Nutrition Development* 1993; (33): 325-334.
- Barlow S.** Fishmeal and oil: sustainable feed ingredients for aquafeeds. *Global Aquaculture Advocate* 2000; (4): 85-88.
- Bell J G, Tocher D R, Macdonald F M, Sargent J R.** Effects of dietary borage oil [enriched in gamma-linolenic acid, 18/3(N-6)] or marine fish-oil [enriched in eicosapentaenoic acid, 20/5(N-3)] on growth, mortalities, liver histopathology and lipid-composition of juvenile turbot (*Scophthalmus-maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 1995; (14): 373-383.
- Bell J G, McEvoy J, Tocher D R, McGhee F, Campbell P J, Sargent J R.** Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition* 2001; (131): 1535-1543.

- Bell J G, Henderson R J, Tocher D R, McGhee F, Dick J R, Porter A, Smullen R P, Sargent J R.** Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition* 2002; (132): 222-230.
- Bell J G, McGhee F, Campbell P J, Sargent J R.** Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil "wash out". *Aquaculture* 2003; (218): 515-528.
- Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Bermejo-Nogales A, Calderach-Gines JA, Kaushik SJ, Pérez J.** High fishmeal and fishoil replacement in gilthead sea bream aquafeeds. Growth performance and endocrine status. 2006. XII International Symposium of Fish Nutrition and Feeding. Biarritz. Pàg. 276.
- Berner W, Kinne R, Murer H.** Phosphate transport into brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biochemistry Journal* 1976 (160): 467-474.
- Bimbo A P.** Production of fish oil. In: fish oils in nutrition. (Ed.M.E.Stansby Ed.). New York: 1990; 141-180.
- Bishop C, Odense P H.** Morphology of digestive tract of cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 1966; (23): 1607-&.
- Boge G, Rigal A, Peres G.** Rates of invivo intestinal-absorption of glycine and glycyglycine by rainbow-trout (*Salmo-Gairdneri R*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1981; (69): 455-459.
- Bouraoui L, Sánchez-Gurmaches J, Cruz L, Gutiérrez J, Kaushik S, Pérez J, Navarro I.** Effect of fishmeal and fishoil replacement on lipid metabolism of gilthead sea bream. 2006. XII International Symposium of Fish Nutrition and Feeding. Biarritz. Pàg. 64.
- Bovo G, Borghesan F, Comuzzi M, Ceschia G, Giorgiotti G.** "Winter disease" in orata di allevamento: osservazioni preliminari. *Boll. Soc. Italiana Patol.* 1995; (17): 2-11.
- Bradford M M.** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; (72): 248-254.
- Broad WJ, Revkin A.C.** Has the sea given up its bounty? *The New York Times* 29 Juliol, D-1-D-3. 2003. Newspaper
- Brudeseth B.** Hydrolisis of carbohydrates in the intestinal mucosa of Atlantic Salmon and halibut. 1996. University of Oslo. Norway. Thesis/Dissertation
- Buddington R K, Chen J W, Diamond J.** Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *Journal of Physiology-London* 1987; (393): 261-281.
- Buddington R K, Hilton J W.** Intestinal adaptations of rainbow-trout to changes in dietary carbohydrate. *American Journal of Physiology* 1987; (253): G489-G496.

- Buddington R K, Diamond J M.** Pyloric ceca of fish - a new absorptive organ. *American Journal of Physiology* 1987; (252): G65-G76.
- Buddington R K, Chen J W, Diamond J M.** Dietary-regulation of intestinal brush-border sugar and amino-acid-transport in carnivores. *American Journal of Physiology* 1991; (261): R793-R801.
- Buddington R K, Krogdahl A, BakkeMcKellep A M.** The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica* 1997; (161): 67-80.
- Bueno M, Hernando MD, Peñuela N, Fernández-Alba A.** Control de la calidad ambiental y de producción en piscifactorías: aplicación de muestreadores para la detección de residuos orgánicos e inorgánicos. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 90.
- Burel C, Boujard T, Corraze G, Kaushik S J, Boeuf G, Mol K A, Van der Geyten S, Kuhn E R.** Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture* 1998; (163): 325-345.
- Burel C, Boujard T, Kaushik S J, Boeuf G, Van der Geyten S, Mol K A, Kuhn E R, Quinsac A, Krouti M, Ribailier D.** Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 2000; (188): 363-382.
- Caballero M J, Lopez-Calero G, Socorro J, Roo F J, Izquierdo M S, Fernandez A J.** Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 1999; (179): 277-290.
- Caballero M J, Obach A, Rosenlund G, Montero D, Gisvold M, Izquierdo M S.** Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 2002; (214): 253-271.
- Caballero M J, Izquierdo M S, Kjorsvik E, Montero D, Socorro J, Fernandez A J, Rosenlund G.** Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 2003; (225): 325-340.
- Caballero M J, Izquierdo M S, Kjorsvik E, Fernandez A J, Rosenlund G.** Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 2004; (27): 531-541.
- Cahu C L, Infante J L Z.** Effect of the molecular-form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae - response of pancreatic-enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiology and Biochemistry* 1995; (14): 209-214.
- Cañalvete JP.** Opciones del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) para diversificar la acuicultura marina. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 340.

