



Universitat
de Barcelona

Dinàmica dels nutrients midó-C¹³ i proteïna-N¹⁵ en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i l'orada (*Sparus aurata*): efectes de la gelatinització dels carbohidrats, la natació sostinguda i la ritmicitat diària

Olga M^a Felip Arias

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**Dinàmica dels nutrients midó-C¹³ i proteïna-N¹⁵
en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i l'orada (*Sparus aurata*):
efectes de la gelatinització dels carbohidrats, la natació sostinguda
i la ritmicitat diària.**

Tesi Doctoral

Olga M^a Felip Arias

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**Dinàmica dels nutrients midó-C¹³ i proteïna-N¹⁵
en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i l'orada (*Sparus aurata*):
efectes de la gelatinització dels carbohidrats, la natació sostinguda
i la ritmicitat diària.**

Memòria presentada per

Olga M^a Felip Arias

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la codirecció del Dr. Jaume Fernández Borràs i la Dra. Josefina Blasco Mínguez del Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia.

Adscrita al Departament de Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona, Programa d'Aqüicultura

Jaume Fernández Borràs

Josefina Blasco Mínguez

Olga M^a Felip Arias

Barcelona, Juliol 2013

AGRAÏMENTS

La realització d'una tesi passa per múltiples etapes, se sap quan es comença però sembla que mai arriba el final. Aquest llarg recorregut no hagués estat possible sense el suport de les persones que han fet que finalment hagi estat una experiència productiva i gratificant, i són aquestes persones a les quals vull expressar-los el meu agraïment.

Primer de tot, m'agradaria fer esment a totes les persones que d'una forma més o menys desinteressada m'han ajudat a tirar endavant tot aquest treball, als meus codirectors per donar-me l'oportunitat de dur a terme aquesta tesi i de formar part del seu grup d'investigació. A la Dra. Josefina Blasco, per haver estat pendent de la meva feina en tot moment i pels consells personals, i al Dr. Jaume Fernández per la direcció del treball. Als membres del grup d'investigació pel seu companyerisme, la Marta, el Miguel, la Irene i l'Antonio. Voldria fer una menció especial al Toni, per totes les revisions dels treballs que formen part de la present tesi, i perquè ha estat un guia en el món de la investigació; a més a més de ser un amic amb qui sempre he pogut comptar, compartir i debatre qualsevol tipus de qüestió científica i de la vida en general, sense el seu suport aquest llarg camí hagués estat molt més feixuc.

No puc oblidar a d'altres científics amb els que he tingut l'honor de coincidir durant aquests anys. El Bendik Fynn Terjesen i el Turbion Asgard per acollir-me en el seu grup d'investigació, permetre'm viure una gran experiència a nivell científic i ensenyar-me noves tècniques i formes de treball, i a tots els amics de NOFIMA, per fer que la meva estança a Noruega fos inoblidable. En especial voldria anomenar a la Jelena Kolarevic, per ser una gran professional i una gran amiga, per haver compartit amb mi tantes aventures i per ajudar-me a mantindre la il·lusió per la investigació en els moments difícils.

A las "Lady Labos" inicials, la Nahir, la Marga, la Cris, la Chari i l'Angela i a les que s'hi han anat afegint, la Chrisa, l'Annemí i l'Anna, per tot el suport, l'ajuda, els dinars al bar de la facultat, els soparets i les nits de festa, les "rises" i més "rises" i per tots els moments d'ànims, una abraçada especial per totes, sou genials! I a la Queta, que va començar amb mi aquest procés i m'ha donat suport desde la distància en tot moment.

Finalment i de forma encara més especial si pot ser, vull agrair als meus pares el seu suport incansable i la seva confiança en mi, i tot l'esforç que han fet per a que jo hagi pogut arribar fins aquí. Sé del cert que si per mi ha estat dur per ells encara ho ha estat més, això ho puc dir ara que tinc al Martí al meu costat, per un fill es pateix sempre. També voldria nombrar a la Sílvia, el Miquel, la Irina i el Jan, perquè des d'un segon pla, i potser sense saber-ho, han aconseguit reduir el meu estrès amb el seu "esvalotament". I als avis, que sempre van creure en mi, especialment al yayo, que sempre em deia que estava orgullós que algun dia fos la primera doctora de la família.

I sens dubte he d'agrair al Santi la seva paciència, els ànims i l'estimació que em dona en tot moment, ho necessiti o no, i per donar-me el millor de la vida, el nostre "ratolí".

ÍNDEX

ÍNDIX

ABREVIATURES	01
1. INTRODUCCIÓ GENERAL	05
1.1. Estat actual de l'aqüicultura	07
1.1.1 La truita i l'orada: espècies d'interès en el Mediterrani.....	09
1.2. Nutrició i energètica: Buscant una adequada producció aqüícola.....	12
1.2.1. Solucions per aconseguir un estalvi proteic.....	14
1.2.2. La proteïna vegetal com una alternativa a la proteïna animal.....	15
1.2.3. Estalvi proteic a partir de lípids.....	16
1.2.4. Estalvi proteic a partir de carbohidrats.....	17
1.2.5. Influència de l'activitat de la natació sobre l'estalvi proteic.....	19
1.3. Efectes de l'activitat de la natació sobre el creixement i el metabolisme energètic.....	20
1.3.1. Tipus de fibres musculars.....	20
1.3.2. Velocitat de natació i metabolisme energètic.....	22
1.3.3. Selecció del combustible en la natació.....	25
1.4. Alimentació i ritmes biològics en peixos.....	28
1.4.1. Variabilitat rítmica diària i activitat d'anticipació a la ingesta.....	28
1.5. Els isòtops estables com a traçadors metabòlics.....	30
1.6. Perspectives.....	33
1.7. Bibliografia.....	35
2. OBJECTIUS	57
3. ÍNDIX D'IMPACTE	63
4. RESUMS DE LES PUBLICACIONS	69
5. PUBLICACIONS	79
CAPITOL I: Felip O, Ibarz A, Fernández-Borràs J, Beltrán M, Martín-Pérez M, Planas JV, Blasco J (2012) Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) using stable isotopes (¹³ C-starch and ¹⁵ N-protein): effects of gelatinization of starches and sustained swimming. <i>British Journal of Nutrition</i> 107:834-844.....	81
Abstract.....	84
Introduction.....	85
Materials and Methods.....	86
Results.....	90

Discusion.....	97
References.....	101

CAPITOL II: Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J (2013) Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ¹⁵ N and ¹³ C in gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i>). <i>Journal of Comparative Physiology B</i> 183:223-234.....	105
Abstract.....	108
Introduction.....	109
Materials and Methods.....	111
Results.....	115
Discusion.....	119
References.....	123

CAPITOL III: Ibarz A, Felip O, Fernández-Borràs J, Martín-Pérez M, Blasco J, Torrella JR (2011) Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream. <i>Journal of Comparative Physiology B</i> 181:209-217.....	129
Abstract.....	132
Introduction.....	133
Materials and Methods.....	134
Results.....	137
Discusion.....	142
References.....	144

CAPITOL IV: Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J. Diets labelled with ¹³ C-starch and ¹⁵ N-protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i>). (Sotmès a la revista <i>Aquaculture</i> el 10 de Juliol de 2013).....	149
Abstract.....	152
Introduction.....	153
Materials and Methods.....	154
Results.....	159
Discusion.....	166
References.....	169

6. DISCUSSIÓ GENERAL.....	175
6.1. Bibliografia.....	191
7. CONCLUSIONS.....	197
8. ANEXOS (articles publicats en el format de la revista).....	201

ABREVIATURES

ABREVIATURES

AAE: aminoàcids essencials

AAE: aminoàcids no essencials

ANOVA: analysis of variance

At%: atom percentage

ATP: adenosine triphosphate

BL.s⁻¹ / LC.s⁻¹: Body engths per second/Longituds corporals per segon

b.w.: body weight

C¹³: isòtop estable carboni tretze

C: Control

Ca: cabal

CCA: capillaires that surround a fibre to its cross-sectional area

CCP: capillaires that surround a fibre to its cross-sectional perimeter

Cd: comercial diet

CD: capillary density

CF: condition factor

CH: carbohydrates

CoA: coenzima A

CPSP G: fish soluble concentrate protein with high-fat level

Cr: craneal

DHA: àcid docosahexaenoic, 22:6n-3

DM: dry matter

DNA: deoxyribonucleic acid

E: exercise

EA: elemental analyzer

ED: energia digerible

Ed: experimental diet

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EPA: àcid eicosapentaenoic, 20:5n-3

F+: percentage of fibres in contact with at least one capillary

F0: fibres without surrounding capillaries

FA: fatty acids

FAA: Food Anticipatory Activity

FAO: Food and Agriculture Organization

FBPase: fructose 1,6-bisphosphatase

FCSA: fibre cross-sectional area

FD: fibre density

FPER: fibre perimeter

G6Pase: glucose 6-phosphatase

GK: glucokinassa
GLUT4: glucose transporter type 4
GS: gelatinized starch
HUFA: highly unsaturated fatty acids
IHS/HSI: índex hepatosomatic/hepatosomatic index
IRMS: isotopic ratio mass spectometry
KOH: potassium hidroxide
MB/WM: muscul blanc/white muscle
MCO₂: taxa de producció de diòxid de carboni
MDD: maximal diffusion distance
M_{nitrogen}: excreció total de nitrogen
MO₂: taxa metabòlica de consum d'oxigen
MSI: musculosomatic index
MV/RM: múscul vermell/red muscle
N¹⁵: isòtop estable nitrogen quinze
NADH: nicotinamide adenine dinucleotide
NCF: number of capillaries in contact with each fibre
NEFA: non-esterified fatty acids
NFE: extract free of nitrogen
NQ: quocient de nitrogen
PD: proteïna digerible
PDB: Pee Dee Belemnite
PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase
PF: post-feeding
PIT: passive integrated transponder
PL: phospholipids
RNA: ribonucleic acid
RQ: quocient respiratori
RS: raw starch
SDA: specific dynamic action
SDH: succinate dehydrogenase
SEM: standard error of the mean
SF: shape factor
SGR: specific growth rate
TAG: triacylglycerides
TC: total cholesterol
t. fr.: tissue fraction
U_{crit}: velocitat crítica de natació
U_{opt}: velocitat òptima de natació
w.w.: wet weight

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1. ESTAT ACTUAL DE L'AQUÍCULTURA

L'aqüicultura és el sector de producció d'aliment d'origen animal que més ha crescut en els darrers anys. Des del 1970, aquesta activitat ha incrementat a nivell mundial un 9,8% cada any. Al 1980 tan sols el 9% del peix per a consum humà procedia de l'aqüicultura mentre que en el 2000 ja es va arribar al 33,8%. Avui en dia, prop de la meitat (45,6%) del peix que es consumeix a nivell mundial procedeix de piscifactories i no de captures al mar (Fig 1). Segons la FAO, s'estima que pel 2012 més del 50% del consum global d'aliments aquàtics s'originarà de l'aqüicultura, i de cara al 2030 aquest percentatge augmentarà fins al 65%.

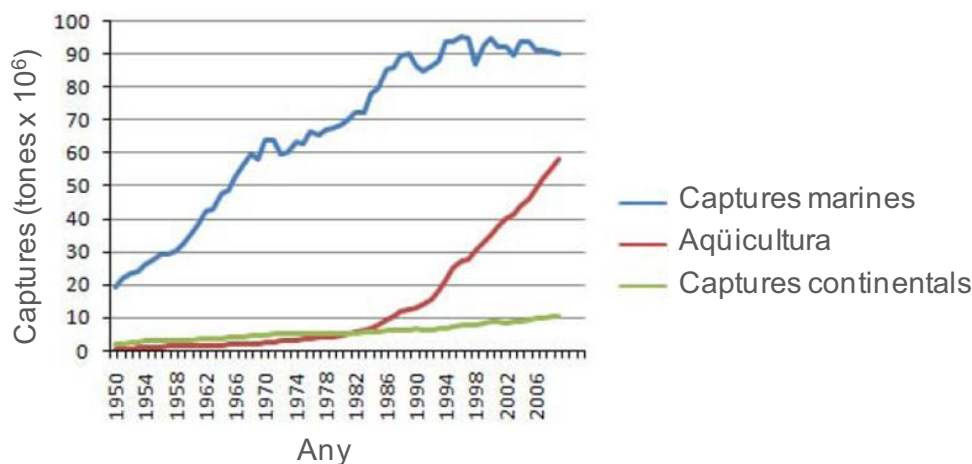


Figura 1: Evolució de la producció aquàtica (aquicultura i pesca) mundial des del 1950 fins al 2009 (FAO 2010).

Hi ha hagut una creixuda substancial en la producció mundial de peix (pesca de captura junt amb aquicultura) en la última dècada, arribant fins a 148 milions de tones en el 2010, comparat amb els 32,4 milions de tonelades del 2000 (World Aquaculture Conference 2010). Encara que no existeixen dades exactes, la FAO reconeix que amb el creixement en volum i en valor de la producció aquícola en la última dècada, el sector ha fet una contribució positiva a les economies, a la reducció de la pobresa i a la seguretat alimentària nacional, regional i global. De tota manera, cal un reconeixement apropiat de la contribució del sector aquícola basat en dades exactes per formular les polítiques, estratègies i plans d'acció per a continuar amb el desenvolupament de l'aqüicultura. No obstant això, és perceptible una reducció gradual en el ritme de creixement de l'aqüicultura global, que ha passat d'una mitjana interanual del 9% en la dècada dels 80 i 90, al 6% en la primera dècada del segle XXI.

Taula 1. Producció mundial de peix segons la font d'origen en el 2009 (FAO 2010).

Sector	Tones	%
Captures marines	89 848 004	56,81
Aqüicultura d'aigua dolça	33 833 863	21,39
Aqüicultura marina	20 179 876	12,76
Captures continentals	10 323 905	6,53
Aqüicultura d'aigua salobre	4 231 843	2,68
Total	158 159 993	100,00

S'ha de tenir en compte que el peix és una font important d'aminoàcids essencials (lisina i triptòfan), vitamines (B, A i D), minerals (iode i seleni) i àcids grassos poliinsaturats Omega-3 de cadena llarga (EPA i DHA) (Villarino i col. 2005), que proporcionen efectes beneficiosos per a la salut humana.

El consum de peix a nivell mundial continua creixent, això es deu tant a l'increment del consum per càpita com a l'augment de població a nivell mundial. Actualment, els productes aquàtics són una de les fonts més importants de proteïna animal del món, representant fins a un 28% del total de proteïna ingerida en els països en vies de desenvolupament i el 14% a Europa i Nord-amèrica (Informe APROMAR 2011). Per altra banda, el nivell de captures de peix en el mar s'ha mantingut pràcticament estable des de mitjans de la dècada dels 80 (al voltant de 87 milions de tones) fins a l'actualitat (89 milions de tones al 2009) i, fins i tot, està disminuint els darrers anys (informe FAO 2010) (Fig 1; Taula 1). L'aqüicultura podria cobrir la diferència entre l'abastiment i la demanda, però actualment un problema greu el representa el subministrament de la farina i l'oli de peix que s'usa per alimentar les espècies de peixos carnívors (les més cultivades a Europa i totes elles en cultiu intensiu alimentades amb dietes artificials). Degut a aquests requeriments nutritius, la farina i l'oli de peix són els constituents majoritaris dels pinsos fabricats avui en dia per al cultiu de peix (Atherton i Aitken 1970; Pieper i Pfeffer 1980 a i b; Mommsen i col. 1980). Ara bé, des de 1985, la producció mundial de farina i oli de peix –obtinguda del peix capturat en grans quantitats i que no es destina al consum humà– s'ha estabilitzat entre 6-7 milions de tones i un milió de tones, respectivament. L'aqüicultura consumeix avui en dia només el 35% del subministrament de farina de peix a nivell mundial, mentre que la resta s'usa en producció ramadera. Si el ritme del sector continua creixent, la demanda també augmentarà, intensificant la competició amb la ramaderia per uns recursos limitats i amb conseqüències tant en els preus com en la disponibilitat (informe FAO 2006). A més a més, la producció de farina i oli de peix es concentra en determinades regions del món creant una elevada dependència del comerç exterior, una forta pressió sobre els estocs de peix i la dependència d'oscil·lacions climatològiques que puguin afectar-los.

En la Unió Europea, l'aqüicultura és una activitat econòmica important en determinades zones costaneres y continentals. Un gran nombre de polítiques comunitàries tenen un impacte en aquesta activitat, i la política estructural en favor de la Política Pesquera Comuna ha

contribuït de manera significativa a l'evolució i desenvolupament d'aquesta indústria a Europa, tot creixent de forma considerable. Així, l'any 2006, el principal productor a la UE-27 (per darrera de l'aportació de Noruega) va ser Espanya, amb el 23% del total produït, seguida de França amb el 19% i Itàlia i el Regne Unit que representen en torn al 14% del total cadascú (EUROSTAT 2006). En relació a l'import econòmic, Espanya se situa en cinquè lloc, després del Regne unit, Itàlia, França i Grècia, amb 307 milions d'euros, el que suposa el 8,6% de la producció aquícola de la UE (Informe APROMAR 2009).

Fins a la dècada dels 80, la producció aquícola espanyola es concentrava en unes poques espècies, sent el cultiu del musclo, de la truita irisada i l'aquicultura dels estuaris gaditans, els tres cultius més característics. A partir dels anys 90, amb la incorporació de noves tecnologies i una major industrialització del sector, es van incloure noves espècies com el turbot, al nord d'Espanya, i l'orada i el llobarro, al sud i al llevant d'Espanya i a les illes Canàries. Actualment, tot i que la major producció aquícola espanyola correspon a mol·luscs (especialment musclo amb un 72,69% del total produït), la producció de peixos, tant d'aquicultura marina com continental, suposa un 24% del total produït (Informe JACUMAR 2009).

L'orada i el llobarro representen la base de l'aquicultura marina actual, mentre que la truita irisada pren total protagonisme en l'aquicultura continental a Espanya. No obstant això, la producció de peixos marins a Espanya va patir al 2010, una reducció del 9,4% respecte l'any anterior (informe APROMAR 2011). Aquesta caiguda de les produccions ha passat en totes les espècies de rellevància (orada, llobarro i turbot), i suposa la primera reducció en els últims 25 anys d'aquesta activitat.

1.1.1. La truita i l'orada: espècies d'interès en el mediterrani

La truita irisada pertany a la família dels salmònids, amb la característica que passa la seva vida adulta a l'oceà i tornen a fresar al riu on varen néixer. Aquest fenomen rep el nom de reproducció anàdroma. La truita s'alimenta generalment d'invertebrats com ara cucs, insectes i crustacis, encara que també es pot alimentar de peixos de mida petita. *Oncorhynchus mykiss* és una espècie originària de la vessant del Pacífic d'Amèrica del Nord que va ser introduïda a la Península a finals del segle passat procedent de França. La importància d'aquesta espècie resideix en que les seves qualitats naturals permeten la seva explotació industrial. Respecte d'altres espècies de salmònids, la truita irisada demostra una gran docilitat a la captivitat i tolerància i adaptació social a l'alta densitat poblacional. Aquesta espècie presenta un ampli marge d'adaptació a la temperatura i a les diverses condicions ambientals dels recintes artificials on es troba establada. La truita irisada presenta gonocorisme indiferenciat durant els primers quatre mesos de vida de forma que, després d'aquest període, els òrgans adquireixen l'estructura histològica i funcional definitiva. La reproducció de les truites, a més a més de sexual i externa, es cíclica. Això vol dir que te lloc una vegada a l'any i durant una època molt determinada, i que es veu influenciada per les condicions climàtiques i ambientals.

La producció de truita irisada ha crescut exponencialment des de 1950, especialment a Europa i més recentment a Xile. Europa representa el 67,96% de la producció mundial d'aquesta espècie, sent França i Itàlia els líders en producció (Fig 2).



Figura 2. Principals països productors de truita (*Oncorhynchus mykiss*) (FAO Estadística Pesquera 2006).

El sector de la truita irisada és un sector estable, exportador, amb marges estrets, però innovador y en expansió. En els últims anys però, sembla que s'ha frenat la producció de truita a Espanya, que havia assolit un màxim en el 2001 amb 35.384 tones i que en el 2008 s'ha vist reduïda en més de 10.000 tones, amb una producció total de 24.373,39 tones (Informe JACUMAR 2009).

L'orada pertany a la família *Sparidae*, i es tracta d'una espècie que tolera àmplies variacions de temperatura i salinitat de l'aigua, i s'alimenta principalment de mol·luscs, crustacis i peixos petits. És una espècie hermafrodita proteràndrica, que primer madura com a mascle i a partir del segon o tercer any de vida es converteix en femella. Els centres de cria produeixen ous a partir d'individus reproductors en condicions molt controlades. Durant el primer mes de vida, les larves s'alimenten de rotifer i artèmia, i després inicien una fase d'alimentació a base de pinsos. El cultiu de l'orada en les regions mediterrànies està patint una gran transformació, passant de ser una indústria amb grans marges i baixos volums de producció, a ser una indústria amb baixos marges i grans volums, estratègia coneguda com a economia d'escala.

L'orada es produeix a nivell Europeu majoritàriament a Grècia (51% del total produït a Europa), Turquia (15%) i Espanya (14,6%), tot i que també es cultiva en 16 països més de l'àrea mediterrània (Fig 3).



Figura 3. Àrees de producció d'orada (*Sparus aurata*) al mediterrani.

Dins el marc espanyol, l'orada és l'espècie de peix més produïda, encara que les últimes dades a nivell nacional determinen una producció de 20.360 tones el 2010, un 14,1% menys respecte de 2009 i un 1% inferior a la de 2008. Aquesta circumstància de descens de la producció en aquesta espècie no havia passat mai en la història de l'aqüicultura de l'orada a Espanya. Per altra banda, encara que es continua descarregant orada procedent de pesca extractiva en els principals ports pesquers, el seu volum a mig termini roman constant (Fig 4).

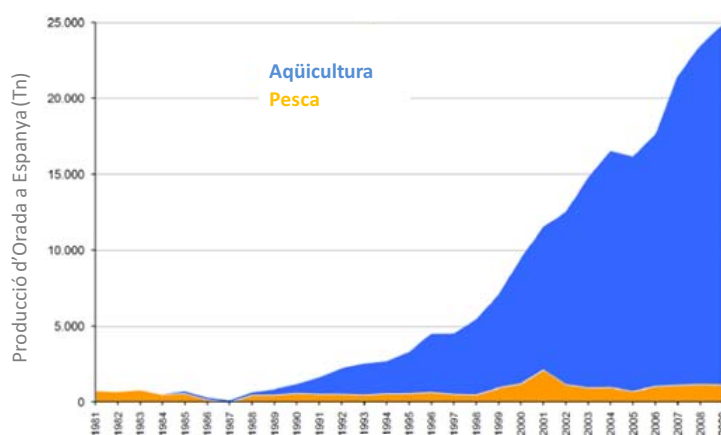


Figura 4. Evolució de les fonts d'obtenció d'orada (*Sparus aurata*) a Espanya: Aqüicultura i pesca, en el període 1980-2009 (FAO).

Per continuar amb el desenvolupament de la indústria aqüícola de truita i d'orada en el mediterrani, s'hauran de fomentar estratègies d'organització de mercats, promovent l'obertura de nous mercats i l'ampliació dels existents, i adoptant procediments més exigents pel que fa a la qualitat del producte final. Tot això haurà d'anar acompanyat d'una millora i optimització dels sistemes de producció, el que implica invertir en investigació sobre la nutrició dels peixos i les condicions de cultiu dels mateixos per a optimitzar el creixement de l'animal i la qualitat del producte final. Cal fer èmfasi en aquest darrer punt, ja que cal buscar solucions per a un sector

que està patint de forma severa l'actual crisi econòmica i financera, juntament amb l'escepticisme del consumidor vers el producte d'aqüicultura.

1.2. NUTRICIÓ I ENERGÈTICA: BUSCANT UNA ADEQUADA PRODUCCIÓ AQUÍCOLA

Per mantenir totes les activitats vitals i productives, els peixos, com la resta d'animals, han de tenir un subministrament constant d'energia que obtindran mitjançant la combustió biològica de les matèries orgàniques procedents de l'aliment (glúcids, lípids i proteïnes). Així, amb una alimentació adequada, l'energia excedent de l'alimentació servirà per a la biosíntesis i el creixement, mentre que en situacions de gran demanda energètica, com per exemple en el dejuni o la migració, els processos catabòlics per obtenir energia seran predominants.

La proteïna és, quantitativament, el component més important de les dietes que s'utilitzen per al cultiu de peixos carnívors, i a la vegada, es tracta del component més costós en termes econòmics. La inclusió de farines de peix sol oscil·lar entre un 20% i un 60%, i és per aquest motiu que, donada la limitada disponibilitat de farina de peix en el mercat mundial, la recerca de fonts alternatives de qualitat ha esdevingut essencial per al desenvolupament sostenible de l'aqüicultura (Cho i col. 1994; Watanabe 2002; Gatlin i col. 2007; Kaushik i Seilliez 2010). Aquest fet ha provocat que un dels principals objectius actuals de la nutrició en peixos sigui buscar reduir el màxim possible la despesa de la proteïna de la dieta amb finalitat energètica.

El contingut de proteïnes de l'organisme és molt dinàmic, amb proteïnes que entren a la via de nova síntesis i proteïnes que són eliminades via degradació (Fraser i col. 2002). Simon (1989), defineix el metabolisme proteic com el resultat de tres processos inter-relacionats, la síntesi de proteïnes noves, la degradació i el creixement. El balanç relatiu entre síntesi i degradació proteica és el que determinarà si hi ha retenció proteica i, per tant, creixement (conversió de la proteïna del *pool* en massa de peix) o decreixement (Houlihan i col. 1995a).

El metabolisme proteic en peixos és molt sensible a una gran varietat de factors biòtics i abiòtics, incloent-hi la temperatura, la pol·lució, l'estacionalitat, la nutrició, l'estat del desenvolupament, la genètica i la maduració sexual. Aquests factors poden afectar el metabolisme proteic a nivell de l'animal sencer, a nivell de teixit i a nivell cel·lular. El metabolisme proteic a nivell de l'animal sencer dependrà de la massa relativa de cada teixit, del seu contingut proteic i de les seves taxes de síntesi proteica, degradació o de creixement. En els ectotermes marins l'ordre de més alta a més baixa taxa de síntesi proteica seria el següent: intestí, brànquies, fetge, estómac, cor, múscul blanc i cervell. Però cal tenir en compte que aquesta classificació variarà molt en funció de les condicions de l'animal. Houlihan (1991) va suggerir que les taxes de síntesi proteica del múscul blanc són una bona aproximació de la mesura de les taxes de creixement del peix, ja que les taxes de degradació proteica en aquest teixit són molt baixes. El múscul blanc és el lloc de major acreció de proteïnes i la síntesi proteica en aquest teixit és molt sensible als canvis de dieta (Fauconneau 1985; Houlihan i col. 1986; Houlihan i Laurent 1987). Per aquest motiu, s'han relacionat fortament el consum

d'aliment, el consum d'O₂ i el metabolisme proteic en diversos teixits i òrgans (Lyndon i col. 1992; Carter i col. 1993a,b), suggerint que un increment significatiu en la resposta anomenada SDA (Specific Dynamic Action) és directament proporcional a un increment de la síntesi proteica i del creixement (Jobling 1985; Robertson i col. 2001; Whiteley i col. 2001). Per tant, tot i que la relació entre el consum d'aliment i les taxes de síntesi proteica en els teixits d'ectotèrms marins és complexa i encara són necessaris més estudis per part dels investigadors, és sobradament sabut que els canvis postprandials en les taxes de síntesi proteica depenen de la història nutricional de l'organisme i de la quantitat d'ingesta (Houlihan 1991). En espècies com el bacallà i la truita irisada s'ha descrit un increment transitori en la síntesi de proteïna en el fetge previ a l'increment en la resta de teixits (McMillan i Houlihan 1989; Lyndon i col. 1992), al que podria seguir una mobilització de la proteïna sintetitzada en el fetge o una utilització de la mateixa amb finalitat energètica. En peixos, el múscul blanc s'utilitzaria com a reservori de proteïnes durant períodes d'estrès nutricional, proporcionant aminoàcids als teixits metabòlicament més actius (Houlihan i col. 1988).