- Carter C G, Bransden M P, Lewis T E, Nichols P D.** Potential of thraustochytrids to partially replace fish oil in Atlantic salmon feeds. *Marine Biotechnology* 2003; (5): 480-492.
- Casirola D M, Vinnakota R R, Ferraris R P.** Intestinal-absorption of water-soluble vitamins in channel catfish (*Ictalurus-Punctatus*). *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 1995; (38): R490-R496.
- Colas B, Maroux S.** Simultaneous isolation of brush-border and basolateral membrane from rabbit enterocytes - presence of brush-border hydrolases in the basolateral membrane of rabbit enterocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980; (600): 406-420.
- Collie N L, Ferraris R P.** Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*. (Ed.Hochachka and Mommsen). Elsevier Sciences, 1995; 221-239.
- Contessi B, Votpatti D, Gusmani L, Bovo G, Maltese C, Mutinelli F, Borghesan F, Gennari L, Sarli G, Galeotti M.** Winter disease in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Immunological aspects. *Boll. Soc. Ital. Patol Ittica*. 2000 (12): 2-16.
- Corraze G.** Nutrición Lipídica. In: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. (Ed.I.N.R.A.). 2002; 147-169.
- D'Mello F J P.** Antigenic proteins. In: *Toxic substances in crop plants*. (Eds.D'Mello FJP, Duffus CM, Duffus JP). Cambridge: 1991; 108-125.
- Dabrowski K, Kozak B.** Use of fish-meal and soybean-meal as a protein-source in the diet of grass carp fry. *Aquaculture* 1979; (18): 107-114.
- Dabrowski D, Kaushik SJ, Fauconneau B.** Rearing sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt) larvae I. Feeding trial. *Aquaculture* 1985 (47): 185-192.
- Dabrowski K, Poczyczynski P, Kock G, Berger B.** 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 invivo test for exocrine pancreatic-secretio. 162. *Aquaculture* 1989; (77): 29-49.
- Davies S J, Morris P C.** Influence of multiple amino acid supplementation on the performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed soya based diets. *Aquaculture Research* 1997; (28): 65-74.
- Davis P S.** 2 Occurrences of the gilthead, *Sparus-Aurata Linnaeus* 1758, on the coast of Northumberland, England. *Journal of Fish Biology* 1988; (33): 951.
- de Francesco M, Parisi G, Medale F, Lupi P, Kaushik S J, Poli B M.** Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2004; (236): 413-429.
- De Sostoa A.** La fauna íctica dels Països Catalans. *Història Natural dels Països Catalans*. Barcelona 1990.



- de la Higuera M, Garcia-Gallego M, Sanz A, Cardenete G, Suarez M D, Moyano F J.** Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein-source in feeding of rainbow-trout (*Salmo-Gairdneri*). *Aquaculture* 1988; (71): 37-50.
- del Castillo J R, Robinson J W L.** The simultaneous preparation of basolateral and brush-border membrane-vesicles from guinea-pig intestinal epithelium, and the determination of the orientation of the basolateral vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; (688): 45-56.
- Dias J, Alvarez M J, Arzel J, Corraze G, Diez A, Bautista J M, Kaushik S J.** Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 2005; (142): 19-31.
- Dold PL, Fleit E, Han J, Coop JB.** Assay for determination of alpha-amylase activity on activated sludge mixed bacterial communities. *Environmental Technology* [16], 181-188. 1995.
- Dosanjh B S, Higgs D A, McKenzie D J, Randall D J, Eales J G, Rowshandeli N, Rowshandeli M, Deacon G.** Influence of dietary blends of menhaden oil and canola oil on growth, muscle lipid composition, and thyroidal status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water. *Fish Physiology and Biochemistry* 1998; (19): 123-134.
- Duffus C M, Duffus J P.** Phytates. In: *Toxic substances in crop plants*. (Eds.D'Mello FJP, Duffus CM, Duffus JP). Cambridge: 1991; 1-21.
- Duncan A J.** Glucosinolates. In: *Toxic substances in crop plants*. (Eds.D'Mello FJP, Duffus CM, Duffus JP). Cambridge: 1991; 126-147.
- EI-Saidy D M S D, Gaber M M A.** Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) diets. *Aquaculture Research* 2003; (34): 1119-1127.
- EI-Sayed A F M, Nmartinez I, Moyano F J.** Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using in vitro assays. *Aquaculture International* 2000; (8): 403-415.
- Elbal M T, Agulleiro B.** A histochemical and ultrastructural-study of the gut of *Sparus auratus* (*Teleostei*). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1986; (18): 335-347.
- Erfanullah, Jafri A K.** Evaluation of digestibility coefficients of some carbohydrate-rich feedstuffs for Indian major carp fingerlings. *Aquaculture Research* 1998; (29): 511-519.
- FAO Fisheries Department.** *The State of World Fisheries and Aquaculture*. 1998. Rome, Italy.
- FAO Fisheries Department.** *The State of World Fisheries and Aquaculture*. 2000. Rome, Italy.
- FAO Fisheries Department.** *The State of World Fisheries and Aquaculture*. 2002. Rome, Italy.

- FAO Fisheries Department.** The State of World Fisheries and Aquaculture. 2004. Rome, Italy.
- Fernández Aldana JM.** Diversificació de la acuicultura. La corvina. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 546.
- Ferraris R P, Ahearn G A.** Intestinal glucose-transport in carnivorous and herbivorous marine fishes. *Journal of Comparative Physiology* 1983; (152): 79-90.
- Ferraris R P, Ahearn G A.** Sugar and amino-acid-transport in fish intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1984; (77): 397-413.
- Ferraris R P, Diamond J M.** Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Annual Review of Physiology* 1989; (51): 125-141.
- Ferraris RP.** Glucose and alanine transport in herbivorous and carnivorous marine fish intestines. 1992. University of Hawaii. Honolulu. Thesis/Dissertation
- Figueiredo-Silva A, Rocha E, Dias J, Silva P, Rema P, Gomes E, Valente L M P.** Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 2005; (11): 147-155.
- Fish B C, Thompson L U.** Lectin tannin interactions and their influence on pancreatic amylase activity and starch digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991; (39): 727-731.
- Flos R, Tort L, Torres P.** The development of better conditions and handling procedures for intensive cultures. The incidence of stress. *Mediterranean Aquaculture*, 196-206, 1990; Ellis Horwood Ltd, Chichester, Regne Unit.
- Fonseca-Madrigal J, Karalazos V, Campbell P J, Bell J G, Tocher D R.** Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition* 2005; (11): 241-250.
- Forster I.** Use of Soybean Meal in the Diets of Non-Salmonid Marine Fish. 2003.
- Francis G, Makkar H P S, Becker K.** Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 2001; (199): 197-227.
- Fundación Alfonso Martín Escudero.** Acuicultura Marina Mediterránea. 2005.
- Galeotti M, Contessi B, Volpatti D, Gusmani L, Maltese C, Mutinelli F, Borghesan F, Gennari L, Bovo G.** Winter disease in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*): ethiopathogenical and immunological aspects. 9<sup>th</sup> International Conference of the European of Fish Pathologists: Diseases of Fish and Shellfish, 1999.
- Gallagher M L.** The use of soybean-meal as a replacement for fish-meal in diets for hybrid striped bass (*Morone-Saxatilis X Morone-Chrysops*). *Aquaculture* 1994; (126): 119-127.

- Gallardo M A, Sala-Rabanal M, Ibarz A, Padros F, Blasco J, Fernandez-Borras J, Sanchez J.** Functional alterations associated with "winter syndrome" in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 2003; (223): 15-27.
- Garcia-Carreno F L, Dimes L E, Haard N F.** Substrate gel-electrophoresis for composition and molecular-weight of proteinases of proteinaceous proteinase-inhibitors. *Analytical Biochemistry* 1993; (214): 65-69.
- García- Aliaga V, Belmonte Ríos A, Gutiérrez Ortega JM, Parán Rex A.** Efecto de los vertidos de una granja marina sobre la comunidad de poliquetos de la infauna. 2005. XCNA, Gandía. Pàg. 98.
- Garriga C, Moreto M, Planas J M.** Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes. *Journal of Physiology-London* 1999; (514): 189-199.
- Ghioni C, Tocher D R, Bell M V, Dick J R, Sargent J R.** Low C-18 to C-20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18 : 4(n-3), to eicosapentaenoic acid, 20 : 5(n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1999; (1437): 170-181.
- Giri S S, Sahoo S K, Sahu A K, Mukhopadhyay P K.** Growth, feed utilization and carcass composition of catfish *Clarias batrachus* (Linn.) fingerlings fed on dried fish and chicken viscera incorporated diets. *Aquaculture Research* 2000; (31): 767-771.
- Glencross B.** Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. 2001. DWFA.
- Glencross B, Hawkins W, Curnow J.** Evaluation of canola oils as alternative lipid resources in diets for juvenile red seabream, *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutrition* 2003; (9): 305-315.
- Golovanova I L.** The specifics of carbohydrate transport in the freshwater fish intestine. *fiziol Zh SSSR Im I M Schenova* 1992; (78): 151-157.
- Gomes E F, Corraze G, Kaushik S.** 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* 1993; (113): 339-353.
- Gomes E F, Rema P, Kaushik S J.** Replacement of fish-meal by plant-proteins in the diet of rainbow-trout (*Oncorhynchus-mykiss*) - digestibility and growth-performance. *Aquaculture* 1995; (130): 177-186.
- Gomez-Requeni P, Mingarro M, Kirchner S, Calduch-Giner J A, Medale F, Corraze G, Panserat S, Martin S A M, Houlihan D F, Kaushik S J, Perez-Sanchez J.** Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 2003; (220): 749-767.

**Gomez-Requeni P, Mingarro M, Calduch-Giner J A, Medale F, Martin S A M, Houlihan D F, Kaushik S, Perez-Sanchez J.** 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* 2004; (232): 493-510.

**Gouillou-Coustans M F, Guillaume J.** Nutrición vitamínica. In: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés.* (Ed.I.N.R.A.). 2002; 185-209.

**Gran Diccionari de la Llengua Catalana**

<http://www.grec.net/home/cel/dicc.htm>

**Grant G.** Lectins. In: *Toxic substances in crop plants.* (Eds.D'Mello FJP, Duffus CM, Duffus JP). 1991; 49-67.

**Grassé PP.** *Traote Zool.* 1248. 1958.

**Griffiths D W.** Condensed tannins. In: *Toxic substances in crop plants.* (Eds.D'Mello FJP, Duffus CM, Duffus JP). Cambridge: 1991; 180-201.

**Guillaume J, Chourbet G.** Fisiología digestiva y digestibilidad de nutrientes en los peces. In: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés.* (Ed.I.N.R.A.). 2002; 53-89.

**Guillaume J, Métallier R.** Factores antinutricionales. In: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés.* (Ed.I.N.R.A.). 2002; 533-367.