És important indicar que existeixen altres destins de la proteïna de la dieta diferents del creixement, com la utilització energètica i gluconeogènica dels diferents aminoàcids. Per tant, el seu ús relatiu dependrà, no solament de la qualitat i quantitat de la proteïna dietària, sinó de l'ajust en el balanç proteïna/energia (Von der Decken i Lied 1992; de la Higuera i col. 1998, 1999). Així, s'ha de buscar com un fi pràctic el manteniment dels creixements òptims minimitzant el destí energètic i gluconeogènic, amb un subministrament adequat de lípids i carbohidrats.

La recerca en l'àmbit de la nutrició de peixos passa pel desenvolupament de dietes més òptimes per maximitzar el seu creixement i la millora de les estratègies d'alimentació. A mesura que el consum d'aliments augmenta per sobre de la ració de manteniment, existeix un increment lineal en la síntesi de proteïna en el total del peix i en les taxes de creixement (Houlihan i col. 1995b). L'objectiu de l'aqüicultura però, no és augmentar el consum de pinso, sinó balancejar les dietes de manera que l'animal optimitzi l'eficiència de conversió de l'aliment. Comparat amb els mamífers, els peixos sembla ser que són més dependents dels aminoàcids provinents de dieta per suplir les necessitats metabòliques. Així, Cowey i Luquet (1983) van estimar que el catabolisme de les proteïnes tissulars en peixos suplia aproximadament un 50% dels aminoàcids utilitzats per al metabolisme, mentre que per exemple en rates, suplia fins a un 70% (Millward i col. 1976). Aquest catabolisme aminoacídic té lloc principalment en el fetge formant part del metabolisme dels nutrients via reaccions de desaminació, on cada aminoàcid té una ruta específica del catabolisme que implica reaccions catalitzades per enzims amb productes finals específics. Aquest producte desaminat pot ser després metabolitzat a través de vies oxidatives per tal de produir energia. Amb el continu increment de la taxa de creixement anual de l'aqüicultura mundial, un dels reptes passa per assegurar que aquest creixement es reflecteixi en el subministrament o aprovisionament de proteïnes d'alt valor biològic per als éssers humans (Kaushik i Seilliez 2010). En aquest sentit, s'obren molts interrogants per a una bona gestió nutritiva: estan ben balancejades les dietes per a una utilització òptima de la seva

proteïna? Quines variacions a nivell d'inclusió de lípids i carbohidrats en la dieta podrien permetre millorar la relació proteïna/energia?

1.2.1. Solucions per aconseguir un estalvi proteic

La reducció de la despesa de la proteïna de la dieta amb finalitat energètica s'aconsegueix definint els aminoàcids essencials per a cada espècie i elaborant dietes on aquests hi estiguin disponibles. Tot això, en les quantitats i proporcions adequades per a la síntesi de proteïnes destinades al creixement, es a dir, optimitzant la retenció proteica alhora que s'obté l'energia dels altres nutrients (lípids i carbohidrats).

La situació actual del sector i el fet que l'aqüicultura ofereix una font d'alimentació que és rica en proteïnes, àcids grassos essencials, vitamines i minerals, ha estimulat dos grans àmbits de recerca en aquesta última dècada:

- El primer, busca reduir el contingut de proteïna digerible de la dieta mitjançant l'increment de lípids i d'hidrats de carboni. Està demostrat que les fonts d'energia no proteiques permeten estalviar proteïna de la dieta amb finalitat energètica (efecte estalvi o *sparing effect*), destinant-se una major proporció al creixement que a l'oxidació (Brauge i col. 1995; Arzel i col. 1998; Company i col. 1999). Una disminució en la ràtio Proteïna digerible/Energia digerible (PD / ED) és extremadament eficient en la millora de la utilització de les proteïnes i permet una disminució en les pèrdues de nitrogen en la majoria de peixos de piscifactoria (Kaushik i Cowey 1991; Cho i Bureau 2001). En la majoria de les espècies, de les fonts d'energia digeribles que no són proteïnes provinents de dieta, els greixos s'utilitzen eficientment tant a nivell del tracte digestiu com a nivell de post-absorció (Sargent i col. 2002), mentre que els carbohidrats de la dieta requereixen un tractament tèrmic per millorar la seva digestibilitat i el subministrament d'energia digerible (Bergot i Breque 1983; Wilson 1994). L'augment en els nivells de lípids de la dieta s'ha vist que és beneficiós per a la reducció de la ràtio PD/ED i té clars efectes favorables en termes d'utilització del nitrogen en la majoria dels peixos (Kaushik i Oliva-Teles 1985; Hillestad i Johnsen 1994; Satoh i col. 2004). El marge de maniobra però sembla variable en funció de les espècies, ja que algunes són capaces de treure més benefici de les dietes amb elevats continguts d'energia no provinent de proteïna que d'altres. De totes maneres, un problema important de l'increment dels nivells de lípids de la dieta és l'augment de la deposició de greix, que està relacionat amb els canvis de les activitats lipogèniques dels enzims (Dias i col. 1999; Regost i col. 2001). Per altra banda, encara que els hidrats de carboni digeribles es posin a disposició de l'animal, la utilització metabòlica de la glucosa absorbida és limitada en la majoria dels peixos (Moon 2001; Panserat i Kaushik 2002) i l'energia neta subministrada es veu reduïda (Bureau 1997; Hemre i col. 2002). Cal dir, però, que hi ha diferències entre les espècies (Furuichi i Yone 1982; Panserat i col. 2000; Shiao i Lin 2001; Enes i col. 2008). Per poder afinar en aquest objectiu també cal contemplar la disponibilitat d'aminoàcids i el seu valor biològic, així com l'efecte de la relació d'aminoàcids essencials/aminoàcids no essencials (AAE/AANE) de la dieta sobre la capacitat d'estalvi proteic (Wilson i Halver 1986).

- El segon àmbit important de recerca es centra en testar fonts de proteïnes alternatives a la farina de peix i als olis en substitució de l'oli de peix. Dins de les alternatives s'inclouen matèries primes derivades de subproductes animals (Plasencia-Jatomea i col. 2002; de Haro i col. 2011 a i b; Millamena i Golez 2001), organismes unicel·lulars (Oliva-Teles i Gonçalves 2001), algues (Dallaire i col. 2007), llavors (Kissil i col. 2000), llegums (Pereira i Oliva-Teles 2002; Thiessen i col. 2003) i altres productes d'origen vegetal (Regost i col. 1999). Tot i que Watanabe i col. (1997) van mostrar que dietes que no incorporaven farina de peix i que contenien una barreja de diferents fonts de proteïnes eren ben utilitzades per la truita irisada, el seu creixement es veia afectat a partir d'un 75% de substitució (Gómez-Requeni i col. 2005). En l'orada (Benedito-Palos i col. 2007) existeix un potencial molt més gran per reduir el nivell de farina de peix de la dieta.

També cal tenir en compte que la substitució de farines i olis de peix per fonts alternatives pot resultar beneficiosa des del punt de vista de la seguretat alimentaria, ja que els productes d'origen marí són fonts potencials de residus químics i metalls pesants (Jacobs i col. 2002; Cortazar i col. 2008; Serrano i col. 2008).

1.2.2. La proteïna vegetal com una alternativa a la proteïna animal

Una manera d'estalviar la proteïna d'origen animal de la dieta, seria la utilització de recursos vegetals per a reemplaçar la farina de peix en la seva formulació (Kaushik i Seilliez 2010). Existeixen estudis que demostren que els peixos carnívors accepten fins a un 40% de substitució per proteïna vegetal. No obstant, si es tenen en compte tots els aspectes, incloent els econòmics, per exemple l'orada accepta una substitució per proteïna de soja del 20-22% (Martinez-Llorens i col. 2007), i en canvi, s'han descrit substitucions per proteïna de pèsol en orada de fins el 32% sense afectació del creixement (Sánchez-Lozano i col. 2011). També s'ha observat que percentatges majors acostumen a provocar una reducció del creixement o una menor eficàcia d'utilització de l'aliment en salmònids (Davies i Morris 1997; Mambrini i col. 1999; Refstie i col. 2000) i en els teleostis marins (Shimeno i col. 1993; Ballestrazzi i col. 1994; Robaina i col. 1995; Nengas i col. 1996; Burel i col. 2000 a i b). La reducció del creixement s'associa generalment a la presència de factors antinutricionals (Francis i col. 2001), a la manca d'algun aminoàcid essencial a les fonts vegetals, com la metionina o la lisina (Murai i col. 1986; Kaushik 1990; Kaushik i col. 1995), o a la presència d'algun hidrat de carboni complex (Rackis 1974; Storebakken i col. 2000). Així doncs, amb el creixent interès per obtenir fonts de proteïna alternatives i més econòmiques, cal tenir present que per a l'ús aplicat de la substitució de la proteïna animal per proteïna vegetal s'han de mantenir els nivells de certs factors com ara la taxa d'ingesta i l'eficiència de conversió de l'aliment, així com la taxa de creixement i de supervivència dels peixos.

1.2.3. Estalvi proteic a partir de lípids

Els lípids, com a principal nutrient proveïdor d'energia en la dieta dels peixos, tenen un important efecte d'estalvi de proteïnes en moltes espècies (Wilson 1989; Sargent i col. 1989). Des de fa temps se sap que, en general, la inclusió de lípids dins un rang del 10-20% del pes sec de la dieta és suficient per permetre que la proteïna sigui utilitzada eficaçment per al creixement dels peixos sense que es dipositi excessiva quantitat de lípids en els teixits d'aquests (Cowey i Sargent 1979; Watanabe 1982; Sargent i col. 1989). No obstant, la quantitat precisa de lípids requerida depèn del nivell de proteïnes de la dieta i també del nivell de carbohidrats (Watanabe 1982; Sargent i col. 1989). Si els lípids en dieta s'inclouen en excés (dietes *high-energy* o *high-oil/fat*, "trending topic" dels darrers anys del segle XX), pot tenir conseqüències per al peix de cria, tot alterant el seu contingut en lípids i el metabolisme dels àcids grassos. Aquest fet comporta implicacions per a la salut i el benestar dels peixos ja que pot induir patologies hepàtiques (Caballero i col. 1999; Ibarz i col. 2007). A més, pot afectar la qualitat i sabor del producte final (Bellestrazzi i Mion 1993) variant-ne també les seves propietats alimentàries (Sargent i Tacon 1999). Se sap des de fa temps, que existeix una forta relació entre els nivells de lípids en la dieta i els nivells de lípids en la carcassa dels peixos (Cowey 1993). Així, s'ha demostrat que les dietes que contenen alts nivells de lípids augmenten els nivells de lípids en el filet, tant en peixos d'aigua dolça (Anderson i Arthington 1989; Stowell i Gatlin 1992) com marins (Arzel i col. 1993; Silver i col. 1993; Catacutan i Coloso 1995; Stephan i col. 1996; Hemre i col. 1997; Dias i col. 1999; Hemre i Sandnes 1999).

Els lípids en els peixos juguen un paper molt important en l'emmagatzematge i subministrament d'energia metabòlica en forma d'ATP proveït a través de la β -oxidació (catabolisme) dels àcids grassos (Sargent i col. 1989; Froyland i col. 2000). L'NADH produït de l'oxidació dels àcids grassos mitjançant el procés de la fosforilació oxidativa pot proveir d'energia metabòlica en forma d'ATP als teixits i òrgans dels peixos, incloent-hi el fetge, el cor, el múscul vermell i el múscul blanc. La lipogènesis, per altra banda, és la formació *de novo* de lípids endògens, on la font última de carboni és l'acetil-CoA format a la mitocondria per la descarboxilació oxidativa del piruvat (carbohidrats com a font d'origen) o per degradació oxidativa d'alguns aminoàcids (proteïna com a font d'origen). En la truita, encara que el teixit adipós té una certa capacitat lipogènica, el fetge és quantitativament el principal òrgan on té lloc aquest procés (Henderson i Sargent 1985). Tenint en compte que l'oli de peix és la font lipídica majoritària en les dietes per a peixos, els àcids grassos que representen una font potencial d'energia metabòlica per als peixos i que s'inclouen a les dietes són: 16:0 i 18:1*n*-9; 20:1*n*-9 i 22:1*n*-11, i *n*-3 HUFA 20:5*n*-3 i 22:6*n*-3. L'especificitat en l'oxidació d'àcids grassos en els peixos és important per determinar la composició d'àcids grassos dels triglicèrids dipositats en el teixit adipós del peix. Aquesta composició, a la vegada, és important no només per al benestar dels peixos, sinó també per al consumidor, particularment en termes dels nivells de 20:5*n*-3 i 22:6*n*-3 dels peixos cultivats.

Moltes espècies de peixos, incloent-hi la majoria d'espècies marines, estan molt ben proveïdes d'àcids grassos en la seva dieta natural. Sota aquestes condicions, la biosíntesi endògena d'àcids grassos *de novo* (incloent les elongacions de cadena), és probable que estigui reprimida. Per tant, no és desgavellat considerar la possibilitat que les espècies que han evolucionat amb dietes altes en greixos tinguin una capacitat de biosíntesi *de novo* d'àcids grassos limitada i que, portat a l'extrem, hagin perdut aquesta capacitat. Aquest és un dels motius pels quals seria convenient garantir que els peixos criats amb dietes amb un elevat contingut de greixos presentin les quantitats adequades d'una gamma adequada d'àcids grassos. En termes de fonts de carboni, la taxa de síntesi d'àcids grassos a partir d'alanina s'ha vist que és major que a partir de la de glucosa en el fetge de la truita, el que suggereix que els aminoàcids són la font de carboni preferencial per a la lipogènesi en aquesta espècie. Aquest fet, és presumiblement un reflex de l'elevat contingut de proteïnes i, en general, el baix contingut de carbohidrats de les preses dels peixos a la natura, tant d'aigua dolça com marins. La taxa de lipogènesi està regulada per una sèrie de factors dietaris o nutricionals. En particular, l'augment de carbohidrats de la dieta en relació als lípids indueix un increment de la lipogènesi a partir de glucosa en la truita irisada (Brauge i col. 1995), fet que pot portar a la situació no desitjada d'engreixament per acumulació de greix en òrgans i teixits. No obstant, els lípids dels peixos són rics en àcids grassos ω 3 de cadena llarga i per tant altament insaturats (n-3 HUFA); aquests juguen rols importants en la nutrició animal, incloent la nutrició dels peixos i dels humans. En efecte, els peixos són la font d'aliment que aporta més quantitat d'aquests nutrients vitals per a l'home.

En el sector de la nutrició en aquicultura, caldria solucionar els problemes que porten associades les dietes amb elevats continguts lipídics i que, avui en dia, s'estan utilitzant per millorar el creixement dels animals a través de l'estalvi proteic i la millor eficiència de conversió de l'aliment. Un aspecte global a solucionar és la gran problemàtica que té el sector en relació a l'elevada demanda d'oli de peix per a la formulació de pinsos, per a la qual s'ha de trobar una alternativa apropiada, sostenible i respectuosa amb el medi ambient. No obstant, no hem d'oblidar que s'han de retenir, en la mesura del possible, les propietats del producte final, el que significa mantenir els actuals alts nivells d'àcids grassos poliinsaturats (Sargent i Tacon 1999), per tal de no perdre les propietats saludables que aquests lípids aporten a l'home.

1.2.4. Estalvi proteic a partir de carbohidrats

L'ús d'ingredients alternatius a la farina de peix ha d'abordar la inclusió de més hidrats de carboni en la dieta, tenint present que el procés d'extrusionat comporta una major disponibilitat dels sucres per la gelatinització. Per a molts organismes la molècula central del metabolisme és la glucosa, de manera que esdevé una font d'energia especialment important per al cervell també en els peixos (Soengas i Aldegunde 2002). Els carbohidrats però, no són essencials en la seva nutrició ja que la seva absència en la dieta es pot cobrir amb un increment de la utilització de les proteïnes i lípids. De totes maneres, constitueixen una font d'energia barata i la

seva inclusió en la dieta en les proporcions adequades pot afavorir el creixement pel fet d'estalviar aminoàcids per a la síntesi de proteïna. Per altra banda també pot disminuir l'excreció d'amoni tot reduint, d'aquesta manera, la utilització proteica amb finalitat energètica. Existeix, però, un problema quan s'empren grans quantitats de carbohidrats en la nutrició dels peixos carnívors. D'una banda, tradicionalment, els peixos han estat descrits com "intolerants a la glucosa" degut al fet que la hiperglucèmia després d'una càrrega de glucosa els pot durar diverses hores, fins i tot més d'un dia (Wilson 1994; Moon 2001; Hemre i col. 2002; Panserat i Kaushik 2002; Stone 2003). No obstant això, aquests efectes semblen estar relacionats amb l'espècie i, més important encara, amb els hàbits alimentaris (Moon 2001). Aquesta intolerància a la glucosa dels peixos es va postular, inicialment, que podia ser deguda a la reduïda secreció d'insulina. S'ha demostrat, però, que en els peixos els aminoàcids són més importants que la glucosa com a insulínotropics (Navarro i col. 2002). D'altra banda, la digestibilitat i tolerància dels hidrats de carboni sembla estar associada principalment a la complexitat i quantitat d'aquests carbohidrats a la dieta, però també a l'estat físic de l'animal (Hemre i col. 2002; Stone 2003). Afortunadament, el progrés en les tecnologies d'extrusió i de gelatinització han permès que els hidrats de carboni esdevinguin una bona font d'energia, el que comporta una major disponibilitat dels sucres de la dieta.

Encara que totes les espècies de peixos estudiades fins al moment posseeixen la dotació enzimàtica per a la hidròlisi i absorció tant de carbohidrats simples com dels més complexos, s'ha descrit que els peixos omnívors mostren millors taxes de digestió del midó que els peixos carnívors (Wilson 1994). Així, s'ha demostrat que, sempre i quan el contingut en proteïna de la dieta sigui l'adequat, certs nivells de midó gelatinitzat promouen el creixement en diverses espècies de peixos carnívors (Degani i col. 1986; Hemre i col. 1989; Hung i col. 1989; Hemre i col. 1995; Hemre i Hansen 1998; Stephan i col. 1996). La capacitat d'ús dels carbohidrats de la dieta per la truita irisada encara roman controvertida (Wilson 1994; Hemre i col. 2002; Stone 2003), tot i que diversos autors han afirmat que dietes amb elevats continguts de carbohidrats digeribles (20-30%) poden estimular el creixement en aquesta espècie. Més enllà dels problemes de digestibilitat, el destí d'elevades càrregues de glucosa ha estat objecte d'estudi per diversos autors (Moon 2001). La hiperglucèmia induïda per una càrrega de glucosa provoca un augment en la captació d'aquesta, especialment en els músculs vermell i blanc, incorporant-se a tots els components tissulars (Blasco i col. 1996, 2001). Aquests autors van observar, a partir de la recuperació total de C¹², un augment de la síntesi de glicogen i dels lípids hepàtics i una major utilització diària de la glucosa com a font energètica quan s'incrementa el seu subministrament. S'ha demostrat que dietes riques en carbohidrats i baixes en proteïna incrementen l'expressió de la glucoquinasa (GK) en el fetge (Borrebaek i col. 1993; Panserat i col. 2000; Caseras i col. 2002; Capilla i col. 2003; Metón i col. 2004; Enes i col. 2006, 2008; Leung i Woo 2011), permetent una adaptació metabòlica que afavoreix la glicòlisi sobre la gluconeogènesi. En la truita, s'ha descrit un augment en l'expressió de la glucoquinasa, mentre que l'activitat d'altres enzims com la FBPase, la Glucosa-6-fosfatasa o la PEPCK no es veu afectada per la ingesta elevada de carbohidrats (Panserat i col. 2000,

2001); i en el cas de la G6Pase fins i tot s'han descrit activitats més baixes en aquestes condicions (Panserat i col. 2001). A més a més, és important tenir en compte que la taxa d'utilització de la glucosa pot ser modificada quan es produeixen canvis en la demanda d'energia, com en el dejuni (Blasco i col. 2001), la hipòxia (Haman i col. 1997), en condicions d'exercici (West i col. 1993), per variacions del ritme diari d'alimentació (López-Olmeda i col. 2009a), etc.

En el cas de l'orada, pocs estudis s'han focalitzat en els nivells òptims de carbohidrats en la dieta i els seus efectes en l'estalvi de proteïnes, i la promoció del creixement dels peixos (Metón i col. 1999; Couto i col. 2008; Enes i col. 2008). La millora en el creixement quan s'inclouen baixos nivells de carbohidrats en la dieta de peixos, es relaciona amb una millora en la utilització dels nutrients i la retenció de la proteïna de la dieta, i a la vegada amb un ús energètic de la glucosa estimulat i una disminució de la gluconeogènesi a partir d'aminoàcids. En el 2007, Ibarz i col. ja apuntaven en orada una bona plasticitat de les reserves de glicogen del fetge. Això indicava que l'ús dels carbohidrats com a combustible metabòlic en aquesta espècie s'havia de reconsiderar perquè les dietes altament energètiques enriquides amb greix que se'ls solen administrar afavoreixen l'engreixament dels animals, fet que les fa inadequades i inclús perjudicials per aquesta espècie. Couto i col. al 2008, indiquen que indistintament si es tracta de blat de moro *waxy* (únicament conté amilopectina) o *native* (conté amilosa i amilopectina), l'orada utilitza igual d'eficientment inclusions del 20% de carbohidrats en la dieta que del 10% per a estalviar proteïna, mentre que continguts més elevats de carbohidrats (30%) disminueixen la utilització de la proteïna.

La bona acceptació dels hidrats de carboni per l'orada també ha estat reflectida en els canvis d'expressió o activitat d'enzims claus implicats en el metabolisme dels hidrats de carboni. D'aquesta manera, s'ha descrit un increment en l'expressió de la glucoquinasa (GK) hepàtica d'orades alimentades amb dietes riques en carbohidrats i baixes en proteïna (Panserat i col. 2000; Caseras i col. 2002; Metón i col. 2004; Enes i col. 2006, 2008). Altres enzims com la 6-fosfofructoquinasa, la piruvat quinasa, la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa i la 6-fosfogluconat deshidrogenasa també veuen augmentada la seva activitat en el fetge d'orada degut a dietes riques en carbohidrats i baixes en proteïna. Els dos primers enzims indiquen un increment de la via glucolítica i d'obtenció d'energia a partir d'aquests substrats, i els altres dos indiquen una major derivació cap al xunt de les pentoses per obtenir poder reductor i sucres de cinc carbonis, inductors de molècules com els àcids nucleics. Paral·lelament, enzims com ara l'alanina aminotransferasa veuen disminuïda la seva activitat en resposta a la reducció de proteïna (Metón i col. 1999).

1.2.5. Influència de l'activitat de la natació sobre l'estalvi proteic

La condició d'exercici està estretament relacionada amb el consum d'energia i l'alimentació, i s'ha associat amb el benestar animal i la millora de la producció en la majoria dels animals, incloent diverses espècies de peixos. L'establiment dels peixos per a aquicultura redueix

l'activitat física i el rendiment dels animals, i és ben sabut que els peixos salvatges presenten un major rendiment de l'activitat de natació ("swimming performance") que els peixos de cultiu, tal com la truita de rierol (*Salvelinus fontinalis*) (Vincent 1960), el salmó platejat (*Oncorhynchus kisutch*) (Brauner i col. 1994), el salmó de l'Atlàntic (*Salmo salar*) (McDonald i col. 1998) i l'orada (*Sparus aurata*) (Basaran i col. 2007). Des d'aquest punt de vista, el "sedentarisme" dels peixos estabulats ha de limitar l'ús energètic de les reserves. Fibres musculars més grans, produeixen un augment de les masses musculars dels peixos i un major pes corporal total, donant suport a la teoria que les condicions de cria sedentària no exploten tot el creixement potencial del múscul dels peixos. En efecte, l'exercici és un potent estímul en la hipertrofia muscular, encara que els efectes en la hiperplàsia muscular sota condicions d'exercici no s'han determinat (Johnston 1999). Així, s'ha descrit que les càrregues mecàniques resultat del moviment de l'animal, estan involucrades en el desenvolupament i manteniment dels teixits dels vertebrats (Buchanan i Marsh 2002; Davison 1997). Per tant, la quantitat i proporció de nutrients utilitzats pel peix hauria de variar en funció de l'exercici, tot i que encara no ha estat plenament demostrat. Des del punt de vista pràctic, l'activitat moderada i sostinguda també s'ha utilitzat per millorar la taxa de creixement i l'eficiència de conversió de l'aliment en els peixos (Jorgensen i Jobling 1993; Davison 1997), així com per a reduir l'acumulació excessiva de lípids i el conseqüent engreixament.

1.3. EFECTES DE L'ACTIVITAT DE LA NATACIÓ SOBRE EL CREIXEMENT I EL METABOLISME ENERGÈTIC

Es creu que l'exercici de natació té una sèrie d'efectes positius sobre el peix (Kieffer 2000), incloent-hi la millora del creixement muscular (Davison i Goldspink 1977; Johnston i Moon 1980; Totland i col. 1987) i de la qualitat de la carn (Totland i col. 1987; Tsuchimoto i col. 1988), així com una reducció de les interaccions agressives entre els peixos (Adams i col. 1995; Christiansen i Jobling 1990; Christiansen i col. 1991, 1992; East i Magnan 1987; Jobling i col. 1993) i de la resposta d'estrès (Woodward i Smith 1985; Young i Cech 1993,1994). A través dels anys, la capacitat de la indústria aquícola per dur a terme la producció de peixos amb més biomassa i de manera més ràpida, s'ha basat en la millora genètica i el desenvolupament de dietes altament energètiques. La manca d'exercici físic que presenten els peixos de piscifactoria combinada amb elevades taxes de creixement s'ha assenyalat reiteradament com la responsable d'una producció subòptima.

1.3.1. Tipus de fibres musculars

La natació normalment es classifica com a aeròbica o anaeròbica (Videler 1993), representant els extrems d'un procés de reclutament fisiològic de fibres "vermelles" de contracció lenta o fibres "blanques" de contracció ràpida, respectivament, per donar lloc a la contracció muscular. En moltes espècies de peixos apareix també un múscul rosa intermedi que generalment està

present entre els dos tipus principals de músculs, el blanc i el vermell. La proporció de fibres blanques i vermelles depèn principalment de l'estil de vida del peix (Boddeke i col. 1995), sent els peixos pelàgics els que presenten una major proporció de múscul vermell, mentre que els peixos de vida sedentària mostren una major proporció de musculatura blanca (Videler 1993). El múscul blanc en general representa el 35-50% del pes corporal, encara que en els mascles de salmó i tonyina pot arribar a ser gairebé el 70%, i el color blanc que presenta és causat per una baixa vascularització i una manca de mioglobina (Videler 1993). Aquestes fibres blanques es contrauen a una alta velocitat tot produint una forta contracció; però els animals s'extenuen ràpidament. Les fibres de musculatura blanca contenen pocs mitocondris i principalment produeixen ATP a través de la hidròlisi de la fosfocreatina emmagatzemada (Videler 1993). Les fibres vermelles representen aproximadament el 0,5-13% de la massa corporal (revisat per Dickson 1996) i el color vermell es deu a una alta irrigació sanguínia i a la presència de mioglobina (Beamish 1978). Aquestes fibres contenen un elevat nombre de mitocondris i l'activitat dels enzims oxidatius és més elevada que en la musculatura blanca (Beamish 1978). La musculatura vermella es contrau lentament, i les fibres pràcticament no s'esgoten degut al seu metabolisme aeròbic, produint energia en els mitocondris. Pel que fa a les fibres roses, situades entre les vermelles i les blanques, produeixen energia a través de processos metabòlics aeròbics (Videler 1993).