**Hendriks H G C J, Vandeningh T S G A, Krogdahl A, Olli J, Koninkx J F J G.** Binding of soybean agglutinin to small intestinal brush-border membranes and brush-border membrane enzyme-activities in Atlantic salmon (*Salmo-salar*). *Aquaculture* 1990; (91): 163-170.

**Hidalgo M C, Urea E, Sanz A.** Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 1999; (170): 267-283.

**Hoar W S.** Nutrition and digestion. In: *General and comparative physiology.* (Ed.Prentice-Hall I). New Jersey: 1983; 407-454.

**Hohene-Retain K, Helland SJ, Grisdale-Helland B, Overrein I, Rustard T, Kjorsvik E.** Replacement of fish oil by copepod oil in feeding of Atlantic salmon and Atlantic cod. 2006. XII International Symposium of Fish Nutrition and Feeding. Biarritz. Pàg. 91.

**Holman R T.** Control of polyunsaturated acids in tissue-lipids. *Journal of the American College of Nutrition* 1986; (5): 183-211.

**Hossain M A, Jauncey K.** Studies on the protein, energy and amino-acid digestibility of fish-meal, mustard oilcake, linseed and sesame meal for common carp (*Cyprinus-Carpio L*). *Aquaculture* 1989; (83): 59-72.

**Houpe K L, Malo C, Buddington R K.** Dietary lipid and intestinal brush border membrane phospholipid fatty acid composition and glucose transport of channel catfish.. *Physiological Zoology* 1997; (70): 230-236.

- Hung S S O, Storebakken T.** Carbohydrate utilization by rainbow-trout is affected by feeding strategy. *Journal of Nutrition* 1994; (124): 223-230.
- I.N.R.A.** Tables de composition et de valeur nutritive des matieres premieres destinés aux animaux d'élevage. Paris, 2002. 310 pàg.
- Ibarz A, Fernandez-Borras J, Blasco J, Gallardo M A, Sanchez J.** Oxygen consumption and feeding rates of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reveal lack of acclimation to cold. *Fish Physiology and Biochemistry* 2003; (29): 313-321.
- Ibarz A, Blasco J, Beltran M, Gallardo M A, Sanchez J, Sala R, Fernandez-Borras J.** Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 2005 249 (1-4): 477-486.
- Ibarz A, Blasco J, Sala-Rabanal M, Gallardo M A, Redondo A, Fernandez-Borras J.** Effects of thermal fluctuations and fasting on the physiology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*): tolerance and recovery. en revisió 2006.
- Ibarz A, Beltrán M, Fernandez-Borras J, Gallardo M A, Sánchez J, Blasco J.** Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. en premsa 2006.
- Iversen E S.** Cultivos Marinos. Zaragoza 1982.
- Jobling M, Gomes E, Días J.** Feed types, manufacture & ingredients. In: Food intake in fish. (Eds. Houlihan DF, Boujard T, Jobling M). Oxford: 2001; 25-48.
- Kalogeropoulos N, Alexis M N, Henderson R J.** Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body-composition of gilthead bream (*Sparus-aurata*). *Aquaculture* 1992; (104): 293-308.
- Kaushik S J, Luquet P.** Relationship between protein-intake and voluntary energy-intake as affected by body-weight with an estimation of maintenance needs in rainbow-trout. *Zeitschrift fur Tierphysiologie Tierernahrung und Futtermittelkunde-Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 1984; (51): 57-69.
- Kaushik S J.** Nutrient-requirements, supply and utilization in the context of carp culture. *Aquaculture* 1995; (129): 225-241.
- Kaushik S J, Cravedi J P, Lalles J P, Sumpter J, Fauconneau B, Laroche M.** 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* 1995; (133): 257-274.
- Kaushik S J.** Nutritional and the improvement of the soybean and soybean products in the Mediterranean region. 1997. INVE Conference , ALIIA Tradeshow, Thessaloniki, Greece.
- Kaushik S J.** Nutrición glucídica: interacción y límites del aporte de glúcidos-. In: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés.* (Ed.I.N.R.A.). 2002a; 169-185.
- Kaushik S J.** Nutrición mineral. In: *Nutrition et alimentation des poissons et crustacés.* (Ed.I.N.R.A.). 2002b; 210-223.

- Kaushik S J, Coves D, Dutto G, Blanc D.** Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 2004; (230): 391-404.
- Kawai S, Ikeda S.** Digestive enzymes of fishes. Carbohydrases in digestive organs of several fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1971; (37): 333-&.
- Kirchner S, Kaushik S, Panserat S.** 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* 2003; (134): 337-347.
- Kissil G W, Lupatsch I, Higgs D A, Hardy R W.** Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture Research* 2000; (31): 595-601.
- Kramer D L, Bryant M J.** Intestine length in the fishes of a tropical stream. relationships to diet - the long and short of a convoluted sigue. 164. *Environmental Biology of Fishes* 1995; (42): 129-141.
- Krogdahl A, Lea T B, Olli J L.** Soybean proteinase-inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino-acid digestibilities in rainbow-trout (*Oncorhynchus-mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1994; (107): 215-219.
- Krogdahl A, Roem A, Baeverfjord G.** Effects of soybean saponin, raffinose and soybean aocohol extract on nutrient digestibilities, growth and intesitnal morphology in Atlantic Salmon. *Quality in aquaculture, Proc. Intl. Conf. Aquaculture '95 and the satellite meeting Nutrition and Feeding of Cold Water Species. Trondheim, Norway, August 9-12. Eur. Aquacult. Soc. Spec. Publ. No.23, Gent, Belgium. 118-119. 1995.*
- Krogdahl A, Nordrum S, Sorensen M, Brudeseth L, Rosjo C.** Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition* 1999; (5): 121-133.
- Krogdahl A, Bakke-Mckellep A M, Baeverfjord G.** Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 2003; (9): 361-371.
- Kunitz M.** Crystalline soybean trypsin inhibitor. General Properties. *Journal of General Physiology* 1947; (30): 291-310.
- Kuzmina V V.** Characteristics of enzymes involved in membrane digestion in elasmobranch fishes. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 1990; (26): 122-126.
- Laemmli U K.** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 1970; (227): 680-688.
- Lie O.** FISK DIR SKR SER ERN. 6:83. 1994.

- Liener I E, Thompson R M.** Invitro and invivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus-vulgaris*). *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition* 1980; (30): 13-25.
- Liener I E.** Antinutritional factors in legume seeds. In: *Recent advances of research of antinutritional factors in legume seeds.* (Eds.Huisman J, Van der Poel AFB, Liener IE). Wageningen: 1989; 6-14.
- Linder M.C.** Nutrición y metabolismo de las proteínas. In: *Nutritional biochemistry and metabolism. With clinical applications.* (Ed.EUNSA). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1985; 81-99.
- Loewe H, Eckmann R.** The ontogeny of the alimentary tract of coregonid larvae: normal development. *J Fish Biol* 1988; (33): 841-850.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; (193): 265-275.
- Macias JC, Collado C, Alamo C, Escalona M, García E.** Seguimiento ambiental para instalaciones de acuicultura. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 102.
- Makkar HPS.** Antinutritional factors in foods for livestock. *Animal Productions in Developing Countries. Publicació Ocasional* 16, 69-85. 1993. British Society of Animal Production, Gill, M.; Owen, E; Pollot, G.E; Lawrence, T.L.J.
- Makkar H P S, Blummel M, Becker K.** Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas-production and true digestibility in in-vitro techniques. *British Journal of Nutrition* 1995; (73): 897-913.
- Makkar H P S, Becker K.** Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science* 1997; (128): 311-322.
- Mambrini M, Kaushik S J.** Partial replacement of dietary-protein nitrogen with dispensable amino-acids in diets of Nile Tilapia, *Oreochromis-niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1994; (109): 469-477.
- Medale F, Boujard T, Vallee F, Blanc D, Mambrini M, Roem A, Kaushik S J.** Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources* 1998; (11): 239-246.
- Morote E, Rodriguez M, Mancera JM, Moyano FJ, Muñoz JL.** Las enzimas digestivas como indicador del estado nutricional en paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*). 2005. XCNA Gandía. Pàg. 402.
- Mourente G, Dick J R, Bell J G, Tocher D R.** Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and beta-oxidation of [1-C-14]18 : 3n-3 (LNA) and [1-C-14]20 : 5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquaculture* 2005a; (248): 173-186.

- Mourete G, Good J E, Bell J G.** Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E-2 and F-2 alpha, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition* 2005b; (11): 25-40.
- Moyano F J, Cardenete G, de la Higuera M.** Use of 2 vegetable by-products as protein-sources in rainbow-trout feeding. *Animal Production* 1992; (55): 277-284.
- Moyano F J, Diaz I M, Lopez M D, Lopez F J A.** Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 1999; (122): 327-332.
- Mukhopadhyay N, Ray A K.** Effect of fermentation on the nutritive value of sesame seed meal in the diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 1999; (5): 229-236.
- Munck L K, Munck B G.** Amino-acid-transport in the small-intestine. *Physiological Research* 1994; (43): 335-345.
- Munilla-Moran R, Stark J R, Barbour A.** The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus-Maximus L.*). *Aquaculture* 1990; (88): 337-350.
- Munilla-Moran R, SaboridoRey F.** Digestive enzymes in marine species 1. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 1996; (113): 395-402.
- Murai T, Ogata H, Kosutarak P, Arai S.** Effects of amino-acid supplementation and methanol treatment on utilization of soy flour by fingerling carp. *Aquaculture* 1986; (56): 197-206.
- Muzinic L A, Thompson K R, Morris A, Webster C D, Rouse D B, Manomaitis L.** Partial and total replacement of fish meal with soybean meal and brewer's grains with yeast in practical diets for Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture* 2004; (230): 359-376.
- National Research Council.** Nutrient Requirements of Fish. 1981. National Academic of Sciences, USA.
- National Research Council.** Nutrient Requirements of Fish. 1993. National Academic of Sciences, USA.
- Naylor R L, Goldberg R J, Primavera J H, Kautsky N, Beveridge M C M, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M.** Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 2000; (405): 1017-1024.
- Norton G.** Protease inhibitors. In: Toxic substances in crop plants. (Eds.D'Mello FJP, Duffus CM, Duffus JP). Cambridge: 1991; 68-86.