La musculatura dedicada a la locomoció dels peixos és relativament simple: se situa al voltant de l'esquelet axial, està distribuïda en miòtoms, i les fibres musculars lentes i ràpides estan espacialment separades. D'altra banda, i en contrast amb els mamífers en els quals el reclutament de noves fibres musculars esquelètiques acaba poc després del naixement (Goldspink 1972) tot limitant el desenvolupament i el creixement muscular a la hipertròfia, els peixos tenen la capacitat de reclutar noves fibres musculars esquelètiques al llarg de la seva vida larvària, juvenil i adulta (Weatherley i col. 1988). El patró de distribució del nombre de fibres i de la mida d'aquestes, i el patró de capil·lars que envolta cada fibra en una secció particular del múscul es coneix comunament com cel·lularitat muscular i capil·larització muscular, respectivament (Johnston 1999; Stoiber i col. 2002). D'altra banda, la cel·lularitat muscular és també el principal determinant del creixement del múscul i de la qualitat de la carn (Johnston 1999). Pel que fa al creixement muscular en peixos, és una mescla complexa d'hipertròfia (increment de la mida de les cèl·lules) i hiperplàsia (increment del nombre de cèl·lules) principalment del múscul blanc, sent la hiperplàsia el que determinarà la mida final de l'animal (Weatherley i col. 1987; Davison 1997).

Quan l'exercici de natació és moderat (velocitats per sota de $1,5 \text{ LC}\cdot\text{s}^{-1}$) en els peixos teleostis, s'observa un augment del diàmetre de les cèl·lules i del nombre de fibres en el múscul aeròbic (Davie i col. 1986), independentment del tipus de règim d'exercici (Pelster i col. 2003; Martin i Johnston 2006; van der Meulen i col. 2006). Els efectes sobre el múscul blanc encara són controvertits. Alguns estudis han reportat que la natació no té cap efecte sobre la cel·lularitat del múscul blanc (Davie i col. 1986; Sänger 1992), però d'altres mostren un augment en el diàmetre de la fibra muscular (Hinterleitner i col. 1992; Davison 1994).

Depenent del tipus d'exercici i de la durada s'ha descrit, per exemple, que la truita irisada no varia el diàmetre de les fibres, però sí n'augmenta el nombre tot indicant hiperplàsia (Rasmussen i col. 2011). En canvi en d'altres estudis, quan l'exercici conduïa a un major creixement, sí que es trobà hipertròfia en les fibres del múscul blanc (Bugeon i col. 2003; Martin i Johnston 2005). També s'ha demostrat que la capacitat aeròbica dels músculs dedicats a la natació es veu incrementada a causa de l'exercici (Farrell i col. 1991). Pel que fa als efectes de l'entrenament sobre la capil·larització, les dades existents són també controvertides. Per exemple, no s'observaren canvis significatius de capil·larització a nivell muscular en salmònids (Johnston i Moon 1980; Davison 1983), mentre que en ciprínids (Sänger 1992) i en la truita irisada (Davie i col. 1986) l'exercici va donar lloc a una major capil·larització, principalment en el múscul vermell. També en les larves del peix zebra, l'exercici incrementà la capil·larització en els dos músculs, vermell i blanc (Pelster i col. 2003).

Les diferències en la morfologia del múscul vermell i del múscul blanc, la orientació, la ultraestructura i la innervació que permet el reclutament d'un tipus de fibres o unes altres depenent del tipus de natació, ha estat clàssicament revisat per diversos autors (Bone 1966; Johnston 1981; Rome i col. 1988).

1.3.2. Velocitat de natació i metabolisme energètic

Tradicionalment, la natació del peix s'ha dividit en tres categories principals:

La *natació sostinguda o de resistència*, definida per Beamish al 1978, és una velocitat de natació que es pot mantenir durant més de 200 min abans que aparegui l'esgotament muscular. Està principalment recolzada pel metabolisme aeròbic en la musculatura vermella, la qual es caracteritza per una gran vascul·larització i compta també amb una petita contribució del múscul blanc (Moyes i West 1995; Coughlin 2002). Per altra banda, la natació sostinguda representa el tipus de natació utilitzada durant la major part del temps pels peixos a la natura, ja que aquest tipus d'activitat es pot mantenir durant llargs períodes. No obstant això, en situacions determinades, la capacitat de natació sostinguda és superada. Clars exemples serien les interaccions depredador-presa (Beamish 1978) o moments concrets durant les migracions (Hinch i Rand 1998; Standen i col. 2002), en què s'utilitza un tipus de natació més explosiu durant períodes curts de temps.

La *natació prolongada* va ser classificada per Beamish (1978) com aquella que pot ser mantinguda entre 20 segons i 200 minuts abans que aparegui l'extenuació fisiològica. Representa un entremig entre la velocitat sostinguda i la d'explosió. La natació prolongada la produeix en la musculatura vermella i la blanca, però és principalment suportada per glucòlisi anaeròbica en el múscul blanc (Wood 1991; Milligan 1996), donant lloc a una reducció significativa dels subministraments energètics intracel·lulars com ara l'ATP, la fosfocreatina i el glicogen, i a una acumulació de lactat (Driedzic i Hochachka 1976; Dobson i Hochachka 1987).

La *natació explosiva*, es defineix com la natació que pot ser mantinguda durant menys de 20 segons (Beamish 1978). Aquesta natació és important en les fugides davant de

predadors o per capturar preses. En aquest tipus de natació hi intervé exclusivament la musculatura blanca, obtenint la seva energia de processos anaeròbics.

El mètode de natació entre la prolongada i l'explosiva es defineix com la natació "*burst and glide*" (Weihs 1974), i és un comportament de natació que consisteix en un moviment cíclic d'explosió seguit d'un lliscament. Weihs (1974) va predir que utilitzant aquesta modalitat de natació s'estalviava entorn del 50% d'energia, comparant-ho amb d'altres tipus de natació (Videler 1981).

Generalment, l'energia utilitzada per la natació deriva de l'oxidació de substrats rics energèticament: proteïnes, lípids i carbohidrats obtinguts de l'alimentació. Els processos d'oxidació redueixen l'energia requerida per produir compostos altament energètics tals com l'ATP, el qual és utilitzat pels músculs com a font energètica per generar forces de contracció. Per tant, la mesura de la captació d'oxigen es una estimació dels costos de la natació (Tudorache i col. 2013). Així, la diferència entre la taxa de consum d'oxigen en un estat d'activitat màxima (aeròbic) i el repòs, indica la màxima quantitat d'oxigen disponible per a un peix a una temperatura determinada per tal de cobrir els costos energètics de tot tipus d'activitat biològica (Wieser 1985).

Tradicionalment, els test de natació forçada s'han utilitzat per estimar les capacitats de natació i el metabolisme energètic dels peixos. A partir d'aquí, podem definir diverses velocitats de natació:

La *velocitat màxima o crítica* que pot assolir un peix mentre neda de forma continuada es defineix com U_{crit} , i és aquella en la qual s'observa un màxim consum d'oxigen de manera sostinguda (Brett 1964). Aquest tipus de natació no només és de caràcter aeròbic, sinó que també pot ser anaeròbic. S'ha descrit que els resultats obtinguts en els tests per determinar la U_{crit} són dependents de l'increment de velocitat i de l'interval de temps (Farrell 2007). La U_{crit} ha estat útil en els salmònids per entrenar-los aeròbicament, establint la màxima velocitat en valors per sota del 80% de la U_{crit} , encara que el percentatge depèn de l'espècie de peix estudiada. Es considera que la velocitat de natació en la U_{crit} o per sobre d'aquest valor genera un deute d'oxigen (natació anaeròbica) i, eventualment, dona lloc a l'esgotament o fatiga de l'animal (Jones 1982). Particularment, l'ús de respiròmetres acoblats a túnels de natació ha permès als investigadors aplicar tests d'exercici graduats, on s'utilitza la disminució del contingut d'oxigen en l'aigua en front del temps, per calcular la taxa metabòlica del peix (MO_2) com una funció de la velocitat de natació (U_{crit}). La utilització de la mesura de la U_{crit} ha estat una eina valuosa per estandaritzar les condicions experimentals, permetent el desenvolupament de protocols de natació aeròbics o anaeròbics per a l'estudi de l'ús de l'energia metabòlica en els peixos.

La *velocitat òptima de natació* (U_{opt}) és aquella en que es realitza menys treball per metre i, per tant, és la velocitat de natació més eficient en termes d'energia oxidativa (Tucker 1970). Aquest tipus de natació ha estat usada per avaluar l'economització d'activitats rutinàries i les migracions (Hinch i Rand 2000; Palstra i col. 2008), així com els comportaments que maximitzen el guany energètic (Weihs 1973). És per això que la seva importància recau en

l'afectació del creixement per a una ingesta d'aliments determinada (Totland i col. 1987; Christiansen i col. 1985; Davison 1997; Palstra i col. 2010). Aquesta velocitat òptima també es pot calcular mitjançant mesures d'oxigen en un rang de velocitats de natació en un respiròmetre.

La *velocitat de natació preferent*, representa un altre enfocament conductual de la velocitat de natació amb el menor cost energètic. Les velocitats que es podrien reproduir en instal·lacions aqüícoles serien properes a la U_{opt} , ja que són les que produeixen els mínims costos (Videler 1993). El que no és tan clar és si els animals es decantarien per una natació a velocitats classificades com a òptimes si se'ls donés l'opció de triar; per això s'han descrit les velocitats de natació preferents (Tudorache i col. 2011). Donat que es coneix la relació entre exercici i creixement òptim en peixos cultivats, presentant aquests una major eficiència de conversió de l'aliment (Davison 1997; McDonald i col. 1998), una millora evident del creixement muscular (Davison i Goldspink 1977; Johnston i Moon 1980; Totland i col. 1987) i també de la qualitat del filet (Totland i col. 1987; Tsuchimoto i col. 1988), les velocitats preferents es presenten com una mesura preferible per a determinar velocitats de natació per a instal·lacions d'aqüicultura.

Tot i la capacitat fisiològica dels peixos per mantenir tots els tipus de natació, aquesta capacitat sembla ser diferent entre les espècies, sobre les quals hi influeixen altres factors com ara la temperatura, la qualitat de l'aigua, l'estrès, la densitat de peixos, la quantitat i qualitat de l'aliment, el règim d'alimentació, etc. L'entrenament ha de ser el correcte o òptim en quant a la velocitat de natació, tenint en compte també que ha de ser una natació continuada enlloc d'una natació intermitent. Per exemple, la majoria de salmònids presenten un increment del creixement quan són sotmesos a exercici sostingut, sempre i quan la natació s'acosti a l'òptim (U_{opt}) (Davison 1997; Azuma 2001; Bugeon i col. 2003; Grünbaum i col. 2008). Si aquestes velocitats són més elevades (i probablement més baixes també) provocarien menys millora en el creixement (Bugeon i col. 2003). En el salmó Atlàntic (*Atlantic salmon*), exercicis pròxims a la U_{opt} causen un augment en les taxes de creixement, les taxes de conversió dels aliments, i una reducció dels nivells de cortisol en plasma, tot suggerint nivells menors d'estrès (Herbert i col. 2011). Les dues espècies de truita, la irisada i la comuna, també presenten un millor creixement quan són exercitades (Davison i Goldspink 1977; Houlihan i Laurent 1987; Davison 1997; Bugeon i col. 2003), tot i que no sempre va acompanyat d'augment de longitud dels animals (Martin i Johnston 2005; Rasmussen i col. 2011). Així i tot, hi ha estudis que conclouen que en determinats estadis de vida de la truita, no hi ha afectació del creixement degut a l'exercici (Deschamps i col. 2009), però que aquest ajuda a reduir les anomalies vertebrals. D'altres, relacionen l'exercici amb millores en el creixement de la truita quan es troba en condicions d'elevades densitats i temperatures (19°C) (Larsen i col. 2012), mentre que a 14°C sembla que això no es dona (McKenzie i col. 2012). Existeixen però, espècies de salmònids pels quals no s'han descrit efectes beneficiosos de l'exercici, com per exemple el salmó reial (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Kiessling i col. 2005; Hoffnagle i col. 2006). I també d'altres espècies com el bacallà (*Gadus morhua*) (Bjørnevik i col. 2003; Karlsen i col. 2006) o la carpa

(*Cyprinus carpio*) (Davison i Goldspink 1978; Martin i Johnston 2006), no presenten millor creixement en condicions d'exercici.

També es creu que els peixos que presenten estils de vida actius, amb un gran ventall metabòlic, es beneficiaran d'un règim d'exercici. En aquest sentit, els salmònids i les espècies pelàgiques, com per exemple el sorell daurat (*Seriola lalandi*) o l'orada (*Sparus aurata*), és d'esperar que es beneficiïn de l'exercici ja que el seu hàbitat natural o ecotipus implica el moviment d'aigua, i la seva rutina comportamental inclou la natació en el seu estil de vida actiu. No obstant, quan d'altres espècies de peixos no salmònids i espècies no pelàgiques són sotmeses a exercici, també en treuen un benefici, com per exemple la matrixà (*Brycon amazonicus*) (Arbeláez-Rojas i Moraes 2009, 2010).

L'exercici també permet una reducció de l'estrès en diverses espècies de peixos i redueix els efectes de les jerarquies en les gàbies (Palstra i Planas 2011). En salmònids que es troben en processos d'exercitació òptims, s'han observat reduccions en els nivells de cortisol (Woodward i Smith 1985; Boesgaard i col. 1993; Herbert i col. 2011). Un altre exemple n'és el treball de Brannas (2009), qui va observar que en la truita Àrtica (*Arctic charr*), la natació va trencar les jerarquies i els animals van créixer de manera més uniforme. Per altra banda, Castro i els seus col·laboradors (2011), van veure en salmó Atlàntic sotmès a exercici una millora de la resistència a malalties, amb canvis en la regulació dels gens que es coneix que estan involucrats en la resposta immunitària. També s'ha descrit que el múscul exercitat, per si sol, té un paper important sobre el sistema immune ja que l'exercici incrementa la producció de mioquines (Palstra i Planas 2011).

1.3.3. Selecció del combustible en la natació

La interacció entre la natació i el metabolisme s'ha estudiat durant més de cinc dècades. Els primers estudis es basaven en els canvis de la composició proximal dels peixos o en respirometria durant la natació sostinguda (Brett 1964, 1973). En particular l'ús de respirometria en túnels de natació, en què l'oxidació s'estima a partir de les taxes de consum d'O₂ (MO₂), la producció de CO₂ (MCO₂) i l'excreció total de nitrogen (M_{nitrogen}), ha estat de gran utilitat per revelar canvis en l'ús dels lípids, els carbohidrats i les proteïnes. Lauff i Wood (1996a) van desenvolupar un mètode instantani per calcular la proporció relativa de lípids, carbohidrats i proteïnes que s'oxiden. Canvis en els quocients de respiració (RQ=MCO₂/MO₂) i en els quocients de nitrogen (NQ=M_{nitrogen}/MO₂), així com canvis en els marcadors de preferències d'ús dels combustibles metabòlics, mostren que el múscul de peix pot fer ús dels tres substrats per obtenir energia, a diferents nivells, durant la natació sostinguda (Lauff i Wood 1996b; Lauff i Wood 1997; Kieffer i col. 1998). No obstant això, en investigació, l'ús de calorimetria indirecta per estimar la utilització de combustible metabòlic en els peixos no s'ha repetit des de finals de la dècada dels 90, probablement degut a les dificultats que presenten aquest tipus de mesures. Wood i els seus col·laboradors van obtenir estimacions precises de l'oxidació de proteïnes utilitzant aquesta metodologia. Però pel que fa a la quantificació de l'oxidació de lípids i

carbohidrats per calorimetria indirecta, s'ha demostrat que és particularment difícil per als animals aquàtics, així com la mesura de MCO_2 que també resulta difícil de mesurar amb precisió a l'aigua. Els valors d'oxidació de lípids i carbohidrats calculats per calorimetria indirecta s'han de considerar amb certa cautela, ja que aquests valors probablement no reflecteixen les veritables taxes d'oxidació d'aquests combustibles. Això es deu al fet que mai s'ha fet una mesura directa de l'oxidació dels FA (àcids grassos) o de la glucosa *per se* en peixos en repòs o en peixos que naden, *in vivo*. A més a més, la infusió *in vivo* de glucosa (Blasco i col. 1996, 2001; Haman i Weber 1996; Haman i col. 1997; Shanghavi i Weber 1999), FA (Haman i col. 1997; Bernard i col. 1999), TAG (triacilglicèrids) (Magnoni i col. 2008) i de lactat (Weber i col. 1986; Omlin i Weber 2010) marcats radioactivament en la circulació del peix, ha estat útil per mesurar la taxa de recanvi (*turnover*) metabòlic i, així, poder estimar la utilització dels diferents substrats. Aquesta metodologia també ha esdevingut exitosa per a obtenir estimacions de la utilització dels diferents substrats durant la natació sostinguda (Bernard i col. 1999; Shanghavi i Weber 1999; Magnoni i col. 2008).

Pel que fa als canvis que provoca l'exercici sobre el múscul, s'ha observat que velocitats de natació lentes incrementen l'activitat de la majoria d'enzims metabòlics en el múscul vermell, i depenent de les espècies i de la velocitat, també en el múscul blanc (Davison i Glodspink 1978; Davison 1997). Així, les dades sobre l'ús instantani del combustible metabòlic i la composició del múscul vermell de juvenils de truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) sota condicions d'exercici, demostraren que les preferències pel substrat utilitzat canvien en modificar la durada i la intensitat de l'exercici (Lauff i Wood 1996b; Richards i col. 2002b).

Els primers estudis van suggerir que els **lípid**s són el combustible metabòlic més utilitzat durant la natació sostinguda en els peixos (Driedzic i Hochachka 1978; Walton i Cowey 1982). Una evidència més de la major utilització dels lípid's durant l'exercici aeròbic prové dels estudis *in vitro*, que demostren la gran capacitat del múscul vermell per a la captació i oxidació dels FA (Bilinski i Jonas 1964; Moyes i col. 1989; Kiessling i Kiessling 1993). En el cas de juvenils de truita irisada, els quocients respiratoris durant la natació sostinguda confirmen que els lípid's són el combustible preferent durant aquest tipus de natació, per l'elevada proporció de lípid's emprats per donar suport a la natació a diferents velocitats aeròbiques (Lauff i Wood 1996b). Això també ha estat recolzat per altres estudis en truita que mostren un elevat flux de lípid's en forma de lipoproteïnes en circulació, juntament amb un augment de l'activitat de la lipoproteïna lipasa en el múscul vermell durant la natació sostinguda (Magnoni i Weber 2007; Magnoni i col. 2008). Sorprenentment, i en contrast amb el que succeeix amb l'exercici sostingut en mamífers, els FA no esterificats que són transportats en el plasma no semblen ser un combustible metabòlic important durant l'exercici sostingut en els peixos (Bernard i col. 1999). Els lípid's també juguen un paper important en les migracions de l'anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Van Ginneken i Van den Thillart 2000) i del salmó vermell (*Oncorhynchus nerka*) (Magnoni i col. 2006), aportant l'energia necessària quan els peixos en dejú han de fer front a les demandes energètiques imposades per la natació sostinguda. Aquests casos extrems d'ús de l'energia exemplifiquen en peixos l'important paper de les reserves de lípid's del

cos, que proporcionen ATP a través de la β -oxidació (Frøyland i col. 2000; Tocher 2003). Per altra banda, diversos estudis han descrit que l'exercici té forts efectes, però variables, sobre la deposició de lípids depenent de l'espècie i el règim d'exercici, tot i que es coneix que els canvis més significatius tenen lloc en el múscul vermell (Anttila i col. 2010; Rasmussen i col. 2011; Arbeláez-Rojas i Moraes 2009, 2010).

La contribució que fan els **carbohidrats** en el subministrament d'energia per a dur a terme l'exercici no sembla estar ben definit en peixos. Els fluxos circulatoris de glucosa suggereixen que l'ús d'hidrats de carboni en adults de truita no és important a velocitats baixes de natació (Shanghavi i Weber 1999). Per contra, l'RQ en juvenils de truita irisada suggereix que els carbohidrats fan una contribució relativament gran (40%) durant la natació sostinguda a baixes temperatures (Kieffer i col. 1998). Aquestes dades estan en concordança amb les obtingudes en estudis anteriors en què juvenils de truita irisada presentaven una utilització important dels carbohidrats com a combustible metabòlic (entre el 30-45%) durant les primeres 12 hores nedant a una velocitat de natació baixa (Lauff i Wood 1996b; Lauff i Wood 1997). El subministrament basal dels carbohidrats com a combustible en la truita, va oscil·lar entre l'11 i el 23% quan es mesurà per calorimetria indirecta (Lauff i Wood 1996a; Lauff i Wood 1996b; Kieffer i col. 1998). Valors similars (11-22%) van ser calculats per Blasco i col. (2001) després d'una infusió de glucosa marcada radioactivament amb C^{14} en truites en repòs. A més a més, Lauff i Wood (1996b) van trobar que la proporció d'hidrats de carboni utilitzats esdevé considerable quan la velocitat de natació s'acosta a la U_{crit} , el que suggereix a la vegada un augment en el reclutament del múscul blanc quan el peix neda a velocitats més elevades (Moyes i West 1995). La mobilització de glicogen des del múscul locomotor, en particular el múscul blanc, pot abastir en certa mesura els requeriments per a la natació sostinguda. Aquest paper o "rol" ha estat determinat per la disminució gradual dels nivells de glicogen mesurats en el múscul de peixos que nedaven a velocitats inferiors al 80% de la U_{crit} (Ozorio 2008). No obstant això, una elevada taxa d'utilització dels carbohidrats (30-40% de la MO_2) després de 60 hores de natació al 60% de la U_{crit} resultaria inabastable, ja que les reserves de glicogen podrien no ser suficients per a aquest ús prolongat, especialment en juvenils de truita irisada en període de creixement. Com s'ha indicat anteriorment, els valors obtinguts per calorimetria indirecta (Lauff i Wood 1996b; Lauff i Wood 1997) probablement no reflecteixen les veritables taxes d'oxidació dels carbohidrats. A més, la infusió continuada, *in vivo*, de glucosa marcada radioactivament (Shanghavi i Weber 1999) no permet fer una distinció entre la contribució relativa de l'oxidació dels carbohidrats al MO_2 en repòs o durant la natació. La raó d'aquesta incertesa és que les dades d'infusió continuada recauen únicament en el flux total de glucosa, que no només depèn dels canvis en l'oxidació de la glucosa *per se*, sinó també en els canvis en la disposició de la glucosa no-oxidativa. A més a més, si els canvis resulten ser oposats en ambdós components relacionats amb l'ús de la glucosa, es pot emascarar qualsevol efecte sobre el flux total de glucosa.

Els primers estudis suggerien que les **proteïnes** juguen un paper important com a combustible metabòlic durant la natació aeròbica en els peixos teleostis (Driedzic i Hochachka

1978; Walton i Cowey 1982; Van den Thillart 1986). Tanmateix, els estudis de calorimetria indirecta realitzats en juvenils de truita irisada indiquen que la proporció de proteïnes utilitzades com a combustible metabòlic és relativament petita (<30%) (Alsop i Wood 1997; Lauff i Wood 1997; Kieffer i col. 1998), i no canvia essencialment amb la velocitat de natació (Lauff i Wood 1996b). Les seves dades demostraren que els peixos augmenten l'ús relatiu de la proteïna a mesura que avançava l'experiment, seguint un patró oposat al dels carbohidrats, el que probablement estava reflectint l'efecte del dejuni en la truita sotmesa a natació. L'ús de proteïnes com a combustible oxidatiu s'espera que sigui baixa, particularment durant la locomoció, ja que l'animal redueix el catabolisme de proteïnes funcionals i l'energia necessària per a l'excreció de nitrogen (McCue 2010). Sembla raonable que els peixos intentin estalviar proteïnes, donat l'elevadíssim cost metabòlic per a la seva síntesi (Smith i Houlihan 1995) i el paper integral que juguen aquestes com a unitats contràctils durant la natació. Una excepció a aquest fet té lloc durant la migració natural del salmó vermell (*Oncorhynchus nerka*), quan els peixos deixen d'alimentar-se a l'entrada del riu i tots els altres combustibles s'esgoten abans de la fresa (Mommsen i col. 1980). De totes maneres, aquest patró de selecció de combustible en el salmó vermell, no és sostenible i condueix a un dany irreversible dels teixits i a la mort de l'animal.

L'exercici de tipus explosiu ha estat ben estudiat, sobretot en salmònids. Diversos estudis mostren que l'ATP, la fosfocreatina, i les reserves de glicogen estan disminuïdes en el múscul blanc de la truita després d'un exercici intens (Wang i col. 1994; Richards i col. 2002b). A l'inici del període d'exercici, l'energia deriva del trencament de l'ATP i la fosfocreatina, després de la glicogenòlisi seguida per la glicòlisi, tot proporcionant la majoria d'ATP requerit per sostenir l'activitat muscular fins a l'esgotament (Dobson i Hochachka 1987; Richards i col. 2002a). L'àcid làctic produït durant la natació de tipus explosiva s'acumula com a lactat i protons metabòlics, que s'escapen cap a la circulació (Wood 1991; Milligan 1996). L'exercici exhaustiu produeix en la truita un augment en la taxa metabòlica la qual es redueix després de l'exercici, el que suggereix que el deute d'oxigen i l'aclariment del lactat no són processos necessàriament vinculats (Scarabello i col. 1992). A més a més, aquests autors suggereixen que dos períodes consecutius d'exercici són suficients per induir un "efecte d'entrenament", millorant les taxes de recuperació metabòlica.

1.4. ALIMENTACIÓ I RITMES BIOLÒGICS EN PEIXOS

1.4.1. Variabilitat rítmica diària i activitat d'anticipació a la ingesta

La característica bàsica dels ritmes biològics és que persisteixen sota condicions ambientals constants i en absència de qualsevol influència externa directa. Els cicles de llum-fosc i d'alimentació són dels factors més importants que influencien els ritmes biològics en els animals. A més a més, els organismes marins estan subjectes als cicles de les mareas i de la lluna. És conegut que les oscil·lacions que sustenten les funcions vitals dels éssers vius

proporcionen una organització temporal de les activitats fisiològiques i de comportament en pràcticament tots els grups d'organismes. Per exemple, en estat salvatge, el menjar no està disponible contínuament, sinó que és limitat tant pel lloc d'obtenció com per l'hora (López-Olmeda i Sánchez Vázquez 2010). Per contra, quan els àpats es lliuren a la mateixa hora cada dia, es pot observar un augment en l'activitat locomotora dels peixos unes hores abans de l'hora de la ingesta. Aquest fenomen es coneix amb el nom d'activitat d'anticipació a la ingesta (FAA, *Food Anticipatory Activity*) i persisteix tot i la manca d'alimentació (Mistlberger 1994). La FAA no només implica un comportament concret, sinó que també implica altres variables fisiològiques que permeten als animals optimitzar els processos digestius i metabòlics (Davidson i Stephan 1999; Stephan 2002). Si l'organisme és capaç d'anticipar-se a una propera ingesta, l'obtenció d'aliments i la utilització dels nutrients millorarà. De fet, diverses espècies de peixos mantingudes sota un règim d'alimentació periòdic han demostrat una sincronització dels seus ritmes de comportament i fisiològics de cara a un àpat (López-Olmeda i Sánchez Vázquez 2010). És àmpliament conegut que si els àpats es distribueixen de manera que coincideixen amb els ritmes d'alimentació dels peixos, s'aconsegueix una millora en el creixement (Azzaydi i col. 1999). En l'orada s'han descrit les variacions diàries i estacionals de la conducta alimentària en situacions d'auto-alimentació o *self-fed* (Velázquez i col. 2004), així com també s'han descrit els ritmes diaris d'activitat locomotora i de les hormones, cortisol i melatonina (López-Olmeda i col. 2009a; Sánchez i col. 2009), tot i que, fins al moment, se sap ben poc sobre els ritmes digestius en l'orada. En aquesta mateixa espècie Sánchez i col. (2009) van descriure majors nivells de glucosa en sang quan l'orada era alimentada de forma aleatòria, comparat amb orades alimentades de forma periòdica. No obstant, quan es permetia a l'orada alimentar-se a demanda, ja fos durant la fase de fosc o la de llum, no es veia cap efecte de l'hora d'alimentació sobre els nivells de glucosa (López-Olmeda i col. 2009a). Els ritmes diaris de la glucosa en aquesta espècie ja havien estat descrits prèviament (Pavlidis i col. 1997), però fins al moment, l'efecte d'un sol àpat proporcionat a l'animal ja fos de forma periòdica o aleatòriament, era desconegut. En diverses espècies de peixos com el llobarro (Cerdá-Reverter i col. 1998), la carpa (Kühn i col. 1986), la truita de riu (Pickering i Pottinger 1983), la truita irisada (Rance i col. 1982), el carpí daurat (Singley i Chavin 1975), el salmó Atlàntic (Thorpe i col. 1987) i l'orada (López-Olmeda i col. 2009b) també s'han descrit variacions diàries en els nivells de cortisol. També s'han observat en diverses espècies de peixos ritmes circadians en enzims involucrats en el metabolisme. Moltes d'aquestes variacions diàries són dependents de l'alimentació ja que desapareixen en els peixos dejunats (Polakof i col. 2007), mentre que els ritmes diaris d'altres enzims fins i tot es mantenen en els peixos dejunats (López-Olmeda i Sánchez-Vázquez 2010). Per tant, podem dir que l'hora d'alimentació en els peixos produeix un ajustament de diverses variables de la fisiologia intestinal, així com del sistema endocrí i de les activitats enzimàtiques i metabòliques, tot augmentant així la seva probabilitat d'èxit i minimitzant la despesa d'energia tal com passa en els mamífers (Dardente i Cermakian 2007; DeCoursey 2004).

Els peixos no són actius les 24 hores del dia, però normalment presenten una major activitat durant les hores de llum o durant les hores d'obscuritat depenent de l'espècie. No obstant hi ha espècies de peixos com l'orada que presenten un comportament dual, doncs els mateixos animals poden mostrar un comportament d'alimentació ja sigui diürn o nocturn (Sánchez-Muros i col. 2003; Velázquez i col. 2004). Això posa de relleu el rol de l'alimentació com un factor sincronitzador dels ritmes diaris en l'orada (López-Olmeda i col. 2009b). En moltes espècies, aquests patrons de comportament venen fixats genèticament degut a les pressions generades per les forces de la selecció, com per exemple la fugida dels depredadors, la disponibilitat de preses o l'optimització de la ingesta (Daan 1981). La majoria dels ritmes d'alimentació en peixos s'han descrit com a ritmes circadians, tot i que també s'han observat ritmes estacionals, llunars i de les mareas (López-Olmeda i Sánchez-Vázquez 2010).

1.5. ELS ISÒTOPS ESTABLES COM A TRAÇADORS METABÒLICS

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

Isòtops són totes aquelles formes d'un element donat (mateix pes atòmic) que contenen diferent nombre de neutrons. En els estudis de metabolisme, el terme "isòtop estable" s'aplica als isòtops no radioactius d'un element que són menys abundants que l'isòtop més abundant a la natura. A la taula 2 es mostra l'abundància natural dels isòtops estables més utilitzats en biologia. Com es pot observar, el C¹³ té una contribució de l' 1,11% al total de C i el N¹⁵ representa un 0,36% del total de N.

Taula 2: Abundància natural dels isòtops estables més utilitzats en biologia

H²	0,016%				
C¹³	1,11%				
N¹⁵	0,36%				
O¹⁷	0,04%	O¹⁸	0,20%		
S³³	0,75%	S³⁴	4,21%	S³⁶	0,02%

La composició isotòpica d'una mostra es calcula com la relació d'un isòtop respecte a un altre (C¹³/C¹², N¹⁵/N¹⁴). Donada la diferent proporció dels isòtops a la natura, la mesura de la composició isotòpica d'una mostra sol ser molt baixa. Per això, els resultats de composició isotòpica es normalitzen respecte a uns estàndards de referència i s'expressen en tant per mil (unitats δ).

L'ús dels isòtops estables ha incrementat substancialment des de la dècada dels 80. La raó principal ha estat l'aparició d'equips d'espectrometria de masses de relació isotòpica (IRMS, *Isotopic Ratio Mass Spectrometer*) i el desenvolupament de softwares de control i

d'adquisició de dades. Actualment, aquests espectròmetres permeten mesurar variacions isotòpiques molt petites (0,01%). La diferència de massa entre les formes isotòpiques d'un element provoca diferències de comportament durant els processos físics i les reaccions químiques. Les formes isotòpiques lleugeres (C^{12} o N^{14}) formen enllaços més dèbils i reaccionen més ràpidament que els isòtops pesats (C^{13} o N^{15}) (Hoefs 1980). Les diferències en l'energia d'enllaç i en les constants de reacció, fan que l'abundància natural dels isòtops estables variï en funció de les espècies químiques (Hoefs 1980; Farquhar i col. 1989; Hayes 1993). Aquest canvi en l'abundància isotòpica entre espècies químiques deguda a processos físics o químics, s'anomena fraccionament isotòpic. El fraccionament entre dues espècies químiques (A i B), o entre un substrat i un producte, es calcula com la diferència de composició isotòpica: $\delta A - \delta B$. Els processos de fraccionament fan que els diferents materials biològics tinguin una signatura característica. Així, per exemple, entre les diferents espècies químiques, els lípids estan empobrits en C^{13} en relació a altres compostos (DeNiro i Epstein 1977) ja que durant la síntesi dels lípids l'enzim piruvat deshidrogenasa oxida més ràpidament un grup carbonil amb C^{12} que un grup carbonil amb C^{13} (DeNiro i Epstein 1977; Hayes 1993). Durant la desaminació, els grups N^{14} -amino són eliminats preferentment, i com a conseqüència, el N excretat està enriquit en N^{14} en relació a la proteïna de l'animal (Steele i Daniel 1978). Els processos de transaminació també afavoreixen la mobilització dels grups amino amb N^{14} (Macko i col. 1986). Per aquestes raons, els animals d'un nivell tròfic superior (carnívors) presenten un nivell de δN^{15} superior que els animals d'un nivell tròfic més baix (herbívors), el que ha permès establir relacions tròfiques i dietes en paleontologia (revisat per Gannes i col. 1998), mesurar el flux d'energia i nutrients en ecosistemes (Peterson i Fry 1987; Rundel i col. 1989), etc., constituint-se així com una bona eina pels estudis mediambientals (Lajta i Michener 1994; Marino i McElroy 1991).

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

El N^{15} s'ha utilitzat en relativament pocs estudis de metabolisme proteic en peixos. En aquests estudis, s'ha mesurat la síntesi proteica administrant per via oral un 0,5 % i un 1% de N^{15} en la truita (Carter i col. 1994), en la palaia anglesa (Carter i col. 1998) i en la carpa (Meyer-Burgdorff i Rosenow 1995), o bé administrant per via venosa una sobrecàrrega de N^{15} -Fenilalanina en el salmó Atlàntic (Owen i col. 1999). Per altra banda, s'ha determinat la

biodisponibilitat d'aminoàcids en larves de *Diplodus puntazzo*, a partir de rotífers marcats amb N¹⁵ (Saavedra i col. 2007).

El carboni radioactiu (C¹⁴) s'ha emprat extensament en estudis de metabolisme, en canvi, sota el nostre coneixement, el C¹³ només s'ha utilitzat per estudiar la biodisponibilitat d'aminoàcids de la dieta en larves de peix (Conceição i col. 2003).

A diferència de la radioactivitat que es troba en quantitats ínfimes en la natura, els isòtops estables del N i del C es troben, de forma natural, en unes quantitats gens despreciables. Aquestes quantitats relativament elevades plantegen la qüestió de la dosi necessària d'isòtops per a ésser utilitzats com a traçadors de la proteïna de la dieta, és a dir, la quantitat mínima que cal administrar per via oral per marcar tots els múltiples destins de la proteïna de la dieta a diferents temps postprandials. Beltrán i col. (2009) van determinar que una dieta enriquida amb proteïna-N¹⁵ (10 g·kg⁻¹) i proteïna-C¹³ (30 g·kg⁻¹) presentava les proporcions adequades per determinar que els valors de delta (δ) dels components dels teixits eren prou elevats, per sobre dels nivells naturals, per permetre que la distribució de les proteïnes fos traçada 11 i 24 hores després de la ingesta d'aliment, revelant clares diferències metabòliques entre espècies. Beltrán i col. (2004a,b) van determinar l'ús i distribució de la proteïna de la dieta mitjançant el marcatge amb isòtops estables (N¹⁵ i C¹³) en la truita irisada i l'orada. Aquestes foren alimentades amb dietes que diferien en el percentatge de substitució de farina de peix per fonts proteïques vegetals. Per altra banda, es va observar en aquests mateixos estudis que les δ N¹⁵ de les dietes i dels teixits (abundància natural) disminuïen a mesura que augmentava la substitució, suggerint que la δ N¹⁵ es pot utilitzar com un marcador de destí de la proteïna de la dieta (Beltrán i col. 2009). A més, el fraccionament de N¹⁵ (δ N¹⁵ peix - δ N¹⁵ dieta) diferia entre els grups demostrant ser un bon indicador de catabolisme proteic.

Un teixit que mostra una baixa recuperació de marcador, ben bé podria ser un important lloc de dipòsit si l'oxidació és molt elevada. Per tant, cal considerar que aquest mètode proporciona una instantània de la quantitat de marcador present en un teixit en un temps determinat, després de l'administració del marcador. Encara que també permet obtenir una estimació del valor real d'oxidació, ja que es pot calcular per la diferència entre els valors coneguts de marcador ingerit per cada peix i la quantitat de marcador recuperat en el peix. Aquests valors d'oxidació serien només una estimació i no una quantificació precisa, ja que no consideren la quantitat de marcador que es perd amb l'aliment no digerit i la petita quantitat de glucosa que es perd a través de l'orina dels peixos quan aquests presenten elevades glicèmies (Blasco i col. 1996). Aquestes limitacions obliguen a considerar aquestes premisses alhora d'avaluar l'ús del midó-C¹³ com a marcador del destí dels carbohidrats de la dieta. Així i tot, els valors de recuperació del marcador obtinguts per Beltrán i col. (2004b) amb aquest mètode, són molt propers als valors obtinguts amb radioactivitat en un estudi anterior, on es va realitzar una sobrecàrrega de glucosa en la truita comuna (Blasco i col. 1996, 2001).

1.6. PERSPECTIVES

Els estudis sobre nutrició de peixos han fet més incís en la substitució de nutrients que a la seva assimilació, deposició i ús. Les discrepàncies en els resultats es refereixen no només a les diferències en la formulació de la dieta (principalment la relació proteïna/energia de les dietes experimentals), sinó també a les estratègies d'alimentació i condicions de cultiu utilitzades en els diferents estudis.

Existeix un equilibri en l'intercanvi de molècules en les diferents vies del metabolisme intermediari, ja que cap dels components implicats pot ser modificat sense afectar la funció dels altres. Per tant, cal administrar els **nutrients** de forma eficient i en les proporcions adequades per a poder ser utilitzats com a combustibles generadors d'energia, com a estructures que promoguin el creixement i com a dipòsits dels teixits en els espais temporals entre els àpats. Òbviament, els nutrients que requerirà el peix dependran de les necessitats energètiques del mateix. Els peixos carnívors presenten unes capacitats baixes tant de digestió com d'assimilació dels carbohidrats. No obstant, si s'estimula una situació de major demanda energètica mitjançant la variació de les condicions d'establació o de l'estratègia d'alimentació, una part significativa de proteïnes haurien de derivar cap a creixement i no pas a obtenció d'energia. Així, augmentant la despesa energètica de l'animal, se'l podria conduir a una major utilització d'una font energètica o una altra, o simplement fer que les utilitzés més eficientment.

Les estratègies de **natació** dels peixos juguen un paper important en la seva resposta als desafiaments de la vida, condicionant l'obtenció dels nutrients, les interaccions depredador-presa i la reproducció, així com també determinant la capacitat de migració. Els peixos de piscifactoria porten una vida en captivitat més sedentària que els que viuen lliures a la naturalesa. Estudis comparatius dels peixos de cria i salvatges revelen dades útils sobre els processos de domesticació dels peixos i permeten entendre millor com funcionen els processos de nutrició dels peixos i la seva fisiologia per, d'aquesta manera, millorar la producció. Diversos estudis han demostrat que els peixos salvatges tenen més capacitat de natació que els peixos de cria. Aquest és el cas de la truita de rierol (Vincent 1960), el salmó platejat (Brauner i col. 1994), el salmó de l'Atlàntic (McDonald i col. 1998) i l'orada (Basaran i col. 2007). En conseqüència, els peixos salvatges mostren majors capacitats aeròbiques i anaeròbiques. D'altra banda, les condicions de cria dels peixos també afecten a la qualitat del peix, amb dades de peixos de cultiu amb un major contingut de greix que els salvatges (Vincent 1960; Thorstad i col. 1997; Grigorakis i col. 2002). És per això que l'exercici, com a condició de cultiu, desperta diversos focus d'interès per als investigadors i desplega un ampli ventall de millores de la qualitat del producte d'aqüicultura per als productors. A més a més, per la seva naturalesa, el peix pot ser fàcilment exercitat obligant-lo a nedar contra la corrent. S'ha demostrat que velocitats de natació de dues longituds corporals per segon ($LC \cdot s^{-1}$) o inferiors són acceptables per entrenar als peixos sense que es perjudiqui notablement el seu benestar o provoqui estrès a l'animal (Sänger i Stoiber 2001). Així, sotmetent els animals a una natació moderada però sostinguda en el temps, augmentaran la despesa energètica. Per tant,

balancejar les dietes dels peixos tenint en compte els canvis metabòlics combinats amb la condició d'exercici, pot ser una bona estratègia per reduir els costos i el temps de producció. A la vegada, també es reduiria l'impacte sobre el medi ambient gràcies al manteniment dels *stocks* de peixos i disminuint l'abocament de nitrogen al medi.

En condicions de cultiu, la **disponibilitat d'aliments** sovint es limita a un sol àpat al dia i l'ús eficient dels nutrients que rep el peix té conseqüències econòmiques i mediambientals negatives (pels residus d'aliments no ingerits). Aquesta situació de cultiu és fàcilment millorable quan s'estableixen cicles d'alimentació, ja que aquests horaris actuen com a sincronitzadors per tal que es porti a terme la ja comentada activitat d'anticipació a la ingesta (Boulos i Terman 1980; Spieler 1992; Mistlberger 1994; Azzaydi i col. 2007; Mistlberger 2009), amb les avantatges fisiològiques que implica. Si les necessitats energètiques de l'orada varien al llarg del dia (Sánchez-Muros i col. 2003) i els cicles d'alimentació determinen ritmes diaris en els peixos, aleshores, l'ús dels nutrients hauria de variar en consonància. Alguns estudis han demostrat que en l'orada, els carbohidrats poden reemplaçar parcialment la proteïna, millorant la taxa de creixement i evitant pèrdues de nitrogen (Metón i col. 1999; Couto i col. 2008; Enes i col. 2008 i revisat per Enes i col. 2011). Així, per aconseguir una optimització en l'eficiència de la dieta que es tradueixi en retenció proteica i, conseqüentment en creixement, caldria testar diferents estratègies d'alimentació dels animals, aportant a través de la dieta la font d'energia indicada en cada moment del dia.

1.7. BIBLIOGRAFIA

- Alsop DH i Wood CM (1997)** The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 200:2337-2346.
- Adams CE, Huntingford FA, Krpal J, Jobling M, Burnett SJ (1995)** Exercise, agonistic behavior and food acquisition in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Environ Biol Fishes* 43:213-218.
- Anderson AJ i Arthington AH (1989)** Effect of dietary lipid on the fatty acid composition of silver perch (*Leiopotherapon bidyanus*) lipids. *Comp Biochem Physiol B* 93:715-720.
- Anttila K, Jäntti M, Mänttari S (2010)** Effects of training on lipid metabolism in swimming muscles of sea trout (*Salmo trutta*). *J Comp Physiol B* 180:707-714.
- APROMAR (2009)** Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. La acuicultura marina de peces en España. Apromar, Cádiz, pp. 67.
- APROMAR (2011)** Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. La acuicultura marina de peces en España. Apromar, Cádiz, pp. 76.
- Arbeláez-Rojas GA i Moraes G (2009)** Sustained swimming and stocking density interaction in the performance and body composition of matrinxã, *Brycon amazonicus* juveniles. *Cienc Rural* 39:201-208.
- Arbeláez-Rojas G i Moraes G (2010)** Optimization of sustaining swimming speed of matrinxã *Brycon amazonicus*: performance and adaptive aspects. *Sci Agr* 67:253-258.
- Arzel J, Cardinal M, Cornest J, Metailler R, Stephan G, Guillaume JC (1993)** Nutrition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater, effects of dietary lipid on growth performances, body composition and egg quality. *World Aquaculture* 93:26-28 Mayo, Torremolinos, España.
- Arzel J, Metailler R, Le Gall P, Guillaume J (1998)** Relationship between ration size and dietary protein level varying at the expense of carbohydrate and lipid in triploid brown trout fry, *Salmo trutta*. *Aquaculture* 162:259-268.
- Atherton WD i Aitken A (1970)** Growth, Nitrogen Metabolism and Fat Metabolism in *Salmo gairdneri*, Rich. 4. *Comp Biochem Physiol* 36:7-19.
- Azuma T (2001)** Can water-flow induce an excellent growth of fish; effects of water flow on the growth of juvenile masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *World Aquaculture*, 26-29 Dec.
- Azzaydi M, Martínez FJ, Zamora S, Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA (1999)** Effect of meal size modulation on growth performance and feeding rhythms in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 170:253-266.
- Azzaydi M, Rubio VC, Martínez FJ, López FJM, Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA (2007)** Effect of restricted feeding schedule on seasonal shifting of daily demand-feeding pattern and food anticipatory activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chronobiol Int* 24:859-74.

- Ballestrazzi R i Mion A (1993)** I lipidi nell'alimentazione dei pesci teleostei. *Riv Ital Acquacoltura* 28:155-173.
- Ballestrazzi R, Lanari D, Dagaro E, Mion A (1994)** The effect of dietary-protein level and source on growth, body-composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 127:197-206.
- Basaran F, Ozbilgin H, Ozbilgin YD (2007)** Comparison of the swimming performance of farmed and wild gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquac Res* 38:452-456.
- Beamish FWH (1978)** Swimming capacity. In: Hoar WS, Randall DJ (Eds.) *Fish Physiology*, vol 7. Academic Press, New York, pp. 101-187.
- Beltrán M, Fernández-Borrás J, Médale F, Pérez-Sánchez J, Kaushik S, Blasco J (2004a)** A stable isotope (¹³C) approach to analyse protein carbon flow in rainbow trout and gilthead sea bream: effect of diets. *Aquaculture Europe. Biotechnologies for Quality*. Barcelona 2004, Spain.
- Beltrán M, Blasco J, Fernández-Borrás J, Teixidor P (2004b)** Stable isotopes as tracers of dietary protein in fish. Third Meeting of the French Stable Isotope Society. Paris 2004, France.
- Beltrán M, Fernández-Borrás J, Médale F, Pérez-Sánchez J, Kaushik S, Blasco J (2009)** Natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquacult Nutr* 15:9-18.
- Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Kaushik S, Perez-Sanchez J (2007)** Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267:199-212.
- Bergot F i Breque J (1983)** Digestibility of Starch by Rainbow trout - Effects of the Physical State of Starch and of the Intake Level. *Aquaculture* 34:203-212.
- Bernard SF, Reidy SP, Zwingelstein G, Weber J-M (1999)** Glycerol and fatty acid kinetics in rainbow trout: effects of endurance swimming. *J Exp Biol* 202:279-288.
- Bilinski E i Jonas RE (1964)** Utilization of lipids by fish. II. Fatty acid oxidation by a particulate fraction from lateral line muscle. *Can J Biochem Physiol* 42:345-352.
- Bjørnevik M, Karlsen Ø, Johnston IA, Kiessling A (2003)** Effect of sustained exercise on white muscle structure and flesh quality in farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac Res* 34:55-64.
- Blasco J, Fernández-Borrás J, Marimon I, Requena A (1996)** Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *J Comp Physiol B* 165:534-541.
- Blasco J, Marimon I, Viaplana I, Fernández-Borrás J (2001)** Fate of glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiol Biochem* 24:247-258.

- Boddeke R, Slijper EJ, van der Stelt A (1995)** Histological characteristics of the body musculature of fishes in connection with their mode of life. *Proc Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen C Biol Med Sci* 62:566-578.
- Boesgaard L, Nielsen ME, Rosenkilde P (1993)** Moderate exercise decreases plasma cortisol levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol A* 106:641-643.
- Bone QC (1966)** On the function of the two types of myotomal muscle fiber in elasmobranch fish. *J Mar Biol Ass* 46:321-349.
- Borrebaek B, Waagbø R, Christophersen B, Tranulis MA, Hemre GI (1993)** Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol B* 106:833-836.
- Boulos Z i Terman M (1980)** Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci Biobehav Rev* 4:119-131.
- Brannas E (2009)** The effect of moderate exercise on growth and aggression depending on social rank in groups of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Appl Animal Behav Sci* 119:115-119.
- Brauge C, Corraze G, Médale F (1995)** Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth-performance, body-composition, nitrogen-excretion and plasma-glucose levels in rainbow trout reared at 8-Degrees-C or 18-Degrees-C. *Reprod Nutr Dev* 35:277-290.
- Brauner CJ, Iwama GK, Randall DJ (1994)** The effect of short-duration seawater exposure on the swimming performance of wild and hatchery-reared juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Can Special Publ Fisheries Aquatic Sci* 51:2188-2194.
- Brett JR (1964)** The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. *J Fish Res Board Can* 21:1183-1226.
- Brett JR (1973)** Energy expenditure of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, during sustained performance. *J Fish Res Board Can* 30:1799-1809.
- Buchanan CI i Marsh RL (2002)** Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol A* 133:1101-1107.
- Bugeon J, Lefevre F, Fauconneau B (2003)** Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise. *Aquac Res* 34:1287-1295.
- Bureau DP (1997)** Digestibility of rendered animal protein ingredients for salmonids: A review of recent studies. National Renderers Association 64th Annual Convention, 4-8 Nov. 1997, Tucson, Arizona.
- Burel C, Boujard T, Kaushik SJ, Boeuf G, Van der Geyten S, Mol KA, Kuhn ER, Quinsac A, Krouti M, Ribailier D (2000a)** Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilisation and thyroid status. *Aquaculture* 188:363-382.
- Burel C, Boujard T, Tulli F, Kaushik SJ (2000b)** Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 188:285-298.

- Caballero MJ, López-Calero G, Socorro J, Roo FJ, Izquierdo MS, Fernández AJ (1999)** Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179:277-290.
- Capilla E, Médale F, Navarro I, Panserat S, Vachot C, Kaushik S, Gutiérrez J (2003)** Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept* 110:123-132.
- Carter CG, Houlihan DF, Buchanan B, Mitchell AI (1993a)** Protein-nitrogen flux and protein growth efficiency of individual Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 12:305-315.
- Carter CG, Houlihan DF, Brechin J, McCarthy ID (1993b)** The relationship between protein intake and protein accretion, synthesis, and retention efficiency for individual grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Can J Zool* 71:392-400.
- Carter CG, Owen SF, He ZY, Watt PW, Scrimgeour C, Houlihan DF, Rennie MJ (1994)** Determination of protein-synthesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using a stable-isotope. *J Exp Biol* 189:279-284.
- Carter CG, Houlihan DF, Owen SF (1998)** Protein synthesis, nitrogen excretion and long-term growth of juvenile *Pleuronectes flesus*. *J Fish Biol* 53:272-284.
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F, Baanante IV (2002)** Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 88:607-614.
- Castro V, Grisdale-Helland B, Helland S, Kristensen T, Jørgensen SM, Helgerud J, Claireaux G, Farrell AP, Krasnov A, Takle H (2011)** Aerobic training stimulates growth and promotes disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol A* 160:278-290.
- Catacutan MR i Coloso TMT (1995)** Effect of dietary protein to energy ratios on growth survival and body composition of juvenile Asian seabass *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 131:125-133.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Madrid JA (1998)** Timecourse studies on plasma glucose, insulin and cortisol in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol Behav* 64:245-250.
- Cho CY, Hynes JD, Wood KR, Yoshida HK (1994)** Development of high-nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture* 124:293-305.
- Cho CY i Bureau DP (2001)** A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquac Res* 32:349-360.
- Christiansen DC, Skarstein L, Klungsoyr L (1985)** Uptake studies in adipocytes isolated from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). A comparison with adipocytes from rat and cat. *Comp Biochem Physiol A* 82:201-205.

- Christiansen JS i Jobling M (1990)** The behaviour and the relationship between food intake and growth of juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Can J Zool* 68:2185-2191.
- Christiansen JS, Jørgensen EH, Jobling M (1991)** Oxygen consumption in relation to sustained exercise and social stress in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J Exp Zool* 260:149-156.
- Christiansen JS, Svendsen YS, Jobling M (1992)** The combined effects of stocking density and sustained exercise on the behavior, food intake, and growth of juvenile Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Can J Zool* 70:115-122.
- Company R, Caldach-Giner JA, Perez-Sanchez J, Kaushik SJ (1999)** Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Living Resour* 12:23-30.
- Conceicao LEC, Grasdalen H, Dinis MT (2003)** A new method to estimate the relative bioavailability of individual amino acids in fish larvae using C-¹³-NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B* 134:103-109.
- Cortazar E, Bartolome L, Arrasate S, Usobiaga A, Raposo JC, Zuloaga O, Etxebarria N (2008)** Distribution and bioaccumulation of PAHs in the UNESCO protected natural reserve of Urdaibai, Bay of Biscay. *Chemosphere* 72:1467-1474.
- Coughlin DJ (2002)** Aerobic muscle function during steady swimming in fish. *Fish Fisher* 3:63-78.
- Couto A, Enes P, Peres H, Oliva-Teles A (2008)** Effect of water temperature and dietary carbohydrate level on growth performance and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A* 151:45-50.
- Cowey CB i Sargent JR (1979)** Nutrition. In: Hoar WS, Randall J (Eds.), *Fish physiology* Vol. III. Academic Press, New York, pp. 1-69).
- Cowey CB i Luquet P (1983)** Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowances. In: Arnal M, Pion R, Bonin D (Eds.), *Protein Metabolism and Nutrition*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. pp. 365-384.
- Cowey CB (1993)** Some effects of nutrition on flesh quality of cultured fish. In: Kaushik SJ, Luquet P (Eds.), *Fish Nutrition in Practice*. INRA, Paris pp. 227-236.
- Daan S (1981)** Adaptive daily strategies in behavior. In: Aschoff J (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology* 4: Biological Rhythms. Plenum Press, New York, pp. 275-298.
- Dallaire V, Lessard P, Vandenberg G, de la Noüe J (2007)** Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Bioresource Technol* 98:1433-1439.
- Dardente H i Cermakian N (2007)** Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int* 24:195-213.