- Oliva-Teles A, Gouveia A J, Gomes E, Rema P.** The effect of different processing treatments on soybean-meal utilization by rainbow-trout, *Oncorhynchus-mykiss*. *Aquaculture* 1994; (124): 343-349.
- Olsen R E, Ringo E.** Do Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), have selective absorption of dietary fatty acids? *Fiskeridir Skr Ser Ernaer* 1991; (4): 65-72.
- Olsen R E, Myklebust R, Kaino T, Ringo E.** Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiology and Biochemistry* 1999; (21): 35-44.
- Olsen R E, Myklebust R, Ringo E, Mayhew T M.** The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry* 2000; (22): 207-216.
- Olivera-Novoa M A, Dominguez-Cen L J, Olivera-Castillo L.** Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research* 1998; (29): 709-715.
- Olivera-Novoa M A, Olivera-Castillo L, Martinez-Palacios C A.** Sunflower seed meal as a protein source in diets for *Tilapia rendalli* (Boulanger, 1896) fingerlings. *Aquaculture Research* 2002; (33): 223-229.
- Onishi T, Murayama S, Takeuchi M.** Changes in digestive enzyme levels in carp After feeding. Response of protease and amylase to twice-a-day feeding. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1976; (42): 921-929.
- Padley F B, Gunstone F D, Harwood J L.** Occurrence and characters of oils and fats. In: *The Lipid Handbook*. (Eds. Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB). 1986; 49-170.
- Padros F, Crespo S, Sala S, Sánchez J, Blasco J, Fernandez J, Rotllant J, Tort L.** Winter syndrome in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Structural and functional alteration and the influence of stress. 1998. International Congress on the Biology of Fish, Baltimore, MD.
- Pages T, Gomez E, Suner O, Viscor G, Tort L.** Effects of daily management stress on hematology and blood rheology of the gilthead seabream. *Journal of Fish Biology* 1995; (46): 775-786.
- Pelissero C, Bennetau B, Babin P, Lemenn F, Dunogues J.** The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser-baeri*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1991; (38): 293-299.
- Pelissero C, Sumpter J P.** Steroids and steroid-like substances in fish diets. *Aquaculture* 1992; (107): 283-301.
- Peña JB, Diez Urbiola MJ, Peña-Llopis J.** Estudio comparativo de algunos parámetros ambientales alrededor de dos granjas marinas instaladas en la costa de Castellón. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 100.
- Pérez J M, Mornet P, Rerat A.** Le porc et son élevage. Bases scientifiques et techniques. Maloine, Paris. 1986. 608 pàg.

- Pickering A D, Pottinger T G.** Acclimation of the brown trout, *Salmo-Trutta-L*, to the stress of daily exposure to malachite green. *Aquaculture* 1985; (44): 145-152.
- Prosser, C Ladd.** Comparative animal physiology. Editat per Willey-Liss, 1991 (4<sup>a</sup> edició). 776 pàg.
- Quintana D, Márquez L, Almanasa E, Rodríguez E, Lorenzo A.** Efecto de la dieta suministrada a reproductores de pulpo común (*Octopus vulgaris*) sobre la calidad de la puesta y la composición bioquímica de huevos y paralarvas. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 350.
- Reifel C W, Travill A A.** Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in 10 teleostean species. *Journal of Morphology* 1979; (162): 343-359.
- Reshkin S J, Ahearn G A.** Basolateral glucose-transport by intestine of teleost, *Oreochromis-Mossambicus*. *American Journal of Physiology* 1987a; (252): R579-R586.
- Reshkin S J, Ahearn G A.** Intestinal glucose-transport and salinity adaptation in a euryhaline teleost. *American Journal of Physiology* 1987b; (252): R567-R578.
- Reshkin S J, Ahearn G A.** Intestinal glycyl-L-phenylalanine and L-phenylalanine transport in a euryhaline teleost. *American Journal of Physiology* 1991; (260): R563-R569.
- Richardson N L, Higgs D A, Beames R M, McBride J R.** Influence of dietary Calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus-Tshawytscha*). *Journal of Nutrition* 1985; (115): 553-567.
- Riche M, Brown P B.** Availability of phosphorus from feedstuffs fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 1996; (142): 269-282.
- Robaina L, Izquierdo M S, Moyano F J, Socorro J, Vergara J M, Montero D, Fernandezpalacios H.** Soybean and lupin seed meals as protein-sources in diets for gilthead seabream (*Sparus-aurata*) - Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 1995; (130): 219-233.
- Rodehutscord M, Mandel S, Pack M, Jacobs S, Pfeffer E.** Free amino-acids can replace protein-bound amino-acids in test diets for studies in rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). *Journal of Nutrition* 1995a; (125): 956-963.
- Rodehutscord M, Jacobs S, Pack M, Pfeffer E.** Response of rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) growing from 50 to 150 g to supplements of D-methionine in a semipurified diet containing low or high-levels of cystine. *Journal of Nutrition* 1995b; (125): 964-969.
- Rodehutscord M, Jacobs S, Pack M, Pfeffer E.** Response of rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) growing from 50 to 170 g to supplements of either L-arginine or L-threonine in a semipurified diet. *Journal of Nutrition* 1995c; (125): 970-975.
- Rollin X, Mambrini M, Abboudi T, Larondelle Y, Kaushik S J.** The optimum dietary indispensable amino acid pattern for growing Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fry. *British Journal of Nutrition* 2003; (90): 865-876.