- Davidson AJ i Stephan FK (1999)** Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol Behav* 66:309-315.
- Davie PS, Wells RMG, Tetens V (1986)** Effects of sustained swimming on rainbow trout muscle structure, blood oxygen transport, and lactate dehydrogenase isozymes: evidence for increased aerobic capacity of white muscle. *J Exp Zool* 237:159-171.
- Davies SJ i Morris PC (1997)** Influence of multiple amino acid supplementation on the performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed soya based diets. *Aquac Res* 28:65-74.
- Davison W i Goldspink G (1977)** The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the brown trout (*Salmo trutta*). *J Exp Biol* 70:1-12.
- Davison W i Goldspink G (1978)** Effect of training on swimming muscles of goldfish (*Carassius auratus*). *J Exp Biol* 74:115-122.
- Davison W (1983)** Changes in muscle cell ultrastructure following exercise in *Salmo trutta*. *Experientia* 39:1017-1018.
- Davison W (1994)** Exercise training in the banded wrasse *Notolabrus fucicola* affects muscle fibre diameter but not muscle mitochondrial morphology. *N Z Nat Sci* 21:11-16.
- Davison W (1997)** The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp Biochem Physiol A* 117:67-75.
- DeCoursey PJ (2004)** Overview of biological timing from unicells to humans. In: (Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (Eds.), *Chronobiology: biological timekeeping*. Sunderland, MA: Sinauer pp. 2-24.
- Degani G, Viola S, Levanon D (1986)** Effects of dietary carbohydrate source on growth and body composition of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture* 52:97-104.
- De Haro C, Sánchez-Muros MJ, Rueda M, Martínez R, Barroso FG (2011a)** Efectos de la sustitución de la harina de pescado por harina de tenebrio (*Tenebrio molitor*) en la alimentación para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). XIII Congreso Nacional de Acuicultura, pp-56.
- De Haro C, Sánchez-Muros MJ, Hidalgo L, Venegas E, Barroso FG (2011b)** Potencial de la harina de insectos como alimento alternativo en la acuicultura. XIII Congreso Nacional de Acuicultura, pp-53.
- De la Higuera M, Garzón A, Hidalgo MC, Peragón J, Cardenete G, Lupiáñez JA (1998)** Influence of temperature and dietary-protein supplementation either with free or coated lysine on the fractional protein-turnover rates in the white muscle of carp. *Fish Physiol Biochem* 18:85-95.
- De la Higuera M, Akharbach H, Hidalgo MC, Peragon J, Lupianez JA, Garcia-Gallego M, (1999)** Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. *Aquaculture* 179:203-216.
- De Niro MJ i Epstein S (1977)** Mechanism of Carbon Isotope Fractionation Associated with Lipid-Synthesis. *Science* 197:261-263.

- Deschamps MH, Labbé L, Baloché S, Fouchereau-Péron M, Dufour S, Sire JY (2009)** Sustained exercise improves vertebral histomorphometry and modulates hormonal levels in rainbow trout. *Aquaculture* 296:337-346.
- Dias J, Corraze G, Arzel J, Alvarez MJ, Bautista JM, Lopez-Bote C, Kaushik SJ (1999)** Nutritional control of lipid deposition in rainbow trout and European seabass: effect of dietary protein/energy ratio. *Cybium* 23:127-137.
- Dickson KA (1996)** Locomotor muscle of high-performance fishes: What do comparisons of tunas with ectothermic sister taxa reveal? *Comp Biochem Physiol A* 113:39-49.
- Dobson GP i Hochachka PW (1987)** Role of glycolysis in adenylate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle. *J Exp Biol* 129:125-140.
- Driedzic WR i Hochachka PW (1976)** Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am J Physiol* 230:579-582.
- Driedzic WR i Hochachka PW (1978)** Metabolism in fish during exercise. In: Hoar WS, Randall DJ (Eds.) *Fish physiology*, vol 7. Academic Press, New York, pp. 503-543.
- East P i Magnan P (1987)** The effect of locomotor activity on the growth of brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchill. *Can J Zool* 65:843-846.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2006)** Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A* 143:89-96.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2008)** Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 274:101-108.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2011)** Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Rev Fish Sci* 19:201-215.
- EUROSTAT (2006)** <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/>
- FAO (2010)** El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO Fisheries department. Roma. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf>
- FAO (2006)** The State of Food Insecurity in the World. FAO Agricultural and Development Economics Division. Rome, Italy. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0750e/a0750e00.pdf>
- FAO Estadística Pesquera (2006)** www.fao.org
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989)** Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Phys* 40:503-537.
- Farrell AP, Johansen JA, Suarez RK (1991)** Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 9:303-312.

- Farrell AP (2007)** Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls. *Phil Trans Royal Soc B* 362:2017-2030.
- Fauconneau B (1985)** Protein synthesis and protein deposition in fish. In: Cowey CB, Mackie AM, Bell JG (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. London Academic Press, pp. 17-45.
- Francis G, Makkar HPS, Becker K (2001)** Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199:197-227.
- Fraser KPP, Clarke A, Peck LS (2002)** Low-temperature protein metabolism: Seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel 1908. *J Exp Biol* 205:3077-3086.
- Frøyland L, Lie Ø, Berge RK (2000)** Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquacult Nutr* 6:85-89.
- Furuichi M i Yone Y (1982)** Availability of carbohydrate in nutrition of carp and red sea bream. *Bull Jpn Soc Sci Fisheries* 48:945-948.
- Gannes LZ, del Rio CM, Koch P (1998)** Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol A* 119:725-737.
- Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogh A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007)** Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* 38:551-579.
- Goldspink G (1972)** Postembryonic growth and differentiation of striated skeletal muscle. In: Bourne GH (Ed.) *The structure and function of muscle*. Academic Press, New York, pp. 179-236.
- Gómez-Requeni P, Caldach-Giner J, de Celis SV, Médale F, Kaushik SJ, Pérez-Sánchez J (2005)** Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 94:353-361.
- Grigorakis K, Alexis MN, Taylor KDA, Hole M (2002)** Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *Int J Food Sci Technol* 37:477-484.
- Grünbaum T, Cloutier R, Le François NR (2008)** Positive effects of exposure to increased water velocity on growth of newly hatched Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *Aquac Res* 39:106-110.
- Haman F i Weber JM (1996)** Continuous tracer infusion to measure in vivo metabolite turnover rates in trout. *J Exp Biol* 199:1157-1162.
- Haman F, Zwingelstein G, Weber JM (1997)** Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273:2046-2054.

- Hayes JM (1993)** Factors controlling C-¹³ contents of sedimentary organic-compounds - principles and evidence. *Mar Geol* 113:111-125.
- Hemre GI, Lie Ø, Lied E, Lambertsen G (1989)** Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. *Aquaculture* 80:261-270.
- Hemre GI, Sandnes K, Lie Ø, Torrissen O, Waagbø R (1995)** Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilisation. *Aquac Res* 26:149-154.
- Hemre G, Juell JE, Hamre K, Lie Ø, Strand B, Arnesen P, Holm JC (1997)** Cage feeding of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*): effect on muscle lipid content, fatty acid composition, oxidation status and vitamin E concentration. *Aquat Living Resour* 10:365-370.
- Hemre GI i Hansen T (1998)** Utilisation of different dietary starch sources and tolerance to glucose loading in Atlantic salmon (*Salmo salar*), during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 161:145-157.
- Hemre GI i Sandnes K (1999)** Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquacult Nur* 5:9-16.
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A (2002)** Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult Nutr* 8:175-194.
- Henderson RJ i Sargent JR (1985)** Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal β -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B* 82:79-85.
- Herbert NA, Kadri S, Huntingford FA (2011)** A moving light stimulus elicits a sustained swimming response in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Physiol Biochem* 37:317-325.
- Hillestad M i Johnsen F (1994)** High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture* 124:109-116.
- Hinch SG i Rand PS (1998)** Swim speeds and energy use of upriver migrating sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*): role of local environment and fish characteristics. *Can J Fish Aquat Sci* 55:1821-1831.
- Hinch SG i Rand PS (2000)** Optimal swimming speeds and forward-assisted propulsion: energy-conserving behaviours of upriver-migrating adult salmon. *Can J Fish Aquat Sci* 57:2470-2478.
- Hinterleitner S, Huber M, Lackner R, Wieser W (1992)** Systemic and enzymatic responses to endurance training in two cyprinid species with different life styles (Teleostei: Cyprinidae). *Can J Fish Aquat Sci* 49:110-115.
- Hoefs J (1980)** Stable Isotope Geochemistry. Berlin: Springer-Verlag.
- Hoffnagle TL, Carmichael RW, Keniry PJ (2006)** The effect of moderately increased and variable raceway flow rates on juvenile physiology, survival, and adult return of hatchery-reared Chinook salmon. *Trans Am Fish Soc* 135:1567-1577.
- Houlihan DF, McMillan DN, Laurent P (1986)** Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in Rainbow trout: effects of body size. *Physiol Zool* 59:482-493.

- Houlihan DF i Laurent P (1987)** Effects of exercise training on the performance, growth, and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci* 44:1614-1621.
- Houlihan DF, Hall SJ, Gray C, Noble BS (1988)** Growth rates and protein turnover in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can J Fish Aquat Sci* 45:951-964.
- Houlihan DF (1991)** Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. In: Gilles R (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, vol. 7. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-43.
- Houlihan DF, Carter CG, McCarthy ID (1995a)** Protein turnover in animals. In: Walsh PJ, Wright P (Eds.), *Nitrogen Metabolism Excretion*. CRC Press, Boca Raton pp. 1-32.
- Houlihan DF, Carter CG, McCarthy ID (1995b)** Protein synthesis in fish. In: Hochachka P, Mommsen T (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam pp. 191-220.
- Hung SSO, Fynn-Aikins K, Lutes PB, Xu R (1989)** Ability of juvenile White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources. *J Nutr* 119:727-733.
- Ibarz A, Beltrán M, Fernández-Borràs J, Gallardo MA, Sánchez J, Blasco J (2007)** Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262:470-480.
- JACUMAR (2009)** La acuicultura en España. Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España.
- Jacobs MN, Covaci A, Schepens P (2002)** Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environ Sci Technol* 36:2797-2805.
- Jobling M (1985)** Physiological and social constraints on growth of fish with special reference to Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *Aquaculture* 44:83-90.
- Jobling M, Baardvik BM, Christiansen JS, Jørgensen EH (1993)** The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. *Aquacult Int* 1:95-111.
- Johnston IA i Moon TW (1980)** Endurance exercise training in the fast and slow muscles of a teleost fish (*Pollachius virens*). *J Comp Physiol B* 135:147-156.
- Johnston IA (1981)** Structure and function of fish muscles. *Symp Zool Soc* 48:71-113.
- Johnston IA (1999)** Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177:99-115.
- Jones DR (1982)** Anaerobic exercise in teleost fish. *Can J Zool* 60:1131-1134.
- Jørgensen EH i Jobling M (1993)** The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 116:233-246.
- Karlsen Ø, Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL (2006)** Effects of photoperiod and exercise on growth, liver size, and age at puberty in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES J Mar Sci* 63:355-364.

- Kaushik SJ i Oliva-Teles A (1985)** Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50:89-101.
- Kaushik SJ (1990)** Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. In: Flos R, Tort L, Torres P (Eds.), *Mediterranean Aquaculture*. Ellis Horwood, UK. pp. 125-138.
- Kaushik SJ i Cowey CB (1991)** Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. In: Cowey CB, Cho CY (Eds.) *Nutritional strategies and Aquaculture Waste*. Fish Nutrition Research Laboratory, Department of Nutritional Sciences, University of Guelph, Guelph, Ontario pp 7-19.
- Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, Sumpter J, Fauconneau B, Laroche M (1995)** Partial or total replacement of fish-meal by soybean protein on growth, protein-utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133:257-274.
- Kaushik SJ i Seiliez I (2010)** Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquac Res* 41:322-332.
- Kieffer JD, Alsop D, Wood CM (1998)** A respirometric analysis of fuel use during aerobic swimming at different temperatures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 201:3123-3133.
- Kieffer J (2000)** Limits of exhaustive exercise in fish. *Comp Biochem Physiol A* 126:161-179.
- Kiessling KH i Kiessling A (1993)** Selective utilization of fatty acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. *Can J Zool* 71:248-251.
- Kiessling A, Pickova J, Eales JG, Dosanjh B, Higgs D (2005)** Age, ration level, and exercise affect the fatty acid profile of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) muscle differently. *Aquaculture* 243:345-356.
- Kissil GW, Lupatsch I, Higgs DA, Hardy RW (2000)** Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Aquac Res* 31:595-601.
- Koletzko B, Demmelmair H, Hartl W, Kindermann A, Koletzko S, Sauerwald T, Szitanyi P, (1998)** The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Hum Dev* 53:77-97.
- Kriengsinyos W, Wykes LJ, Ball RO, Pencharz PB (2002)** Oral and intravenous tracer Protocols of the indicator amino acid oxidation method provide the same estimate of the lysine requirement in healthy men. *J Nutr* 132:2251-2257.
- Kühn ER, Corneillie S, Ollevier F (1986)** Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose, and cortisol in carp (*Cyprinus carpio*). *Gen Comp Endocrinol* 61:459-468.
- Lajtha K i Michener RH (1994)** *Stable isotopes in ecology and environmental science*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Larsen BK, Skov PV, McKenzie DJ, Jokumsen A (2012)** The effects of stocking density and low level sustained exercise on the energetic efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at 19 °C. *Aquaculture* 324-325:226-233.
- Lauff RF i Wood CM (1996a)** Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during starvation in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Comp Physiol B* 165:542-551.
- Lauff RF i Wood CM (1996b)** Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B* 166:501-509.
- Lauff RF i Wood CM (1997)** Effects of training on respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Fish Aquat Sci* 54:566-571.
- Leung LY i Woo YS (2011)** Influence of dietary carbohydrate level on endocrine status and hepatic carbohydrate metabolism in the marine fish *Sparus sarba*. *Fish Physiol Biochem* 38:543-554.
- López-Olmeda JF, Egea-Álvarez M, Sánchez-Vázquez FJ (2009a)** Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important?. *Physiol Behav* 96:631-636.
- López-Olmeda JF, Montoya A, Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ (2009b)** Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chronobiol Int* 26:1389-1408.
- López-Olmeda JF i Sánchez-Vázquez FJ (2010)** Feeding rhythms in fish: from behavioral to molecular approach, In: Kulczykowska E, Popek W, Kapoor BG (Eds.), *Biological clock in fish*, Chapter 8. Science Publishers, Enfield, NH 03748, USA. pp: 155-184.
- Lyndon AR, Houlihan DF, Hall SJ (1992)** The effect of short-term fasting and a single meal on protein-synthesis and oxygen-consumption in cod, *Gadus morhua*. *J Comp Physiol B* 162:209-215.
- Macko SA, Estep MLF, Engel MH, Hare PE (1986)** Kinetic Fractionation of Stable Nitrogen Isotopes During Amino-Acid Transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 50:2143-2146.
- Magnoni LJ, Patterson DA, Farrell AP, Weber JM (2006)** Effects of long-distance migration on circulating lipids of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can J Fish Aquat Sci* 63:1822-1829.
- Magnoni L i Weber JM (2007)** Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. *J Exp Biol* 210:4016-4023.
- Magnoni L, Vaillancourt E, Weber JM (2008)** High resting triacylglycerol turnover of rainbow trout exceeds the energy requirements of endurance swimming. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:309-315.
- Mambrini M, Roem AJ, Cravedi JP, Lalles JP, Kaushik SJ (1999)** Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Anim Sci* 77:2990-2999.

- Marino BD i McElroy MB (1991)** Isotopic composition of atmospheric CO₂ inferred from carbon in C₄ plant cellulose. *Nature* 349:127-131.
- Martin CI i Johnston IA (2005)** The role of myostatin and the calcineurin-signalling pathway in regulating muscle mass in response to exercise training in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J Exp Biol* 208:2083-2090.
- Martin CI i Johnston IA (2006)** Endurance exercise training in common carp *Cyprinus carpio* L. induces proliferation of myonuclei in fast muscle fibres and slow muscle fibre hypertrophy. *J Fish Biol* 69:1221-1227.
- Martínez-Llorens S, Moñino AV, Tomás A, Moya VJ, Pla M, Jover M (2007)** Soybean meal as a protein source in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) diets: effects on growth and nutrient utilization. *Aquac Res* 38:82-90.
- McCue MD (2010)** Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol A* 156:1-18.
- McDonald DG, Milligan CL, McFarlane WJ, Croke S, Currie S, Hooke B, Angus RB, Tufts BL, Davidson K (1998)** Condition and performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of rearing practices on hatchery fish and comparison with wild fish. *Can J Fish Aquat Sci* 55:1208-1219.
- McKenzie DJ, Höglund E, Dupont-Prinet A, Larsen BK, Skov PV, Pedersen PB, Jojumsen A (2012)** Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. *Aquaculture* 338:216-222.
- McMillan DN i Houlihan DF (1989)** Short-term responses of protein synthesis to re-feeding in rainbow trout. *Aquaculture* 79:37-46.
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Canto E, Fernández F, Baanante IV (1999)** Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 82:223-232.
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV (2004)** Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol B* 138:145-153.
- Meyer-Burgdorff K i Rosenow H (1995)** Protein turnover and energy metabolism in growing carp. 1. Method of determining N-turnover using a ¹⁵N-labelled casein. *J Anim Physiol An N* 73:113-122.
- Millamena OM i Golez NV (2001)** Evaluation of processed meat solubles as replacement for fish meal in diet for juvenile grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton). *Aquac Res* 32:281-287.
- Milligan CL (1996)** Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol A* 113:51-60.

- Millward DJ, Garlick PJ, Nnanyelugo DO, Waterlow JC (1976)** The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem J* 156:185-188.
- Mistlberger R (1994)** Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Res* 18:171-195.
- Mistlberger RE (2009)** Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci* 30:1718-1729.
- Mommsen TP, French CJ, Hochachka PW (1980)** Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Can J Zool* 58:1785-1799.
- Moon TW (2001)** Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B* 129:243-249.
- Moyes CD, Buck LT, Hochachka PW, Suarez RK (1989)** Oxidative properties of the carp red muscle and white muscle. *J Exp Biol* 143:321-331.
- Moyes CD i West TG (1995)** Exercise metabolism of fish. In: Hochachka PW, Mommsen TP (Eds.), *Metabolic Biochemistry*, vol 4. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 368-392.
- Murai T, Ogata H, Kosutarak P, Arai S (1986)** Effects of amino-acid supplementation and methanol treatment on utilization of soy flour by fingerling carp. *Aquaculture* 56:197-206.
- Navarro I, Rojas P, Capilla E, Albalat A, Castillo J, Montserrat N, Codina M, Gutierrez J (2002)** Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiol Biochem* 27:205-216.
- Nengas I, Alexis MN, Davies SJ (1996)** Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diets for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquac Res* 27:147-156.
- Oliva-Teles A i Gonçalves P (2001)** Partial replacement of fishmeal by Brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 202:269-278.
- Omlin T i Weber JM (2010)** Hypoxia stimulates lactate disposal in rainbow trout. *J Exp Biol* 213:3802-3809.
- Owen SF, Mc Carthy ID, Watt PW, Ladero V, Sanchez JA, Houlihan DF, Rennie MJ (1999)** In vivo rates of protein synthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts determined using a stable isotope flooding dose technique. *Fish Physiol Biochem* 20: 87-94.
- Ozorio ROA (2008)** Swimming activity and non-protein energy (NPE) metabolism in fish. *Curr Nutr Food Sci* 4:282-289.
- Palstra AP, van Ginneken V, van den Thillart G (2008)** Cost of transport and optimal swimming speed in farmed and wild European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Comp Biochem Physiol A* 151:37-44.

- Palstra AP, Tudorache C, Rovira M, Brittijn SA, Burgerhout E, van den Thillart GEEJ, Spaink HP, Planas JV (2010)** Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. *PLoS ONE* 5:e14483.
- Palstra AP i Planas JV (2011)** Fish under exercise. *Fish Physiol Biochem* 37:259-272.
- Panserat S, Médale F, Blin C, Brèque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S (2000)** Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:1164-1170.
- Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S (2001)** Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204:2351-2360.
- Panserat S i Kaushik S (2002)** Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique chez les poissons: exemple de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), faible utilisatrice des glucides alimentaires. *INRA Prod Anim* 15:109-117.
- Parimi PS, Devapatla S, Gruca L, O'Brien AM, Hanson RW, Kalhan SC (2002)** Glutamine and leucine nitrogen kinetics and their relation to urea nitrogen in newborn infants. *Am J Physiol-Endoc M* 282: 618-625.
- Patterson BW, Zhang X, Cheng YP, Klein S, Wolfe R (1997)** Measurement of very low stable isotope enrichments by gas chromatography/mass spectrometry: Application to measurement of muscle protein synthesis. *Metabolis* 46:943-948.
- Patterson BW, Nfittendorfer B, Elias N, Satyanarayana R, Klein S (2002)** Use of stable isotopically labelled tracers to measure very low density lipoprotein-triglyceride turnover. *J Lipid Res* 43:223-233.
- Pavlidis M, Berry M, Divanach P, Kentouri M (1997)** Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquacult Int* 5:237-247.
- Pelster B, Sängler AM, Siegele M, Schwerte T (2003)** Influence of swim training on cardiac activity, tissue capillarization, and mitochondrial density in muscle tissue of zebrafish larvae. *Am J Physiol* 285:339-347.
- Pereira TG i Oliva-Teles A (2002)** Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquac Res* 33:1183-1189.
- Peterson BJ i Fry B (1987)** Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18:293-320.
- Pickering AD i Pottinger TG (1983)** Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen Comp Endocrinol* 49:232-239.
- Pieper A i Pfeffer E (1980a)** Studies on the effect of increasing proportions of sucrose or gelatinized maize starch in diets for rainbow trout (*Salmo Gairdneri*, R) on the utilization of dietary energy and protein. *Aquaculture* 20:333-342.

- Pieper A i Pfeffer E (1980b)** Studies on the comparative efficiency of utilization of gross Energy from some carbohydrates, proteins and fats by rainbow-trout (*Salmo gairdneri*, R). *Aquaculture* 20:323-332.
- Plasencia-Jatomea M, Olvera-Novoa MA, Arredondo-Figueroa JL, Hal GM, Shirai K (2002)** Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage proteina hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *J Sci Food Agr* 82:753-759.
- Polakof S, Ceinos RM, Fernández-Durán B, Míguez JM, Soengas JL (2007)** Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A* 146:265-273.
- Rackis JJ (1974)** Biological and Physiological Factors in Soybeans. *J Am Oil Chemist Soc* 51:161-174.
- Rance TA, Baker BI, Webley G (1982)** Variations in plasma cortisol concentrations over a 24-hour period in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Gen Comp Endocrinol* 48:269-274.
- Rasmussen RS, Heinrich MT, Hyldig G, Jacobsen C, Jokumsen A (2011)** Moderate exercise of rainbow trout induces only minor differences in fatty acid profile, texture, white muscle fibres and proximate chemical composition of fillets. *Aquaculture* 314:159-164.
- Refstie S, Korsoen OJ, Storebakken T, Baeverfjord G, Lein I, Roem AJ (2000)** Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190:49-63.
- Regost C, Arzel J, Kaushik SJ (1999)** Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180:99-117.
- Regost C, Arzel J, Cardinal M, Robin J, Laroche M, Kaushik SJ (2001)** Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 193:291-309.
- Richards JG, Heigenhauser GJF, Wood CM (2002a)** Glycogen phosphorylase and pyruvate dehydrogenase transformation in white muscle of trout during high-intensity exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:828-836.
- Richards JG, Mercado AJ, Clayton CA, Heigenhauser GJF, Wood CM (2002b)** Substrate utilization during graded exercise in rainbow trout. *J Exp Biol* 205:2067-2077.
- Robaina L, Izquierdo MS, Moyano FJ, Socorro J, Vergara JM, Montero D, Fernandez-Palacios H (1995)** Soybean and lupin seed meals as protein-sources in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) - Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130:219-233.
- Robertson RF, El Haj AJ, Clarke A, Taylor EW (2001)** Effects of temperature on specific dynamic action and protein synthesis rates in the Baltic isopod crustacean, *Saduria entomon*. *J Exp Mar Biol Ecol* 262:113-129.
- Rome LC, Funke RP, Alexander RM, Lutz G, Aldridge H, Scott F, Freadman M (1988)** Why animals have different muscle fiber types. *Nature* 335:824-827.

- Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA (1989)** Stable isotopes in ecological research. New York: Springer-Verlag.
- Saavedra M, Beltran M, Pousao-Ferreira P, Dinis MT, Blasco J, Conceição LEC (2007)** Evaluation of bioavailability of individual amino acids in *Diplodus puntazzo* larvae: Towards the ideal dietary amino acid profile. *Aquaculture* 263:192-198.
- Sánchez-Lozano NB, Martínez-Llorens S, Tomás-Vidal A, Jover Cerdà M (2011)** Amino acid retention of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed with pea protein concentrate. *Aquacult Nutr* 17:604-614.
- Sánchez-Muros MJ, Corchete V, Suárez MD, Cardenete G, Gómez-Milán E, de la Higuera M (2003)** Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture* 224:89-103.
- Sánchez JA, López-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Sánchez-Vázquez FJ (2009)** Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiol Behav* 98:125-129.
- Sänger AM (1992)** Effects of training on axial muscle of two cyprinid species: *Chondrostoma nasus* (L.) and *Leuciscus cephalus* (L.). *J Fish Biol* 40:637-646.
- Sänger AM i Stoiber W (2001)** Muscle fibre diversity and plasticity. In: Johnston IA (Ed.) Muscle development and growth. Academic Press, London, pp. 187-237.
- Sargent J, Henderson RJ, Tocher DR (1989)** The lipids. In: Halver JE (Ed.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, pp. 153-218.
- Sargent JR i Tacon AGJ (1999)** Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc Nutr Soc* 58:377-383.
- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG (2002)** The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (Eds.), Fish nutrition. Academic Press, San Diego, CA, pp. 181-257.
- Satoh S, Sarker SA, Satoh K, Kiron V (2004)** Effects of dietary lipid and phosphorus levels on nitrogen and phosphorus excretion in young yellowtail *Seriola quinqueradiata*: A preliminary observation. *Fisheries Sci* 70:1082-1088.
- Scarabello M, Heigenhauser GJF, Wood CM (1992)** Gas exchange, metabolite status and excess post-exercise oxygen consumption after repetitive bouts of exhaustive exercise in juvenile rainbow trout. *J Exp Biol* 167:155-169.
- Serrano R, Barreda M, Blanes MA (2008)** Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea. *Mar Pollut Bull* 56:963-972.
- Shanghavi DS, Weber JM (1999)** Effects of sustained swimming on hepatic glucose production of rainbow trout. *J Exp Biol* 202:2161-2166.
- Shiau SY i Lin YH (2001)** Carbohydrate utilization and its protein-sparing effect in diets for grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Animal Sci* 73:299-304.
- Shimeno S, Kumon M, Ando H, Ukawa M (1993)** Protein-source for fish feed. The growth-performance and body-composition of young yellowtail fed with diets containing defatted soybean-meal for a long-period. *Nippon Suisan Gakk* 59:821-825.

- Silver GR, Higgs DA, Dosanjh BS, McKeown BA, Deacon G, French D (1993)** Effect of dietary protein to lipid ratio on growth and chemical composition of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. In: Kaushik SJ, Luquet P. Fish Nutrition in Practice, IVth Int. Symp. on Fish Nutrition and Feeding. INRA, Paris. pp. 459-468.
- Simon O (1989)** Metabolism of proteins and amino acids. In: Bock HD, Eggum BO, Low AG, Simon O, Zebrowska T (Eds.), Protein Metabolism in Farm Animals: Evaluation, Digestion, Absorption and Metabolism, Oxford University Press, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, pp. 273-366.
- Singley JA i Chavin W (1975)** Serum cortisol in normal goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp Biochem Physiol A* 50:77-82.
- Smith RW i Houlihan DF (1995)** Protein synthesis and oxygen consumption in fish cells. *J Comp Physiol B* 165:93-101.
- Soengas JL i Aldegunde M (2002)** Energy metabolism of fish brain. *Comp Biochem Physiol B* 131:271-296.
- Spieler RE (1992)** Feeding entrained circadian rhythms in fishes. In: Ali MA (Ed.), Rhythms in Fishes. Plenum. Press. New York, NY, pp. 137-147.
- Standen EM, Hinch SG, Healey MC, Farrell AP (2002)** Energetic costs of migration through the Fraser River Canyon, British Columbia, in adult pink (*Oncorhynchus gorbuscha*) and sockeye (*Oncorhynchus nerka*) salmon as assessed by EMG telemetry. *Can J Fish Aquat Sci* 59:1809-1818.
- Steele KW i Daniel RM (1978)** Fractionation of Nitrogen Isotopes by Animals - A Further Complication to Use of Variations in Natural Abundance of N-¹⁵ for Tracer Studies. *J Agr Sci* 90:7-9.
- Stephan G, Dreanno C, Guiollaume J, Arzel J (1996)** Incidence of different amounts of proteins, lipids and carbohydrates in diets on the muscle lipid composition in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ichthyophysiol Acta* 19:11-30.
- Stephan FK (2002)** The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythm* 17:284-292.
- Stoiber W, Haslett JR, Wenk R, Steinbacher P, Gollman H-P, Sanger AM (2002)** Cellularity changes in developing red and white fish muscle at different temperatures: simulating natural environmental conditions for a temperate freshwater cyprinid. *J Exp Biol* 205:2349-2364.
- Stone DAJ (2003)** Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev Fish Sci* 11:337-369.
- Storebakken T, Shearer KD, Roem AJ (2000)** Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus, and absorption of other minerals in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquacult Nutr* 6:103-108.
- Stowell SL i Gatlin DM (1992)** Effects of dietary pantethine and lipid levels on growth and body composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 108:177-188.

- Thiessen DL, Campbell GL, Adelizi PD (2003)** Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquacult Nutr* 9:67-75.
- Thorpe JE, McConway MG, Miles MS, Muir JS (1987)** Diel and seasonal changes in resting plasma cortisol levels in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Gen Comp Endocrinol* 65:9-22.
- Thorstad EV, Finstad B, Okland F, McKinley RS, Booth RK (1997)** Endurance of farmed and sea-ranched Atlantic salmon *Salmo salar* L. at spawning. *Aquac Res* 28:635-640.
- Tocher DR (2003)** Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev Fish Sci* 11:107-184.
- Totland GK, Kryvi H, Jødestøl KA, Christiansen EN, Tangeras A, Slinde E (1987)** Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during longterm sustained swimming. *Aquaculture* 66:299-313.
- Tsuchimoto M, Tanaka N, Uesugui Y, Misima T, Tachibana K, Yada S, Senta T, Yasuda M (1988)** The influence of rearing water temperature on the reative thermostability of myofibrilar Ca²⁺-ATPase and on the lowering speed of freshness in carp. *Nippon Suissan Gakk* 54:117-124.
- Tucker VA (1970)** Energetic cost of locomotion in animals. *Comp Biochem Physiol* 34:841-846.
- Tudorache C, O'Keefe RA, Benfey TJ (2011)** Optimal swimming speeds reflect preferred swimming speeds of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell, 1874). *Fish Physiol Biochem* 37:307-315.
- Tudorache C, Boeck G, Claireaux G (2013)** Forced and preferred swimming speeds of fish: a methodological approach, In: Palstra AP, Planas JV (Eds.) *Swimming Phisiology of fish*, Chapter 4. Springer Heidelberg New York. Pp. 81-108.
- Van der Meulen T, Schipper H, van den Boogaart JGM, Huisling MO, Kranenborg S, van Leeuwen JL (2006)** Endurance exercise differentially stimulates heart and axial muscle development in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:1040-1048.
- Van den Thillart G (1986)** Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*). *J Comp Physiol B* 156:511-520.
- Van Ginneken VJT i Van den Thillart GEEJM (2000)** Physiology: Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403:156-157.
- Velázquez M, Zamora S, Martínez FJ (2004)** Influence of environmental conditions on demand-feeding behaviour of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J Appl Ichthyol* 20:536-541.
- Videler JJ (1981)** Swimming movements, body structure and propusion in Cod (*Gadus morhua*). In: Day MH (Ed.), *Vertebrate locomotion*. Symp. Zool. Soc. Lond. no 48, Academic Press, pp. 1-27.
- Videler JJ (1993)** *Fish Swimming*. Chapman and Hall, London.

- Villarino AL, Moreno P, Ortuño I (2005)** El pescado en la dieta. Valor nutritivo del pescado. In: Pinto JA (Ed.), Nutrición y salud. Dirección general de salud pública y consumo, Consejería de Sanidad y Consumo. pp. 51-66.
- Vincent RE (1960)** Some influences of domestication upon three stocks of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans Am Fisheries Soc* 89:3-14.
- Von der Decken A i Lied E (1992)** Dietary protein levels affect growth and protein metabolism in trunk muscle of cod, *Gadus morhua*. *J Comp Physiol B* 162:351-357.
- Walton MJ i Cowey CB (1982)** Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp Biochem Physiol B* 73:59-79.
- Wang Y, Heigenhauser GJ, Wood CM (1994)** Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. *J Exp Biol* 195:227-258.
- Watanabe T (1982)** Lipid nutrition in fish. *Comp Biochem Physiol B* 73:3-15.
- Watanabe T, Verakunpiriya V, Watanabe K, Kiron V, Satoh S (1997)** Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fisheries Sci* 63:258-266.
- Watanabe T (2002)** Strategies for further development of aquatic feeds. *Fish Sci* 68:242-252.
- Weatherley AH, Gill HS, Casselman JM (1987)** The biology of fish growth. Academic Press, London.
- Weatherley AH, Gill HS, Lobo AE (1988)** Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J Fish Biol* 33:851-859.
- Weber JM, Brill RW, Hochachka PW (1986)** Mammalian metabolite flux rates in a teleost: lactate and glucose turnover in tuna. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 250:452-458.
- Weihls D (1973)** Hydromechanics of fish schooling. *Nature* 241:290-291.
- Weihls D (1974)** Energetic advantages of burst swimming of fish. *J Theor Biol* 48:215-229.
- West TG, Arthur PG, Suarez RK, Doll CJ, Hochachka PW (1993)** In vivo utilization of glucose by heart and locomotory muscles of exercising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 177:63-79.
- Whiteley NM, Robertson RF, Meagor J, El Haj AJ, Taylor EW (2001)** Protein synthesis and specific dynamic action in crustaceans: effects of temperature. *Comp Biochem Physiol A* 128:595-606.
- Wieser W (1985)** A new look at energy conversion in ectothermic and endothermic animals. *Oecologia* 66:506-510.
- Wilson RP i Halver JE (1986)** Protein and amino-acid-requirements of fishes. *Annu Rev Nutr* 6:225-244.
- Wilson R (1989)** Amino acids and protein. In: Halver JE (Ed.), Fish nutrition, 2nded. Academic Press, San Diego (EEUU) pp. 111-151.
- Wilson RP (1994)** Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124:67-80.

- Wood CM (1991)** Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *J Exp Biol* 160:285-308.
- Woodward JJ i Smith LS (1985)** Exercise training and the stress response in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 26:435-447.
- World Aquaculture Conference (2010)** Food and agriculture organization of the united nations. Rome, 2011. <http://www.fao.org/docrep/014/ba0132e/ba0132e.pdf>
- Young PS i Cech JJ (1993)** Improved growth, swimming performance, and muscular development in exercised-conditioned young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquat Sci* 50:703-707.
- Young PS i Cech JJ (1994)** Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Can J Fish Aquat Sci* 51:1528-1534.

2. OBJECTIUS

2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

Els estudis que constitueixen la present tesi es van plantejar emmarcats dins del projecte global d'investigació titulat "Qualitat del múscul i la seva relació amb marcadors del creixement, traçadors metabòlics i condicions de cultiu: optimització de la producció d'orada" (AGL2006-03923).

L'objectiu global de la tesi ha estat determinar les capacitats d'aprofitament dels carbohidrats digeribles en peixos considerats carnívors i d'alt interès comercial a la mediterrània, com són la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*, espècie de referència en aigua dolça) i l'orada (*Sparus aurata*, espècie marina de referència), sotmeses a canvis de digestibilitat dels carbohidrats, de l'activitat física dels animals i del moment del dia en que se'ls proporciona un aliment d'una determinada composició.

Objectius concrets:

- **1)** Estudiar els efectes de la gelatinització del midó en una dieta rica en carbohidrats sobre la captació i ús d'aquest nutrient en la truita irisada, mitjançant el seguiment amb l'isòtop estable C¹³. **(Capítol I)**
- **2)** Estudiar els efectes de la condició d'exercici sostingut en la truita irisada com a sistema pràctic per promoure l'ús dels carbohidrats d'una dieta enriquida en benefici de l'estalvi proteic. El destí dels carbohidrats i les proteïnes de la dieta s'analitzarà mitjançant el marcatge amb els isòtops estables C¹³ i N¹⁵, respectivament. **(Capítol I)**
- **3)** Aplicar el mateix model - condicions de natació sostinguda i animals alimentats amb una dieta rica en carbohidrats digeribles - per al cas de l'orada, veient els efectes en l'espècie de referència en l'aqüicultura marina mediterrània. **(Capítol II)**
- **4)** Avaluar els efectes de l'activitat natatòria sostinguda i moderada sobre la histologia del múscul blanc de l'orada, tipificant els efectes de l'exercici sobre la cel·lularitat i capil·larització en les zones cranial i caudal del múscul. **(Capítol III)**
- **5)** Establir els efectes en l'ús dels nutrients al llarg del dia, determinats per les diferències del destí dels nutrients de la dieta (midó-C¹³ i proteïna-N¹⁵) segons el moment de l'administració del menjar i de la seva composició. **(Capítol IV)**

Pla de treball:

Per tal d'abordar els objectius concrets de la tesi, es realitzaren 4 experiments que es corresponen amb les publicacions científiques que constitueixen la base de la present tesi doctoral (compreses en el Capítol indicat).

- per assolir el primer objectiu es van alimentar truites irisades amb dietes riques en carbohidrats, un grup amb midó en cru i l'altre amb midó prèviament gelatinitzat (Capítol I).

- per al segon objectiu, truites irisades alimentades amb la dieta rica en carbohidrats digeribles van ser sotmeses a dos graus diferents d'activitat: un grup es sotmeté a natació voluntària (control) i l'altre a una activitat de natació moderada i sostinguda (Capítol I).

- per als objectius tercer i quart s'emprà un disseny experimental similar al del punt anterior però aplicat a l'orada. En un cas s'analitzà l'ús dels nutrients mitjançant el marcatge amb isòtops estables (Capítol II) i en l'altre la tipologia del múscul blanc (Capítol III).

- exclusivament per al cinquè objectiu, es va plantejar un programa/horari (*time schedule*) d'alimentació d'orades amb dues ingestes diàries combinant dues dietes, una de comercial (Cd) i una rica en carbohidrats digeribles (Ed), i resultant en 3 règims d'alimentació (Cd/Cd; Cd/Ed; Ed/Cd). Posteriorment al condicionament a les dietes, es van realitzar dos estudis postprandials (un alimentant els peixos a les 10 del matí i l'altre a les 5 de la tarda) i es van determinar els canvis de composició dels principals òrgans i el destí dels nutrients (Capítol IV).

Tots els experiments inclosos en la present tesis empen la mateixa metodologia per el seguiment dels nutrients en el peix, el marcatge amb isòtops estables (C^{13} en el cas dels carbohidrats i N^{15} per la proteïna). Aquesta tècnica ens ha permès detectar els principals canvis postprandials en la distribució i destí dels nutrients marcats.

El capítol I ha donat lloc a la publicació:

Felip O, Ibarz A, Fernández-Borràs J, Beltrán M, Martín-Pérez M, Planas JV, Blasco J (2012) Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (^{13}C -starch and ^{15}N -protein): effects of gelatinization of starches and sustained swimming. *British Journal of Nutrition* 107:834-844

El capítol II ha donat lloc a la publicació:

Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J (2013) Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ¹⁵N and ¹³C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of Comparative Physiology B* 183:223-234

El capítol III ha donat lloc a la publicació:

Ibarz A, Felip O, Fernández-Borràs J, Martín-Pérez M, Blasco J, Torrella JR (2011) Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream. *Journal of Comparative Physiology B* 181:209-217

El capítol IV ha donat lloc a la publicació:

Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J. Diets labelled with ¹³C-starch and ¹⁵N-protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). (Sotmès a la revista *Aquaculture* el 10 de Juliol de 2013)

3. ÍNDEX D'IMPACTE

3. ÍNDEX D'IMPACTE

El Dr. **Jaume Fernández-Borràs** i la Dra. **Josefina Blasco Mínguez**, com a directors de la Tesi Doctoral titulada “Dinàmica dels nutrients midó-C¹³ i proteïna-N¹⁵ en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i l'orada (*Sparus aurata*): efectes de la gelatinització dels carbohidrats, a natació sostinguda i la ritmicitat diària.” i realitzada per l'**Olga M^a Felip Arias**, manifestem la veracitat del factor d'impacte i la implicació de la doctoranda en cada un dels articles científics que es presenten en aquesta tesi doctoral.

Article 1 (Capítol I)

Títol: Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (¹³C-starch and ¹⁵N-protein): effects of gelatinization of starches and sustained swimming.

Autors (p.o. de firma): Felip O, Ibarz A, Fernández-Borràs J, Beltràn M, Martín-Pérez M, Planas JV i Blasco J.

Revista: British Journal of Nutrition, 107:834-844 (2012)

I.F. 3,302, in Nutrition & Dietetics 18/76 Q1

5 Anys I.F. 3,596

Participació de la doctoranda: l'Olga Felip ha obtingut les mostres i les ha analitzat en la seva totalitat, col·laborant en la interpretació dels resultats. Ha redactat la primera versió del manuscrit i ha col·laborat activament en el procés de revisió per iguals.

Article 2 (Capítol II)

Títol: Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ¹⁵N and ¹³C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).

Autors (p.o. de firma): Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J.

Revista: Journal of Comparative Physiology B, 183:223-234 (2013)

I.F. 2,024, in Zoology 30/149 Q1

5 Anys I.F. 2,256

Participació de la doctoranda: l'Olga Felip ha participat en el disseny experimental, i ha realitzat el treball experimental per l'obtenció de mostres, anàlisi posterior i interpretació dels resultats. Ha redactat la primera versió del manuscrit i ha col·laborat activament en el procés de revisió per iguals.

Article 3 (Capítol III)

Títol: Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream.

Autors (p.o. de firma): Ibarz A, Felip O, Fernández-Borràs J, Martín-Pérez M, Blasco J, Torrella JR.

Revista: Journal of Comparative Physiology B, 181:209-217 (2011)

I.F. 1,966, in Zoology 29/146 Q1

5 Anys I.F. 2,097

Participació de la doctoranda: l'Olga Felip ha obtingut les mostres i ha ajudat en la seva anàlisi, col·laborant en la interpretació dels resultats. Ha col·laborat activament en el procés de revisió per iguals.

Article 4 (Capítol IV)

Títol: Diets labelled with ¹³C-starch and ¹⁵N-protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).

Autors (p.o. de firma): Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J.

Revista: Aquaculture (Sotmès el 10 de Juliol de 2013)

I.F. 2,009, in Fisheries 11/49 Q1

5 Anys I.F. 2,624

Participació de la doctoranda: l'Olga Felip ha participat en el disseny experimental, i ha realitzat el treball experimental per l'obtenció de mostres, anàlisi posterior i interpretació dels resultats. Ha redactat la primera versió del manuscrit i ha col·laborat activament en el procés de revisió per iguals.

Altres publicacions addicionals que no formen part de la tesi:

Martín-Pérez M, Fernandez-Borras J, Ibarz A, Millan-Cubillo A, Felip O, de Oliveira E, Blasco J (2012) New insights into fish swimming: a proteomic and isotopic approach in gilthead sea bream. *Journal of Proteome Research* 11:3533-3547 (impact factor: 5,11).

Martín-Pérez M, Fernández-Borrás J, Ibarz A, Felip O, Gutiérrez J, Blasco J (2011) Stable isotope analysis combined with metabolic indices discriminates between gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings produced in various hatcheries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:10261-10270 (impact factor: 2,82).

Martín-Pérez M, Fernández-Borrás J, Ibarz A, Felip O, Fontanillas R, Gutiérrez J, Blasco J (2011) Natural-occurring stable isotopes as a valuable tool for determining the optimum dietary requirements in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (submitted) (impact factor: 2,82).

Magnoni LJ, Felip O, Blasco J, Planas JV (2013) Metabolic fuel utilization during swimming: optimizing nutritional requirements for enhanced performance, In: Palstra AP, Planas JV (Eds.), *Swimming Physiology of fish*, Chapter 9. Springer Heidelberg New York pp. 203-235.

Dr. Jaume Fernández-Borràs

Dra. Josefina Blasco Mínguez

4. RESUMS DE LES PUBLICACIONS

CAPÍTOL I

**Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout
(*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (¹³C-starch and ¹⁵N-protein): effects of
gelatinization of starches and sustained swimming**

Felip O.^{1,2}, Ibarz A.^{1,2}, Fernández-Borràs J.^{1,2}, Beltrán M.^{1,2}, Martín-Pérez M.^{1,2}, Planas J.V.^{1,2}
and Blasco J.^{1,2}

British Journal of Nutrition, 107:834-844 (2012)

¹*Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal
645, E-08028 Barcelona, Spain*

²*Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura, Generalitat de
Catalunya, Catalonia, Spain*

*(Received 14 March 2011 – Revised 7 June 2011 – Accepted 7 June 2011 – First published
online 2 August 2011)*

Aquest estudi avalua l'ús d'isòtops estables, midó-C¹³ i proteïna-N¹⁵, com a traçadors de la dieta per estudiar, respectivament, l'assimilació i distribució dels hidrats de carboni i la utilització de les proteïnes en la truita arc iris. Es va estudiar la capacitat d'absorció i ús de la glucosa pels teixits, en primer lloc, variant la digestibilitat en dues dietes riques en carbohidrats (CHO 30%), una amb midó cru (RS) i l'altra gelatinitzada (GS). I en segon lloc es van observar els efectes de dos règims d'activitat (natació voluntària, C; natació sostinguda en 1,3 LC.s⁻¹, E) sobre la dieta GS. La ratio d'enriquiment isotòpic (C¹³ i N¹⁵) dels components principals dels diferents teixits (proteïnes, lípids, glicogen) es van mesurar en el fetge, els músculs, les vísceres i en la resta del peix a les 11 i 24 hores després d'una ingesta forçada. La inclusió en la dieta d'un trenta per cent d'hidrats de carboni digeribles va superar (sobrepasar) la capacitat de la truita arc iris per utilitzar aquest nutrient, provocant una hiperglucèmia perllongada que augmentà la captació de glucosa pels teixits i la síntesi de glicogen i lípids en el fetge. El total de C¹³ recuperat a les 24 hores després de la ingesta forçada en el grup GS va ser inferior que el recuperat a les 11h post-ingesta, indicant un augment proporcional de la oxidació de la glucosa, encara que la deposició de lípids en el múscul blanc va augmentar. L'exercici va impedir que es produís la hiperglucèmia perllongada, ja que la natació sostinguda millorà l'ús de carbohidrats de la dieta, principalment mitjançant la conversió a lípids en el fetge i l'oxidació en els músculs, especialment en el múscul vermell. Les majors recuperacions totals de ¹⁵N principalment en la fracció proteica dels músculs del grup d'exercici a 24 hores post-ingesta, evidenciaren que la natació sostinguda millora la deposició proteica, la qual cosa resulta en una intensificació de l'efecte "sparing" de la dieta o estalvi proteic.

CAPÍTOL II

Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ¹⁵N and ¹³C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

Felip O.^{1,2}, Blasco J.^{1,2}, Ibarz A.^{1,2}, Martín-Pérez M.^{1,2}, Fernández-Borràs J.^{1,2}

Journal Comparative Physiology B, 183:223-234 (2013)

¹*Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain.*

²*Centre de Referència i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.*

Received: 13 February 2012 / Revised: 4 July 2012 / Accepted: 5 August 2012 / Published online: 24 August 2012

Per determinar els efectes de la natació sostinguda sobre l'ús i destí dels nutrients de la dieta en l'orada, un grup de peixos es van sotmetre a realitzar una natació moderada i sostinguda ($1,5 \text{ LC}\cdot\text{s}^{-1}$; longituds corporals/segon) durant 3 setmanes i es van comparar amb un grup control sota activitat voluntària. El grup d'exercici va mostrar un augment significatiu de la taxa de creixement específic (SGR, C: $1,13 \pm 0,05$, E: $1,32 \pm 0,06, \% \cdot \text{dia}^{-1}$, $p < 0,05$) sense presentar canvis significatius en la ingesta (C: $3,56 \pm 0,20$; E: $3,84 \pm 0,03\%$ del pes corporal). L'addició de $\text{midó-}^{13}\text{C}$ i proteïna- N^{15} a un àpat de ració 1% del pes corporal de l'animal, va permetre analitzar el destí d'ambdós nutrients en diversos teixits i en els seus components principals, 6 i 24 h després de l'alimentació forçada. En els peixos sotmesos a natació sostinguda va millorar la redistribució dels components de la dieta incrementant l'ús dels carbohidrats i lípids com a energia (combustible). L'orada té una capacitat considerable per a l'absorció dels hidrats de carboni independentment de la condició de natació, però en peixos exercitats el C^{13} va augmentar en totes les fraccions del fetge sense presentar canvis en el contingut emmagatzemat. Això implica un major "turnover" dels nutrients amb l'exercici. Es va trobar una major retenció de proteïnes de la dieta (major captació de N^{15} en el múscul blanc durant tot el període postprandial) en l'exercici sostingut, destacant l'efecte d'estalvi de proteïnes. Els efectes combinats d'una dieta rica en carbohidrats i baixa en proteïnes junt amb l'exercici sostingut, va provocar una major retenció d'aminoàcids, i també va evitar la deposició excessiva de lípids en l'orada.

CAPÍTOL III**Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream**Ibarz A.^{1,2}, Felip O.^{1,2}, Fernández-Borràs J.^{1,2}, Martín-Pérez M.^{1,2}, Blasco J.^{1,2}, Torrella J.R.¹

Journal of Comparative Physiology B, 181:209-217 (2011)

¹*Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avd. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain*²*Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya, XRAq, Barcelona, Spain**Received: 4 June 2010 / Revised: 13 September 2010 / Accepted: 14 September 2010 /**Published online: 30 September 2010*

Es van mantenir durant 1 mes dos grups de juvenils d'orada amb dos règims de natació diferent (exercici, E: 1,5 LC.s⁻¹ i control, C: activitat voluntària). Primerament, tots els peixos es van adaptar a una dieta experimental baixa en proteïnes i rica en hidrats de carboni digeribles (37,2% proteïnes, hidrats de carboni 40,4%, 12,5% de lípids). Es va comparar la cel·lularitat i la capillarització de dues àrees seleccionades del múscul blanc (cranial (Cr), per sota de l'aleta dorsal, i cabal (Ca), darrere de l'aleta anal). El pes corporal i la taxa de creixement específica (SGR) del grup d'exercici van ser significativament més elevades que en el grup control, sense incrementar el consum d'aliment, aquest fet apunta a una major eficiència d'ús dels nutrients. El perímetre i l'àrea de la secció transversal de les fibres cranials del múscul blanc va augmentar després de l'activitat sostinguda, evidenciant que l'exercici sostingut millora el desenvolupament muscular hipertrofic. No obstant això, no podem concloure o descartar la possibilitat de reclutament fibril·lar, pel fet que el període experimental va ser massa curt. La capillarització, que és extremadament baixa en el múscul blanc de l'orada, va mostrar un nombre major de fibres sense capil·lars circumdants (F0) a l'àrea cranial que a la zona cabal, en el grup control. La natació sostinguda va millorar el funcionament de la maquinària muscular fins i tot en teixits que normalment s'associen amb episodis curts d'activitat anaeròbica. Així, a través del seu efecte sobre l'ús dels nutrients i de les reserves tissulars, l'exercici contribueix a millorar el creixement del peix, el que pot contribuir a la reducció de les pèrdues de nitrogen.

CAPÍTOL IV**Diets labelled with ¹³C-starch and ¹⁵N-protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).**

Felip O.^{1,2}, Blasco J.^{1,2}, Ibarz A.^{1,2}, Martín-Pérez M.^{1,2}, Fernández-Borràs J.^{1,2}

¹*Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain.*

²*Centre de Referència i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.*

Les activitats fisiològiques dels animals estan fortament regulades pels ritmes diaris, per tant l'hora d'ingesta de l'aliment pot actuar com un marcador de ritme que condiciona l'assimilació dels nutrients i el seu ús. Es van alimentar tres grups d'orades (per triplicat) durant dos mesos amb un règim d'alimentació dissenyat que combinava dues dietes diferents: una dieta comercial (Cd), i una dieta experimental rica en carbohidrats i baixa en proteïna (Ed). La combinació de les dues dietes en dos àpats diaris (a les 10 h i les 17 h) va donar lloc a 3 règims d'alimentació, Cd/Cd, Cd/Ed i Ed/Cd (10 h/17 h). L'objectiu d'aquest treball va ser determinar quins efectes provoca l'hora en que s'administren els àpats i el tipus de dieta, en la transformació dels carbohidrats i la retenció de la proteïna després d'una ingesta forçada marcada amb proteïna-¹⁵N i midó-¹³C. Això es va dur a terme en dos experiments postprandials, (PF1 i PF2). També es va determinar la importància de que aquest sol àpat marcat s'administrés al matí (10 h) o a la tarda (17 h), evidenciant l'existència de ritmes diaris en la composició proximal del fetge i els músculs blanc i vermell. La retenció de marcador isotòpic en els diversos teixits, va revelar que els principals canvis metabòlics en la distribució i el destí dels nutrients durant el període postprandial es deuen en primer lloc al règim diari d'alimentació, però estan condicionats, en segon lloc, per l'última ingesta rebuda. La disminució del contingut de proteïnes de la dieta va ser compensat per una retenció proteica més eficient combinada amb un augment en l'ús dels carbohidrats com a font energètica. D'altra banda, podem apuntar que els carbohidrats no s'utilitzen tan eficientment a la tarda com al matí.

5. PUBLICACIONES

CAPÍTOL I

Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes ($[^{13}\text{C}]$ starch and $[^{15}\text{N}]$ protein): effects of gelatinization of starches and sustained swimming.



Publicat a la revista British Journal of Nutrition el 2012

Title

Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes ($[^{13}\text{C}]$ starch and $[^{15}\text{N}]$ protein): effects of gelatinization of starches and sustained swimming.

Authors

Olga Felip^{1,2*}, Antoni Ibarz^{1,2}, Jaume Fernández-Borràs^{1,2}, Marta Beltrán^{1,2}, Miguel Martín-Pérez^{1,2}, Josep V. Planas^{1,2} and Josefina Blasco^{1,2}

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain.

²Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.

E-mail: olga.felip@ub.edu

Running title: Tracing nutrients in trout with stable isotopes

Corresponding address:

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Avinguda Diagonal, 645 / E-08028 Barcelona, Spain

Phone: +34-93-402-15-57

Fax: +34-93-411-03-58

E-mail address: olga.felip@ub.edu

Key words: Delta (δ) ^{13}C and $\delta^{15}\text{N}$: carbohydrate: protein: sustained swimming

Abstract

Here we examined the use of stable isotopes, [¹³C]starch and [¹⁵N]protein, as dietary tracers to study carbohydrate assimilation and distribution and protein utilisation, respectively, by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The capacity of glucose uptake and use by tissues was studied, first, by varying the digestibility of carbohydrate-rich diets (30% carbohydrate), using raw starch and gelatinised starch (GS) and, second, by observing the effects of two regimens of activity (voluntary swimming, control; sustained swimming at 1.3 body lengths/s, exercise) on the GS diet. Isotopic ratio enrichment (¹³C and ¹⁵N) of the various tissue components (protein, lipid and glycogen) was measured in the liver, muscles, viscera and the rest of the fish at 11 and 24 h after a forced meal. A level of 30% of digestible carbohydrates in the food exceeded the capacity of rainbow trout to use this nutrient, causing long-lasting hyperglycaemia that raises glucose uptake by tissues, and the synthesis of glycogen and lipid in liver. Total ¹³C recovered 24 h post-feeding in the GS group was lower than at 11 h, indicating a proportional increase in glucose oxidation, although the deposition of lipids in white muscle (WM) increased. Prolonged hyperglycaemia was prevented by exercise, since sustained swimming enhances the use of dietary carbohydrates, mainly through conversion to lipids in liver and oxidation in muscles, especially in red muscle (RM). Higher recoveries of total ¹⁵N for exercised fish at 24 h, mainly into the protein fraction of both RM and WM, provide evidence that sustained swimming improves protein deposition, resulting in an enhancement of the protein-sparing effect.