- Rosenlund G, Obach A, Sandberg M G, Standal H, Tveit K.** Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 2001; (32): 323-328.
- Rus A S, Gallego M G.** Diversificación de fuentes y tecnologías como herramientas para la mejora de la nutrición proteica en peces. Serie monografías del ICCM 1999; (4): 173-178.
- Sala-Rabanal M, Sanchez J, Ibarz A, Fernandez-Borras J, Blasco J, Gallardo M A.** Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 2003; (29): 105-115.
- Sala-Rabanal M, Gallardo M A, Sanchez J, Planas J M.** Na-dependent D-glucose transport by intestinal brush border membrane vesicles from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Membrane Biology* 2004; (201): 85-96.
- Sandholm M, Smith R R, Shih J C H, Scott M L.** Determination of antitrypsin activity on agar plates - Relationship between antitrypsin and biological value of soybean for trout. *Journal of Nutrition* 1976; (106): 761-766.
- Sanz A, Morales A E, Delahiguera M, Cardenete G.** Sunflower meal compared with soybean-meal as partial substitutes for fish-meal in rainbow-trout (*Oncorhynchus Mykiss*) diets - protein and energy-utilization. *Aquaculture* 1994; (128): 287-300.
- Sargent J R, Bell J G, Bell M V, Henderson R J, Tocher D.** Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology* 1995; (11): 183-198.
- Sargent J, Bell G, McEvoy L, Tocher D, Estevez A.** Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 1999; (177): 191-199.
- Sargent J R, Tocher D, Bell J G.** The Lipids. In: *Fish Nutrition*. (Eds. Halver JE, Hardy RW). San Diego: Academic Press, 2002; 181-257.
- Sarusic G.** Clinical signs of the winter disease phenomenon in sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 1999; (19): 113.
- Scalera V, Storelli C, Storelljoss C, Haase W, Murer H.** Simple and fast method for the isolation of basolateral plasma-membranes from rat small-intestinal epithelial-cells. *Biochemical Journal* 1980; (186): 177-&.
- Shiau S Y, Chuang J L, Sun C L.** Inclusion of soybean-meal in Tilapia (*Oreochromis Niloticus* x *Oreochromis Aureus*) diets at 2 protein-levels. *Aquaculture* 1987; (65): 251-261.
- Shiau S Y, Chuang J C.** Utilization of disaccharides by juvenile Tilapia, *Oreochromis Niloticus* X *Oreochromis-Aureus*. *Aquaculture* 1995; (133): 249-256.
- Skrede A, Berge G M, Storebakken T, Herstad O, Aarstad K G, Sundstol F.** Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Animal Feed Science and Technology* 1998; (76): 103-116.

- Smith L S.** Digestive functions in teleost fishes. In: Fish Nutrition. 1989; 2: 331-399.
- Smith M W.** Membrane-transport in fish intestine. Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology 1983; (75): 325-335.
- Smith R R, Kincaid H L, Regenstein J M, Rumsey G L.** Growth, carcass composition, and taste of rainbow-trout of different strains fed diets containing primarily plant or animal protein. Aquaculture 1988; (70): 309-321.
- Srere PA.** Citrate synthase. In: Methods in enzymology. Citric acid cycle. (Ed. NP Kaplan i NP Colovich). 1969. (3): 3-5.
- Stevens J.** Does dietary fiber affect food-intake and body-weight. Journal of the American Dietetic Association 1988; (88): 939-945.
- Stirling C E.** Autoradiographic localization of sodium pump sites in rabbit intestine. Journal of Cell Biology 1972; (53): 704-714.
- Storebakken T, Shearer K D, Roem A J.** Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 1998; (161): 365-379.
- Storebakken T, Refstie S, Ruyter B.** Soy products as fat protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Soy in Animal Nutrition. (Ed. Darckley JJ). Savoy, IL, USA. 2000. 127-170.
- Storelli C, Vilella S, Cassano G.** Na-dependent D-glucose and L-alanine transport in eel intestinal brush-border membrane-vesicles. American Journal of Physiology 1986; (251): R463-R469.
- Storelli C, Romano S V M P, Maffia M, Cassano G.** Brush-border amino-acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. American Journal of Physiology 1989; (257): R506-R510.
- Sugiura S H, Raboy V, Young K A, Dong F M, Hardy R W.** Availability of phosphorus and trace elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 1999; (170): 285-296.
- Tacon AGJ, Stafford E A, Edwards C A.** A preliminary investigation of the nutritive-value of 3 terrestrial lumbricid worms for rainbow-trout. Aquaculture 1983; (35): 187-199.
- Tacon AGJ.** The potential for fishmeal substitution in aquafeeds. INFOFISH International 3/95:29-34. 1995.
- Takii K, Shimeno S, Nakamura I, Itoh I, Obatake A, Kumai H, Takeda M.** Evaluation of Soy Protein Concentrate as partial substitution for fish meal protein in practical diets for Yellowtail. 281-288. 1989. III International Symposium of Fish Feeding and Nutrition. Japan.