Introduction

The capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to use dietary carbohydrates is controversial⁽¹⁻³⁾, although several authors have claimed that diets with a high content of digestible starch (20–30%) can stimulate growth^(4,5). However, while a protein-sparing effect from lipids has been reported in this species⁽⁶⁻⁸⁾, there is no clear evidence that carbohydrates also have a protein-sparing effect. The replacement of fishmeal by plant ingredients is a common practice in aquaculture, even in carnivorous fish. Since plant sources contain large amounts of carbohydrates, the use of this alternative energy source is of interest. The physical state of the animal, the molecular complexity and the amount of starch in the diet influence carbohydrate digestibility and tolerance, and also the efficiency of fish growth. If the protein content of the diet is adequate, low levels of gelatinised starches promote growth in carnivorous fish, such as European eel (*Anguilla anguilla*)⁽⁹⁾, cod (*Gadus morhua*)⁽¹⁰⁾, sturgeon (*Acipenser transmontanus*)⁽¹¹⁾, Atlantic salmon (*Salmo salar*)^(12,13) and turbot (*Scophthalmus maximus*)⁽¹⁴⁾. As we have shown in brown trout, uptake and use of glucose by tissues depends on plasma glucose concentration⁽¹⁵⁾ and after an aortic glucose overload, almost all tissues increase glucose uptake. This is particularly true for skeletal muscle, which is the main target of the glucose load⁽¹⁶⁾. This effect may also be exerted by high levels of dietary carbohydrates, although, to our knowledge, this has not been measured experimentally.

Fish generally swim aerobically at submaximal velocities⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Several fish species, when made to swim at about 1.3 body lengths/s (BL/s), show improved growth rate and food conversion efficiency⁽²⁰⁾ through the increase of aerobic potential of red muscle (RM) and white muscle (WM). There is no general agreement on how metabolic fuels support aerobic swimming in fish⁽²¹⁾. Protein and lipids were traditionally believed to be the main source of energy during sustained swimming in teleost fish, and carbohydrate utilisation was considered to be minimal⁽²²⁻²⁶⁾. However, Alsop & Wood⁽²⁷⁾ found that in satiation-fed rainbow trout, protein did not become more important as a fuel source during exercise. Further, Lauff & Wood⁽²¹⁾, using respirometric analyses, demonstrated that the most oxidised substrates during moderate swimming (55–85% U_{crit} ; critical swimming speed) were lipids, followed by carbohydrates, and then protein. Kieffer et al.⁽²⁸⁾ also found in rainbow trout that during swimming at 1 or 3 BL/s, protein use decreased to 15% while the relative contribution of both lipid and carbohydrates increased. On the other hand, Shanghavi & Weber⁽²⁹⁾ noted that sustained swimming for a period of 3 h causes a 33% decline in hepatic glucose production, but plasma glucose levels are maintained stable by closely matching peripheral glucose utilisation. However, glucose disposal can also be conditioned by the source or type of diet, carbohydrate content, feeding regimen, gelatinisation process, etc. (reviewed by Hemre et al.⁽²⁾). Traditionally, studies on fish metabolism have used radioactive isotopes, but labelling feed ingredients with radioactive markers can be harmful to users and the aquatic environment. Stable isotopes are now used to study protein metabolism in fish. Thus, ¹⁵N has been administered orally to measure protein synthesis in species such as rainbow trout (*O. mykiss*)⁽³⁰⁾, flounder (*Pleuronectes flesus*)⁽³¹⁾ or carp (*Cyprinus carpio*)⁽³²⁾. In the present study, we used stable isotopes as dietary tracers

([¹³C]starch and [¹⁵N]protein), as a preferred method for tracing dietary nutrient allocation in fish⁽³³⁾, with the following two aims: (1) to measure the effects of gelatinisation of starch on [¹³C]glucose uptake and use by tissues in rainbow trout fed a carbohydrate-rich diet; (2) to determine the effects of sustained swimming on the efficiency of carbohydrate use in this species. To our knowledge, there are no studies on routing both carbohydrates and protein from [¹³C]starch and [¹⁵N]protein added to the diet. This alternative method has allowed us to show improved assimilation and distribution of dietary carbohydrates, and their protein-sparing effect in rainbow trout under sustained swimming.

Experimental methods

Experimental design and sampling

Expt 1: effects of raw and gelatinised starch on glucose uptake by tissues of rainbow trout fed with carbohydrate-rich diets.

Rainbow trout from a local fish farm (Truchas del Segre, Lleida, Spain) were held in the facilities of the Faculty of Biology (University of Barcelona, Barcelona, Spain) in 1000 litre tanks with fresh water within a semi-closed system (10% of water renovation daily) with physical and biological filters, ozone skimmers and continuous aeration at 15°C and a 12 h light–12 h dark photoperiod. Fish with an average body weight of 180 g were randomly distributed into two experimental groups (twenty-five fish/tank), which were fed with two experimental diets with a high level of raw starch (RS) or gelatinised starch (GS) (see diet compositions given in Table 1). After 1 month, fourteen fish from each group were lightly anaesthetised and then force-fed a bolus, equivalent to 1% of body weight, with a gastric cannula. Fish were held in separated tanks for only a few minutes to check the acceptance of the forced meal. Any fish showing some degree of regurgitation was disqualified, and another one was used in its place. Fish were returned to their respective tanks and maintained for 11 or 24 h post-feeding. These two periods were chosen as they represent the post-absorption maximum (11 h) and nutrient use completion (24 h) time points. Diets were labelled with 3% [¹³C]starch ([¹³C]algal starch; Martek Biosciences Corporation, Columbia, MD, USA). Another four animals from each group received the same dietary ration containing non-labelled starch, and they were used to measure the background level of ¹³C, to establish the natural abundance (i.e. blank value of each sample). At 11 h after the oral administration of the diets, half of the fish (seven fish fed the diets labelled with stable isotope plus two fish as blanks) were anaesthetised, killed by sectioning the spinal cord and sampled. Blood samples from the caudal vessel were centrifuged (12.000 g, 5 min at 4°C) to obtain plasma. Portions of the liver, and WM and RM and viscera (gut plus perivisceral fat) were excised, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until analysis, as were the rest of the fish and plasma samples. The entire sampling procedure took less than 3 min from the death of

the fish, and the tissues with high glycogen hydrolytic capacity, such as muscle, were frozen first. After 24 h of forced-feeding, the remaining animals were sampled using the same protocol.

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets

	RS	GS
Ingredients (% DM)		
Fishmeal CP70	59.10	59.10
CPSP G	5.00	5.00
Crude wheat starch	30.00	0.00
Gelatinised wheat starch	0.00	30.00
Fish oil	2.90	2.90
Binder	1.00	1.00
Mineral premix*	1.00	1.00
Vitamin premix†	1.00	1.00
Proximate composition		
Crude protein (% DM)	44.39	44.39
Crude fat (% DM)	10.00	10.00
Digestible protein (% DM)	39.16	39.16
Digestible energy (kJ/g DM)	14.67	16.82
P (% DM)	1.77	1.77

RS, raw starch; GS, gelatinised starch; CPSP G, fish soluble concentrate protein with high-fat level.

* Supplied the following (mg/kg diet, except as noted): calcium carbonate (40 % Ca) 2.15 g, magnesium hydroxide (60 % Mg) 1.24 g, potassium chloride 0.9 g, ferric citrate 0.2 g, potassium iodide 4 mg, NaCl 0.4 g, calcium hydrogen phosphate 50 g, copper sulphate 0.3, zinc sulphate 40, cobalt sulphate 2, manganese sulphate 30, sodium selenite 0.3.

† Supplied the following (mg/kg diet): retinyl acetate 2.58, DL-cholecalciferol 0.037, DL- α -tocopheryl acetate 30, menadione sodium bisulphite 2.5, thiamin 7.5, riboflavin 15, pyridoxine 7.5, nicotinic acid 87.5, folic acid 2.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin B₁₂ 0.025, ascorbic acid 250, inositol 500, biotin 1.25, choline chloride 500.

Expt 2: effects of sustained swimming on the use of carbohydrates by rainbow trout.

Juvenile rainbow trout (with an average weight of 60 g) from the same fish farm were acclimatised indoors as in the previous experiment. For individual monitoring, sixty fish were identified with a passive integrated transponder (PIT) tag (Trovan Electronic Identification Systems, Madrid, Spain) near the dorsal fin, and were randomly distributed into four 200 litre circular tanks (fifteen fish/tank) at a density of 4 kg/m³. Of these four tanks, two were kept on standard rearing conditions, with a water flow of 350 litres/h and vertical water inflow. Fish in these conditions presented only spontaneous movements (voluntary swimming) and were used as the control group. The other two tanks (exercise group) were kept in a circular, uniformly distributed flow of 700 litres/h, induced by the perpendicular water entrance at the surface and a submerged water pump at the bottom of the tank, isolated from the free-living area. The shape of the tank prevented the fish from entering a central area of lower velocity, thus guaranteeing similar swimming velocities throughout the experiment. Consequently, water volume and fish density were the same as in the control group. This design and water flow resulted in a

swimming velocity of 1.3 BL/s, measured and adjusted at three different tank depths (surface, mid-tank and near the bottom) using a low-speed mechanical flow meter (General Oceanics, Inc., Miami, FL, USA). All fish were kept in the same semi-closed circuit, guaranteeing that physico-chemical water parameters were the same for both groups, and they were fed twice a day to apparent satiety with the diet rich in digestible carbohydrates (GS) for 1 month (see diet composition given in Table 1). Feed intake was recorded daily for each tank and the specific growth rate ($100 \times (\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight})/d$) and food conversion ratio (feed intake: wet body-weight gain) were also calculated for each tank at the end of the experimental period. After 1 month, eighteen fish from the exercise group and twelve from the control group were lightly anaesthetised and force-fed with a gastric cannula a ration of 1% of diet labelled with 1% [¹⁵N]*Spirulina* protein and 3% [¹³C]algal starch. From each group, two other fish received the same dietary ration containing similar proportions of non-labelled *Spirulina* protein and algal starch. These four fish were used to measure natural abundances of ¹⁵N and ¹³C in samples (blank values). After force-feeding, fish were held for a few minutes in separate tanks as indicated for the first experiment. Then, fish were returned to their respective tanks and maintained for 11 or 24 h post-feeding (exercise group swam until the moment they were sampled). At 11 h after feeding, nine fish from the sustained swimming group and six from the control group were anaesthetized and killed by sectioning the spinal cord. Samples of blood were extracted from caudal vessels, and then, samples of liver, WM and RM, viscera (gut plus perivisceral fat) and the rest of the fish were rapidly excised, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until analysis. As in the first experiment, the entire sampling procedure took less than 3 min from the death of the fish, and the tissues with high glycogen hydrolytic capacity, such as muscle, were frozen first. The same procedure was repeated at 24 h post-feeding with the other nine and six fish from the sustained swimming and control groups, respectively. Although the initial body weight of rainbow trout differed between the two experiments, all fish can be considered as juvenile fish in a linear phase of growth. For the exercise trial, we used fish of 60 g constrained by the size and number of the tanks available for implementing sustained swimming.

Before conducting the animal trials, prior approval of the Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA-UB, Ethics committee) was obtained. The specific ethics approval number for the protocol was CEEA-96/09.

Plasma analysis and proximal composition of tissue Samples

Plasma was used to determine glucose concentration (Commercial Kit Glucofix, Menarini, Italy) based on the enzymatic method of glucose oxidase described by Werner et al.⁽³⁴⁾. Tissue samples (liver, muscles and viscera) were homogenized in liquid N₂ using a pestle and mortar to obtain a fine powder. The rest of the fish was homogenised at -20°C using a food homogeniser (Pacojet AG, Zug, Switzerland). Samples were apportioned for the various analyses: percentage of lipids, proteins, glycogen and water determination, and one part of the

sample was used for isotopic analysis. Tissue water content was determined gravimetrically after drying the samples at 100°C for more than 24 h. Lipids were extracted as described by Folch et al.⁽³⁵⁾. The washed lipid extracts were dried under a N₂ atmosphere and the lipid content was determined gravimetrically. Protein was purified from defatted samples via precipitation with 10% (v/v) trifluoroacetic acid. Protein extracts were dried by a vacuum system (Speed Vac Plus, AR, Savant Speed Vac Systems, South San Francisco, CA, USA) and protein content was calculated from N obtained by elemental analysis (Elemental Analyser Flash 1112, ThermoFinnigan, Bremen, Germany), assuming that N content is 1 g for every 6.25 g of protein. Glycogen was extracted and purified by alcoholic precipitation after alkaline tissue hydrolysis with 30% KOH in heat⁽³⁶⁾. Glycogen content was analysed using the anthrone colorimetric method described by Fraga⁽³⁷⁾.

δ¹⁵N and δ¹³C determination in tissues and expression of results

The enrichments in ¹³C were determined in both experiments, and the enrichments in ¹⁵N were measured in the second experiment. Dried samples of diets and tissues, as well as the purified lipid, glycogen and protein fractions of each tissue, were lyophilised and ground in a mortar to a homogeneous powder for isotope-ratio mass spectrometry analysis. Aliquots ranging from 0.3 to 0.6 mg were accurately weighed in small tin capsules (3.3 x 5 mm; Cromlab, Barcelona, Spain). Samples were analysed for C and N isotope composition using a Mat Delta C isotope-ratio mass spectrometry (Finnigan MAT, Bremen, Germany) coupled to an elemental analyser (Flash 1112) at Barcelona University 'Serveis Científico-Tècnics'. Isotope ratios (¹⁵N/¹⁴N, ¹³C/¹²C) are expressed on a relative scale as deviation, referred as δ units with the notation ‰, parts per thousand, relative to the isotope ratio content of international standards: Pee Dee Belemnite (a calcium carbonate) for C and air for N.

δ values were determined as follows:

$$\delta = ((R_{sa} / R_{st}) - 1) \times 1000,$$

where $R_{sa} = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ or ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ of samples and $R_{st} = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ or ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ of standards. The same reference material analysed over the analysis period was measured with about 0.2‰ precision for natural materials and about 0.4‰ precision for enriched materials. The δ values are expressed as atom percentage (at %) as follows:

$${}^{13}\text{C at \%} = 100 \times ({}^{13}\text{C} / ({}^{13}\text{C} + {}^{12}\text{C})),$$

$${}^{15}\text{N at \%} = 100 \times ({}^{15}\text{N} / ({}^{15}\text{N} + {}^{14}\text{N})).$$

The net enrichments (atom percentage excess) in ¹³C and ¹⁵N of glycogen, lipid, protein and whole tissue were calculated by the difference between the atom percentage of samples and their corresponding blank values:

Atom percentage excess = at% sample - at% blank.

Finally, using the values of atom percentage excess, molecular weight and Avogadro's number, the results are expressed as the percentage of marker in relation to the ingested dose (g/100 g ¹³C or ¹⁵N ingested) in each tissue fraction (glycogen, lipid and protein), which was calculated as follows:

$$100 \times ((g \text{ } ^{13}\text{C or } ^{15}\text{N} / g \text{ t. fr.}) \times (g \text{ t. fr.} / g \text{ tissue}) \times (g \text{ tissue} / g \text{ b.w.}) / (g \text{ ingested } ^{13}\text{C or } ^{15}\text{N} / g \text{ b.w.})) \quad (1)$$

where t. fr. is the tissue fraction and b.w. is the body weight. The free pool of each tissue was calculated as the difference between isotope levels in the entire organ or tissue and the sum of the three tissue fractions. So, the measure in an entire organ, or tissue, represents the sum of all fractions (Eq. (1) + free pool) for ¹³C or ¹⁵N. In whole fish, it was calculated as the sum of all tissues (liver, WM and RM, viscera and the rest of the fish) for ¹³C or ¹⁵N.

For liver and viscera, the exact mass of the total tissue sample was measured by weighing the entire individual organs from the experimental fish. However, in order to estimate the total mass of WM and RM, we made accurate dissections of another ten fish under the same conditions as indicated earlier. The muscle-somatic index (g muscle/100 g body weight) obtained presented the values of 40% for WM and 4% for RM.

Statistics

Results are presented as means with their standard errors. Unpaired t tests were used to compare the two experimental groups at 11 and 24 h, respectively, and in the two periods of the same condition. All statistical analyses were performed using SPSS version 14 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Expt 1: effects of raw and gelatinised starch on glucose uptake by tissues of rainbow trout fed with carbohydrate-rich diets

Plasma glucose levels and tissue proximal composition. The two forms of starch, RS and GS, in the diets are digested and absorbed at different rates, as reflected in the postprandial plasma glucose levels shown in Fig. 1. At 11 h after the meal, rainbow trout in the GS group presented plasma glucose levels 3-fold higher than the RS group (17 and 5.6 mM, respectively). Although at 24 h after a meal, plasma glucose levels in the GS group decreased by 30%, the hyperglycaemic situation was maintained (10.3 mM; $P < 0.05$). Higher amounts of assimilated

carbohydrates also entailed 5-fold higher liver glycogen content in the GS group than in the RS group (GS, 10.28 (SEM 1.58)% wet weight; RS, 2.02 (SEM 0.29)% wet weight; $P < 0.05$), causing hypertrophy of the organ (hepatosomatic index: GS, 1.82 (SEM 0.09)% wet weight; RS, 1.29 (SEM 0.03)% wet weight; $P < 0.05$) and a concomitant reduction of the other tissue components (lipid: GS, 2.7 (SEM 0.2)% wet weight; RS, 4.3 (SEM 0.12)% wet weight; $P < 0.05$; protein: GS, 11.2 (SEM 0.3)% wet weight; RS, 16.2 (SEM 0.4)% wet weight; $P < 0.05$).

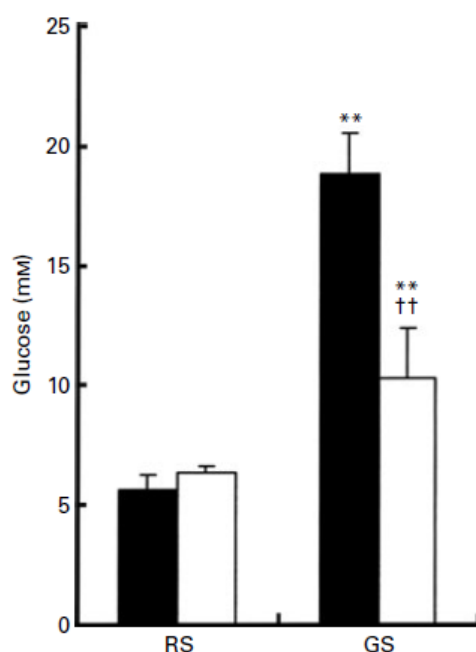


Fig. 1. Plasma glucose concentration (mM) in rainbow trout fed with the raw starch (RS) and gelatinised starch (GS) diets, 11 (in black) and 24 h (in white) after force-feeding. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 9). ** Mean values were significantly different between the RS and GS groups ($P < 0.01$). †† Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.01$).

$\delta^{13}\text{C}$ taken up by tissues. The total recovery of ^{13}C from whole fish and entire organs is shown in Fig. 2. Changes in this variable paralleled those observed in plasma glucose. Thus, while there were no differences in the RS group in the ^{13}C recovered between 11 and 24 h (18 and 22%, respectively), higher levels were recovered in the GS group at 11 h (28%), with a marked decrease at 24 h (18%). The uptake of ^{13}C in RM and WM increased from 11 to 24 h post-feeding in both groups. Thus, in the RS group, ^{13}C increased by 60% in RM and 78% in WM, and in the GS group, it increased by 175% in RM and 100% in WM. Taking into account the total muscle mass of rainbow trout, more than 40% of body weight, the ^{13}C taken up by muscles was the main allocation site of the dietary [^{13}C]starch (43% of the ^{13}C ingested was recovered in the RS group and 41% in the GS group).

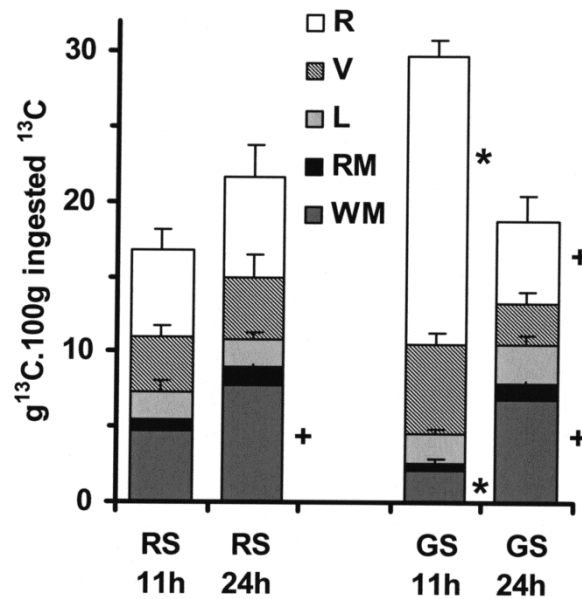


Fig. 2. Recovery of ¹³C (as a percentage of ingested isotope) from entire organs or tissues (WM, white muscle; RM, red muscle; L, liver; V, viscera; R, the rest of the fish) of rainbow trout fed with the raw starch (RS) and gelatinised starch (GS) diets, 11 and 24 h after force-feeding. The sum of the stacked bar represents the total recovery from whole fish (see the Experimental methods section for details of the calculations). Values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n = 7$). * Mean values were significantly different between the RS and GS groups ($P < 0.05$). † Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.05$).

The comparison of the values of ¹³C recovered in each tissue fraction (protein, lipid and glycogen) in liver and WM is shown in Fig. 3. There were clear differences between the two diets in the fate of nutrients. The highest amount of ¹³C in the liver of the RS group was found in protein (36% of total) and in glycogen (32%), with only 8% in lipids. In the GS group, the highest labelled fraction in liver was lipids (27% of total), then glycogen (19%) and protein (12%) (Fig. 3(a)). In WM, the levels of ¹³C recovered in protein and lipid components of the GS group increased significantly between 11 and 24 h post-feeding (Fig. 3(b)). The incorporation of ¹³C from dietary starch to muscle glycogen is shown in Fig. 4. No differences were found between the diets, although there was a significant correlation between ¹³C levels in glycogen and the amount of glycogen present in RM ($r = 0.84$, $P < 0.01$) and WM ($r = 0.94$, $P < 0.001$), where ¹³C deposition in glycogen in RM was 9-fold higher than that in WM.

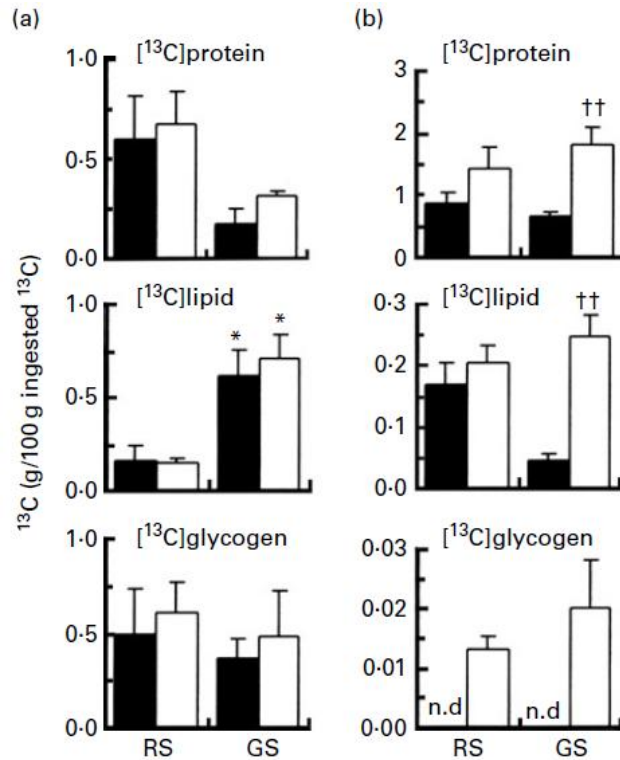


Fig. 3. Recovery of ¹³C (as a percentage of ingested isotope) from (a) liver and (b) white muscle fractions (protein, lipid and glycogen) of rainbow trout fed with the raw starch (RS) and gelatinised starch (GS) diets, 11 (in black) and 24 h (in white) after force-feeding (see the Experimental methods section for details of the calculations). Recovery of ¹³C from the glycogen fraction of white muscle was below the limit of detection (n.d., not detected). Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (*n* 7). * Mean values were significantly different between the RS and GS groups (*P* < 0.05). †† Mean values were significantly different between 11 and 24 h (*P* < 0.01).

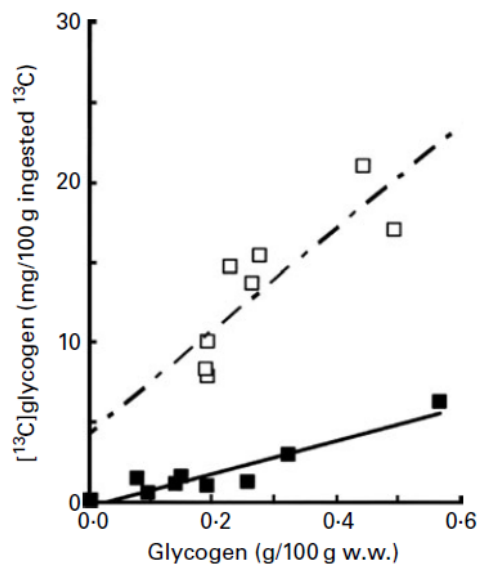


Fig. 4. Relationship between the glycogen content (g / 100 g wet weight (w.w.)) and the percentage of [¹³C]glycogen recovered from dietary starch in white muscle (in black; $y = 10.315x - 0.2796$, $R^2 = 0.8829$; $P < 0.001$) and red muscle (in white; $y = 32.18x + 4.316$, $R^2 = 0.7049$; $P < 0.01$) of rainbow trout.

*Expt 2: effects of sustained swimming on the use of carbohydrates by trout***Food intake, fish growth, plasma glucose levels and tissue proximal composition.**

Sustained swimming caused a significant increase in food intake (control, 2.54 (SEM 0.14)% body weight; exercise, 3.09 (SEM 0.15)% body weight; $P < 0.05$), reflecting higher metabolic costs but without impairing growth (specific growth rate: control, 2.24 (SEM 0.34)% body weight; exercise, 2.63 (SEM 0.03)% body weight). The food conversion ratio did not change significantly (control, 1.32 (SEM 0.37); exercise, 1.36 (SEM 0.11)). Under exercise, plasma glucose levels increased at 11 h after feeding ($P < 0.05$), but decreased significantly with respect to the control group at 24 h (Fig. 5).

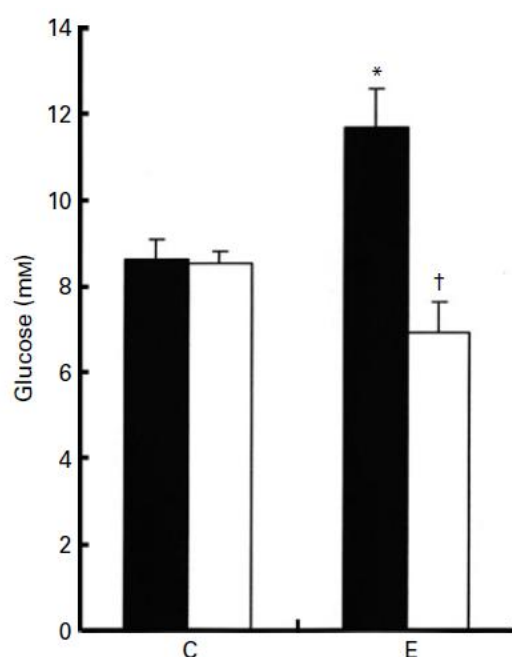


Fig. 5. Plasma glucose concentration (mM) in rainbow trout subjected to sustained swimming (exercise, E) or to voluntary swimming (control, C), 11 (in black) and 24h (in white) after force-feeding. Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 6, C) and (n 9, E). * Mean values were significantly different between the two experimental groups ($P < 0.05$). † Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.05$).