- Teskeredzic Z, Higgs D A, Dosanjh B S, McBride J R, Hardy R W, Beames R M, Jones J D, Simell M, Vaara T, Bridges R B.** Assessment of undephytinized and dephytinized rapeseed protein-concentrate as sources of dietary-protein for juvenile rainbow-trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). *Aquaculture* 1995; (131): 261-277.
- Thamotharan M, Gomme J, Zonno G V, Maffia M, Storelli C, Ahearn G A.** Electrogenic, proton-coupled, intestinal dipeptide transport in herbivorous and carnivorous teleost. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 1996a; (39): R939-R947.
- Thamotharan M, Zonno V, Storelli C, Ahearn G A.** Basolateral dipeptide transport by the intestine of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 1996b; (39): R948-R954.
- Thomassen M S, Rosjo C.** Different fats in feed for salmon - Influence on sensory parameters, growth-rate and fatty-acids in muscle and herat. *Aquaculture* 1989; (79): 129-135.
- Tidwell J H, Allan G L.** Fish as food: aquaculture's contribution - Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *Embo Reports* 2001; (2): 958-963.
- Titus E, Karasov W H, Ahearn G A.** Dietary modulation of intestinal nutrient Transport in the teleost fish *Tilapia*. *American Journal of Physiology* 1991; (261): R1568-R1574.
- Tocher D R, Ghioni C.** Fatty acid metabolism in marine fish: Low activity of fatty acyl Delta 5 desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids* 1999; (34): 433-440.
- Tocher D R, Bell J G, MacGlaughlin P, McGhee F, Dick J R.** Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: effects of dietary vegetable oil. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 2001; (130): 257-270.
- Tocher D R, Fonseca-Madrigal J, Bell J G, Dick J R, Henderson R J, Sargent J R.** Effects of diets containing linseed oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry* 2002; (26): 157-170.
- Tocher D R, Bell J G, McGhee F, Dick J R, Fonseca-Madrigal J.** Effects of dietary lipid level and vegetable oil on fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) over the whole production cycle. *Fish Physiology and Biochemistry* 2003; (29): 193-209.
- Tocher D R, Fonseca-Madrigal J, Dick J R, Ng W K, Bell J G, Campbell P J.** Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 2004; (137): 49-63.
- Todorov N A, Pavlov D C, Kostov K D.** Lupin. In: Food and feed from legumes and oilseeds. (Eds.Nwokolo N, Smartt J). London: Chapman&Hall, 1996; 113-123.

- Tort L, Gomez E, Montero D, Sunyer J O.** Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: Their suitability in stress and dietary studies. *Aquaculture International* 1996; (4): 31-41.
- Tort L, Padros F, Rotllant J, Crespo S.** Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish & Shellfish Immunology* 1998a; (8): 37-47.
- Tort L, Rotllant J, Rovira L.** Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* 1998b; (120): 175-179.
- Tort L, Rotllant J, Liarte C, Acerete L, Hernandez A, Ceulemans S, Coutteau P, Padros F.** Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture* 2004; (229): 55-65.
- Tort L, Hernández A, Ibarz A, Gallardo M A, Blasco J, Padros F, Fernandez J.** Winter syndrome in sea bream (*Sparus aurata*). Society for Experimental Biology, Annual Main Meeting, Barcelona. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 2005; (141A): S330.
- Trier J S, Moxey P C.** Epithelial-cell proliferation in the intestine of the winter flounder, *Pseudopleuronectes-Americanus*. *Cell and Tissue Research* 1980; (206): 379-385.
- Tucker J W, Lellis W A, Vermeer G K, Roberts D E, Woodward P N.** The effects of experimental starter diets with different levels of soybean or menhaden oil on red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 1997; (149): 323-339.
- Turchini G M, Gunasekera R M, De Silva S S.** Effect of crude oil extracts from trout offal as a replacement for fish oil in the diets of the Australian native fish Murray cod *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture Research* 2003; (34): 697-708.
- Ugolev A M, Kuzmina V V.** Fish enterocyte hydrolases - Nutrition adaptations. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 1994; (107): 187-193.
- Uys W, Hecht T.** Assays on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias-Gariepinus (Pisces, Clariidae)*. *Aquaculture* 1987; (63): 301-313.
- Venou B, Alexis M N, Fountoulaki E, Nengas I, Apostolopoulou M, Castritsi-Cathariou I.** Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 2003; (225): 207-223.
- Vielma J, Lall S P, Koskela J, Schoner F J, Mattila P.** Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 1998; (163): 309-323.
- Vielma J, Makinen T, Ekholm P, Koskela J.** Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 2000; (183): 349-362.

- Vilella S, Ahearn G A, Cassano G, Maffia M, Storelli C.** Lysine transport by brush-border membrane-vesicles of eel intestine - interaction with neutral amino-acids. *American Journal of Physiology* 1990; (259): R1181-R1188.
- Villanueva M, Ibarz A, Blasco J, Gallardo MA, Santigosa E, Fernandez-Borras J.** Efectos de la dieta y de la actividad en la composición y el metabolismo de dorada (*Sparus aurata*). 2005. XCNA Gandía. Pàg. 160.
- Voet D, Voet J G.** Bioquímica. 1995.
- Walter H E.** Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Ed. Bergmeyer HJ). 1984; 270.
- Wee K L, Shu S W.** The nutritive-value of boiled full-fat soybean in pelleted feed for Nile Tilapia. *Aquaculture* 1989; (81): 303-314.
- Weiser M M.** Intestinal epithelial-cell surface membrane glycoprotein synthesis. Indicator of cellular differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 1973; (248): 2536-2541.
- Xue M, Luo L, Wu X, Ren Z, Gao P, Yu Y, Pearl G.** Effects of six alternative fats on growth, digestibility of nutrients & tissue fatty acid profiles of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). 2006. XII International Symposium of Fish Nutrition and Feeding. Biarritz. Pàg. 90.
- Zerolo R, Fernández-Díaz C, Cañalvete P.** Crecimiento y supervivencia de larvas de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) cultivadas bajo distinta fotofase. 2005. XCNA Gandía. Pàg. 354.