Proximate composition of liver, RM and WM, at both 11 and 24 h post-feeding, is shown in Table 2. Exercise modified liver composition due to a transient increase in glycogen content at 11 h and lipid mobilisation at 24 h post-feeding. Fish under exercise increased the glycogen content in RM and the lipid content in WM.

Table 2. Proximal composition of liver and muscle in rainbow trout subjected to sustained swimming (Mean values with their standard errors, *n* 6)

	11 h				24 h			
	Control		Exercise		Control		Exercise	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Liver								
HSI	1.8	0.11	2.1	0.25	1.5	0.09	1.8*	0.08
Liver glycogen (% wet weight)	5.6	0.54	10.3*	1.24	5.2	0.90	7.3	0.58
Liver lipid (% wet weight)	4.2	0.09	4.0	0.11	4.4	0.18	3.4*†	0.13
Liver protein (% wet weight)	12.8	0.33	11.3	0.76	13.8	0.60	12.4	0.48
RM								
RM glycogen (% wet weight)	0.68	0.09	1.00	0.11	0.52	0.04	0.77*	0.06
RM lipid (% wet weight)	7.2	0.93	8.1	0.94	7.2	0.37	6.6	0.60
RM protein (% wet weight)	13.4	0.49	16.5	0.53	13.3	0.87	14.4	0.30
WM								
WM glycogen (% wet weight)	0.13	0.03	0.08	0.01	0.28	0.10	0.07	0.01
WM lipid (% wet weight)	2.04	0.30	2.88	0.39	1.03†	0.3	3.49*	0.43
WM protein (% wet weight)	17.7	0.42	17.2	0.32	18.2	0.22	17.5	0.23

HSI, hepatosomatic index; RM, red muscle; WM, white muscle.

* Mean values were significantly different between the two experimental groups ($P < 0.05$).

† Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.05$).

$\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ taken up by tissues. The recoveries of ^{13}C in glycogen, lipid, protein and free pool in liver, and WM and RM are shown in Fig. 6. In liver, sustained swimming induced higher total recoveries of ^{13}C (2-fold) with respect to the control group at both 11 and 24 h, also in parallel with plasma glucose changes. The higher recovery in the liver of the exercise group was due, in part, to significant depositions of ^{13}C in protein and lipid fractions at 11 h (4- and 5-fold higher, respectively) and in the free pool at 24 h (7-fold increase). In WM, sustained swimming induced a significantly higher recovery of ^{13}C ($P < 0.05$), especially due to the recovery in the free pool at 11 h post-feeding. The ^{13}C recovered in the protein fraction increased at 24 h ($P < 0.05$) in both groups, but the incorporation of ^{13}C in the other tissue stores (lipid and glycogen) differed in the two groups. Thus, the control group significantly increased ^{13}C in glycogen (control, 95 (SEM 29) v. exercise, 2.2 (SEM 0.3) mg [^{13}C]glycogen / 100 g of ^{13}C ingested; $P < 0.05$), whereas in the exercise group higher deposition of ^{13}C in the lipid fraction was observed (control, 29 (SEM 12) v. exercise, 92 (SEM 16) mg [^{13}C]lipid / 100 g of ^{13}C ingested; $P < 0.05$). In RM, more than 85% of ^{13}C labelling was in the free pool, whereas depositions in protein and glycogen reserves were lower and no deposition was observed in lipids. However, the exercise group presented lower deposition of ^{13}C in the glycogen fraction than that of the control group.

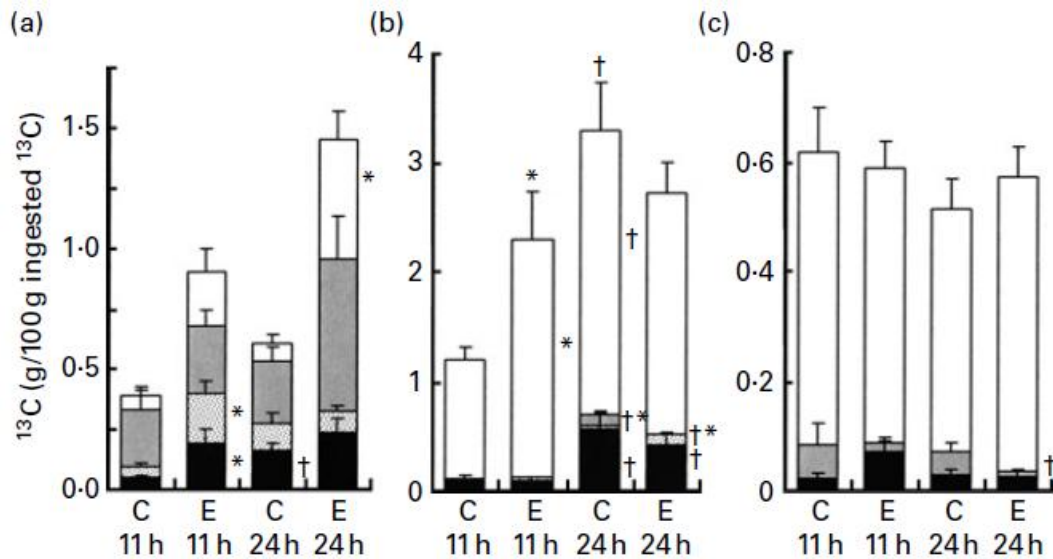


Fig. 6. Recovery of ¹³C (as a percentage of ingested isotope) from (a) liver, (b) white muscle and (c) red muscle fractions (protein (■), lipid (▒), glycogen (▣) and free pool (□)) of rainbow trout subjected to sustained swimming (exercise, E) or to voluntary swimming (control, C), 11 and 24 h after force-feeding (see the Experimental methods section for details of the calculations). Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (*n* 6, C) and (*n* 9, E). * Mean values were significantly different between the two experimental groups ($P < 0.05$). † Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.05$).

The recoveries of ¹⁵N in protein and the free pool fractions of liver, and WM and RM are shown in Fig. 7. Sustained swimming did not modify the ¹⁵N recovery in liver, and the fate of ¹⁵N from dietary protein revealed the same pattern in WM and RM. The greatest recovery of total ¹⁵N, due to the higher recovery in the protein fraction, occurred at 24 h in both muscles of the exercise group ($P < 0.05$).

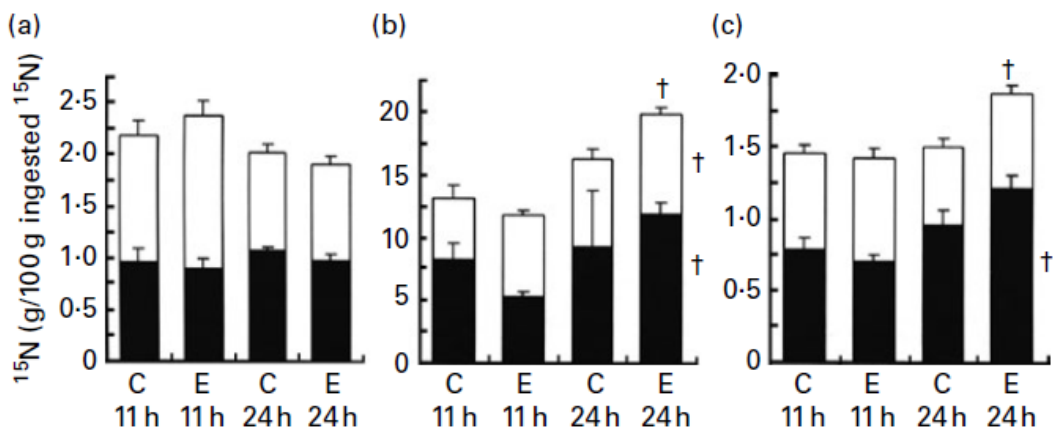


Fig. 7. Recovery of ¹⁵N (as a percentage of ingested isotope) from the protein (in black) and free pool (in white) fractions of the (a) liver, (b) white muscle and (c) red muscle of rainbow trout subjected to sustained swimming (exercise, E) or to voluntary swimming (control, C), 11 and 24 h after force-feeding (see the Experimental methods section for details of the calculations). Values are means, with their standard errors

represented by vertical bars (n 6, C) and (n 9, E). * Mean values were significantly different between the two experimental groups ($P < 0.05$). † Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.05$).

As a summary of all results, Fig. 8 (a) and (b) presents the total recoveries of ^{13}C and ^{15}N , respectively, after a single forced meal, including all tissues and fractions. The high ^{13}C recovery in whole fish under exercise, although not significantly different than that of the control group at 11 h, decreased significantly between 11 and 24 h. At 24 h, the total ^{15}N recovered in whole fish of the exercise group was significantly higher.

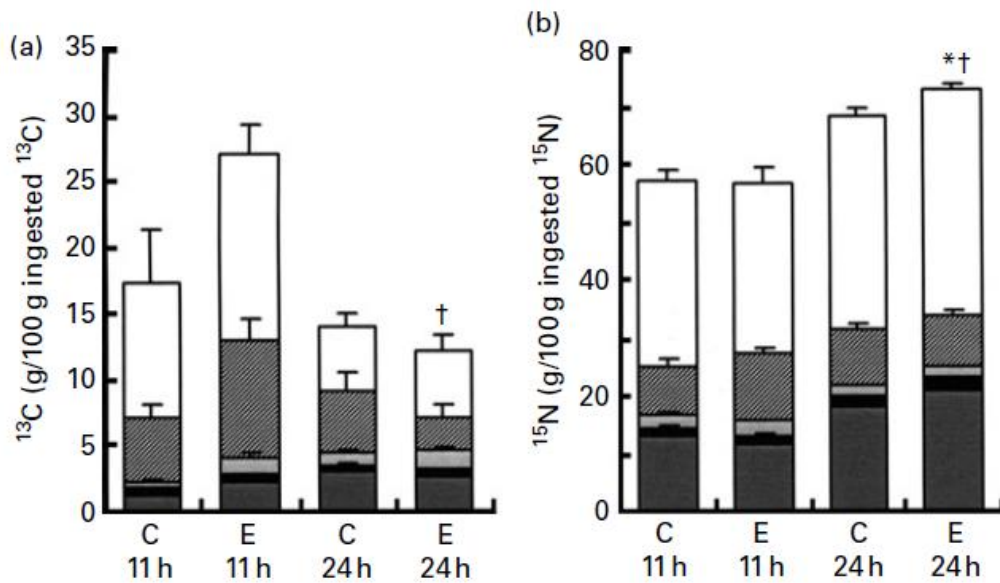


Fig. 8. Recovery of (a) ^{13}C and (b) ^{15}N (as a percentage of ingested isotope) from entire organs or tissues (WM (■), white muscle; RM (■), red muscle; L (■), liver; V (■), viscera; R (□), the rest of the fish) of rainbow trout subjected to sustained swimming (exercise, E) or to voluntary swimming (control, C), 11 and 24 h after force-feeding. The sum of the stacked bar represents the total recovery from whole fish (see the Experimental methods section for details of the calculations). Values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n 6, C) and (n 9, E). * Mean values were significantly different between the E and C groups ($P < 0.05$). † Mean values were significantly different between 11 and 24 h ($P < 0.05$).

Discussion

For the first time, two stable isotopes ($[^{13}\text{C}]$ starch and $[^{15}\text{N}]$ protein) have been incorporated into fish diets as labels to study the fate of both nutrients in a species of reference, the rainbow trout. The use of $[^{13}\text{C}]$ starch allowed us to analyse the distribution of dietary carbohydrates depending on the degree of gelatinisation. However, we should point out two limitations with this method that reduces its value for the assessment of the use of $[^{13}\text{C}]$ starch: the amount of label lost with the undigested food and the small amount of glucose lost via the urine in fish with the highest glycaemia^(15,38). The long-lasting hyperglycaemia observed in the group fed the GS diet

indicates higher absorption of carbohydrates in this group than in those fed RS. The digestibility of the two diets was not analysed in the present study, but we assume that the theoretical values of 58% for RS and 90% for GS are correct (see Brauge et al.⁽³⁹⁾ and Kaushik et al.⁽⁴⁰⁾). This assumption is consistent with the postprandial glucose levels measured. Long-lasting hyperglycaemia in trout was previously seen as a result of feeding a high-carbohydrate diet⁽⁴¹⁾ or of a high glucose dose administered orally^(16,42). Many fish species correct hyperglycaemia following a high-carbohydrate meal less rapidly than endotherms^(1,43,44). Apart from the differences in body temperature and metabolic rate, another reason, at least in rainbow trout, is a persistent, high level of endogenous glucose production from the liver⁽⁴⁵⁾. Key enzymes of gluconeogenesis in this species are always highly expressed, independently of nutritional status⁽⁴⁶⁾. In the present study, fish fed GS took up much more glucose into tissues, as shown by their higher plasma glucose levels and higher total recovery of ¹³C in tissues at 11 h. These higher uptake rates could contribute to the marked reduction of plasma glucose levels at 24 h in this group. These results are consistent with our previous study showing that brown trout (*Salmo trutta*) after an aortic glucose load labelled with ¹⁴C presented higher glucose uptake rates into tissues, in proportion to the hyperglycaemia⁽¹⁶⁾.

In the present study, the [¹³C]glucose dilution was different in the RS and GS groups due to the similar amount of tracer delivered and the different glycaemia observed. Since the percentage of total ¹³C recovered in muscle (WM plus RM) was similar in the two groups (nearly 40% of the total ¹³C recovered), the total amount of glucose taken up by the GS group must have been higher than that by the RS group. These results also reinforce the idea that skeletal muscle of rainbow trout is the main peripheral site of glucose disposal, similarly to what was observed in cod⁽⁴⁷⁾, Atlantic salmon⁽⁴⁸⁾ and brown trout⁽¹⁶⁾. The ¹³C deposition rate into glycogen depots in RM was nine times higher than in WM, in agreement with the different capacity of glycogen repletion of each kind of muscle in exercised rainbow trout⁽⁴⁹⁾. So, the importance of WM as the main site of glucose disposal cannot be overlooked, based on the large relative mass of the tissue. Higher carbohydrate uptake by the muscles of the GS group caused a proportional increase in ¹³C recovered in all muscle reserves, especially in protein and lipid, in agreement with the results observed in brown trout after an aortic glucose load⁽¹⁶⁾. In rainbow trout, high dietary levels of digestible carbohydrates increased hepatic lipid content⁽⁵⁰⁾, suggesting hepatic lipogenesis from carbohydrates⁽⁵¹⁾. In accordance with these studies, the present results show that higher glucose uptake in the liver of the GS group produced an increase of the glycogen depots (observed after 1 month of the GS diet) and the de novo synthesis of lipids in the liver.

In the present study, nearly 20% of the total ¹³C ingested was recovered at 24 h, whereas in Atlantic salmon, the ¹⁴C recovered ranged between 13 and 15%⁽⁴⁸⁾. Differences in species and in methodological conditions (tracer, starch or glucose) might explain these discrepancies. Glucose oxidation can be calculated from the difference between ¹³C ingested and ¹³C recovered from the whole fish after 24 h post-feeding, but the values of 82% of glucose oxidised in the GS group and 77% in the RS group can be overestimates of the actual values

due to the losses indicated before. The main issue, however, is that the measurement of ¹³C in tissue stores confirms that excess glucose promotes lipogenesis, leading to significantly higher depots of newly formed, saturated fat in liver and muscle, even in trout accustomed to this diet.

Summarising all the results of the first experiment, gelatinization of starch improved the absorption of dietary carbohydrates, causing a long-lasting hyperglycaemia, and glucose uptake by tissues rose in proportion to the plasma glucose concentrations in the post-absorptive period. This higher rate of glucose uptake by tissues favoured the synthesis of lipid in the liver. A level of 30% digestible carbohydrates fed daily, however, exceeds the capacities of rainbow trout to use this nutrient, as reflected in the hyperglycaemia maintained after 24 h and the deposition of lipids in WM. Consequently, if these lipids are not consumed as energy fuel, they will be deposited as saturated fat, which in excess can affect the fish fillet quality. This can be prevented by increasing energy expenditure through the induction of exercise. In the second experiment, only the GS diet was used to determine the effects of moderate, sustained swimming on the use of nutrients as energy fuels. The swimming regimen of 1.3 BL/s for 1 month was used as a 'metabolic promoter'. In this situation of induced activity, rainbow trout increased feed intake to compensate for the higher energy costs due to the exercise. Although Davison & Goldspink⁽⁵²⁾ found an increase of food conversion ratio in exercised brown trout fed chopped liver, no significant differences were observed between the groups in the present study, perhaps due to the dietary differences. Rainbow trout growth rate showed a tendency to increase in exercise, in agreement with the results reported by Houlihan & Laurent⁽⁵³⁾ and Farrell et al.⁽⁵⁴⁾.

A carbohydrate-rich diet fed under exercise also induced transitory hyperglycaemia 11 h post-feeding, but glycaemia returned to control values at 24 h. This transitory hyperglycaemia in the swimming group is attributed to higher food ingestion. As indicated before, the maintenance of hepatic gluconeogenesis in rainbow trout feeding carbohydrate-rich diets^(45,55) can contribute to hyperglycaemia. As observed in the first experiment, hyperglycaemia raised glucose uptake rates in liver and WM. Thus, in liver, the total recovery of ¹³C was 2-fold higher in the exercise group, indicating greater uptake and deposition into the various tissue reserves. The postprandial variation of glycogen content, related to glycaemia, was evidence of higher carbohydrate uptake and use in exercised fish than in controls. Moreover, hepatic lipogenesis from dietary carbohydrates was also enhanced and, combined with the lower level of liver fat in the exercise group at the end of the experiment, this observation supports the idea of higher mobilisation of hepatic lipids to extrahepatic tissues. The increase in muscle lipid content in the exercised rainbow trout, in agreement with the increase in muscle lipid content found in several fish species under exercise conditions^(52,56,57), should in part be caused by such mobilisation. Fish rely mainly on fatty acids to fuel submaximal exercise⁽²⁸⁾, mediated by an enhancement of lipoprotein lipase activity in RM⁽⁵⁸⁾. However, the origin of these lipids has not been traced previously. The addition of [¹³C]algal starch to the diet enabled us to ensure that lipid synthesised de novo in the liver is mobilised and transported to skeletal muscles and oxidised or used to replenish stores. The present results on the lack of ¹³C in the lipid fraction of RM

support the notion that lipids are highly used as aerobic energy fuel by this tissue, as reported by Magnoni & Weber⁽⁵⁸⁾. On the other hand, the balance in WM results in a net lipid deposition. Additional information can be drawn from high levels of ¹³C recovered in the free pool of RM. This labeling corresponds to several kinds of molecules of the intermediary metabolism and is indicative of the higher metabolic activity of RM. During moderate and sustained swimming, RM burns not only fatty acids provided by the liver, but also glycogen. The present results support that dietary carbohydrates play a key role in muscle metabolism during exercise. Moreover, West et al.⁽⁵⁹⁾ reported a 30-fold rise in glucose use by RM in rainbow trout under a steady swimming speed at 80% U_{crit} . Non-protein energy sources spare dietary protein from oxidation as fuel, thus releasing it for growth. Thus, high protein efficiency ratios in rainbow trout fed diets containing about 30% of digestible carbohydrates have been reported^(4,60). In the present study, the use of [¹⁵N]protein as a dietary tracer allowed us to measure the amount of protein allocated to the main tissues following a single meal. Houlihan & Laurent⁽⁵³⁾ reported that both protein synthesis and protein degradation increased in exercised rainbow trout, leading to increased growth rate. In the present study, the greatest recovery of total ¹⁵N for exercised fish at 24 h, mainly in the protein fraction of RM and WM, is evidence that exercise improves protein deposition. Exercise may also reduce N wastes. In conclusion, one forced-feeding with labelled nutrients, [¹³C]starch and [¹⁵N]protein, has allowed us to show that sustained swimming in rainbow trout improves the use of digestible carbohydrates and of lipid and glycogen depots, resulting in an enhancement of the protein-sparing effect.

Acknowledgements

We thank Dr F. Medale (INRA, St Pee) for providing the experimental diets. The present study was supported by grants from the Catalan government and the Spanish government (AGL2002-03987 to J. V. P.). O. F. and M. M.-P. received fellowships from FPI-2007 and FI-2007 of the Spanish government and the Catalan government, respectively. The authors' responsibilities were as follows: J. F.-B., A. I., and J. B. planned the project. J. F.-B., A. I., J. B., O. F., M. B. and M. M.-P. carried out the experiment and collected the samples. O. F. carried out the laboratory analyses. O. F., A. I., J. F.-B., J. V. P. and J. B. carried out the data analysis and interpretation and O. F. and J. B. wrote the manuscript; all authors read and approved the final manuscript. The authors declare that they have no competing interests to report.

References

1. Wilson RP (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124, 67–80.
2. Hemre GI, Mommsen TP & Krogdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* 8, 175–194.
3. Stone DAJ (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev Fish Sci* 11, 337–369.
4. Kim DJ & Kaushik SJ (1992) Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 106, 161–169.
5. Capilla E, Médale F, Navarro I, et al. (2003) Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept* 110, 123–132.
6. Beamish FWH & Medland TE (1986) Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 55, 35–42.
7. Murai T (1992) Protein nutrition of rainbow trout. *Aquaculture* 100, 191–207.
8. Rasmussen RS, Ostefeld TH & McLean E (2000) Growth and feed utilisation of rainbow trout subjected to changes in feed lipid concentrations. *Aquac Int* 8, 531–542.
9. Degani G, Viola S & Levanon D (1986) Effects of dietary carbohydrate source on growth and body composition of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture* 52, 97–104.
10. Hemre GI, Lie Ø, Lied E, et al. (1989) Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. *Aquaculture* 80, 261–270.
11. Hung SSO, Fynn-Aikins K, Lutes PB, et al. (1989) Ability of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources. *J Nutr* 119, 727–733.
12. Hemre GI, Sandnes K, Lie Ø, et al. (1995) Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: growth and feed utilization. *Aquac Res* 26, 149–154.
13. Hemre GI & Hansen T (1998) Utilisation of different dietary starch sources and tolerance to glucose loading in Atlantic salmon (*Salmo salar*), during parr–smolt transformation. *Aquaculture* 161, 145–157.
14. Stephan G, Dreanno C, Guillaume J, et al. (1996) Incidence of different amounts of proteins, lipids and carbohydrates in diets on the muscle lipid composition in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ichthyophysiol Acta* 19, 11–30.
15. Blasco J, Fernández J, Marimón I, et al. (1996) Plasma glucose kinetics and tissue uptake in vivo in brown trout. Effect of an intravascular glucose load. *J Comp Physiol B* 165, 534–541.
16. Blasco J, Marimón I, Viaplana I, et al. (2001) Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiol Biochem* 24, 247–258.
17. Weihs D (1973) Optimal fish cruising speed. *Nature (London)* 245, 48–50.
18. Beamish FWH (1978) Swimming capacity. In *Fish Physiology*, vol. VII Locomotion, Chapter 2. pp. 101–187 [WS Hoar and DJ Randall, editors]. New York: Academic Press.

19. Quinn TP (1987) Estimated swimming speeds of migrating adult sockeye salmon. *Can J Zool* 66, 2160–2163.
20. Davison W (1997) The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 117, 67–75.
21. Lauff RF & Wood CM (1996) Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B* 166, 501–509.
22. Driedzic WR & Hochachka PW (1978) Metabolism in fish during exercise. In *Fish Physiology*, vol. VII Locomotion, Chapter 8. pp. 503–543 [WS Hoar and DJ Randall, editors]. New York: Academic Press.
23. Walton MJ & Cowey CB (1982) Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 73, 59–79.
24. Van Waarde A (1983) Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 74, 675–684.
25. Jobling M (1994) Respiration and metabolism. In *Fish Bioenergetics*, part two, Chapter 8 [M Jobling, editor]. London: Chapman and Hall Fish and Fisheries Series 13.
26. Moyes CD & West TG (1995) Exercise metabolism of fish. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. IV, Chapter 16, pp. 367–392 [PW Hochachka and TP Mommsen, editors]. Amsterdam: Elsevier.
27. Alsop DH & Wood CM (1997) The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 200, 2337–2346.
28. Kieffer JD, Alsop D & Wood CM (1998) A respirometric analysis of fuel use during aerobic swimming at different temperatures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 201, 3123–3133.
29. Shanghavi DS & Weber JM (1999) Effects of sustained swimming on hepatic glucose production of rainbow trout. *J Exp Biol* 202, 2161–2166.
30. Carter CG, Owen SF, He ZY, et al. (1994) Determination of protein-synthesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using a stable-isotope. *J Exp Biol* 189, 279–284.
31. Carter CG, Houlihan DF & Owen SF (1998) Protein synthesis, nitrogen excretion and long-term growth of juvenile *Pleuronectes flesus*. *J Fish Biol* 53, 272–284.
32. Meyer-Burgdorff K & Rosenow H (1995) Protein turnover and energy metabolism in growing carp 1. Method of determining N-turnover using a ¹⁵N-labelled casein. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 73, 113–122.
33. Beltrán M, Fernández-Borrás J, Médale F, et al. (2009) Natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquac Nutr* 15, 9–18.
34. Werner W, Rey HG & Wielinger H (1970) On the properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood according to the GOD/POD-method. *Z Analyt Chem* 252, 224.

35. Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.
36. Good BCA, Cramer H & Somogy M (1933) The determination of glycogen. *J Biol Chem* 100, 491.
37. Fraga F (1956) Determination of glycogen in shellfish with the anthrone reagent (Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona). *Investigaciones Pesqueras* 3, 69.
38. Bucking C & Wood CM (2005) Renal regulation of plasma glucose in the freshwater rainbow trout. *J Exp Biol* 208, 2731–2739.
39. Brauge C, Corraze G & Médale F (1995) Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth-performance, body-composition, nitrogen-excretion and plasma-glucose levels in rainbow trout reared at 8-degrees-C or 18-degrees-C. *Reprod Nutr Dev* 35, 277–290.
40. Kaushik SJ, Médale F, Fauconneau B, et al. (1989) Effect of digestible carbohydrates on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture* 79, 63–74.
41. Bergot F (1979) Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 64, 543–547.
42. Palmer TN & Ryman BE (1972) Studies on glucose intolerance in fish. *J Fish Biol* 4, 311–319.
43. Furuichi M & Yone Y (1981) The utilization of carbohydrate by fishes. 3. Change of blood-sugar and plasma-insulin levels of fishes in glucose-tolerance test. *Bull Jap Soc Scient Fish* 47, 761–764.
44. Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 243–249.
45. Enes P, Panserat S, Kaushik S, et al. (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol Biochem* 35, 519–539.
46. Panserat S, Plagnes-Juan E & Kaushik S (2001) Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204, 2351–2360.
47. Hemre GI & Kahrs F (1997) ¹⁴C-injection in Atlantic cod (*Gadus morhua*), metabolic responses and excretion via the gill membrane. *Aquac Nutr* 2, 3–8.
48. Hemre GI & Storebakken T (2000) Tissue and organ distribution of ¹⁴dC-activity in dextrin-adapted Atlantic salmon after oral administration of radiolabelled ¹⁴C₁-glucose. *Aquac Nutr* 6, 229–234.
49. West TG, Schulte PM & Hochachka PW (1994) Implications of hyperglycemia for post-exercise resynthesis of glycogen in trout skeletal muscle. *J Exp Biol* 189, 69–84.
50. Brauge C, Medale F & Corraze G (1994) Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123, 109–120.

51. Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, et al. (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294, 123–131.
52. Davison W & Goldspink G (1977) The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the brown trout (*Salmo trutta*). *J Exp Biol* 70, 1–12.
53. Houlihan DF & Laurent P (1987) Effects of exercise training on the performance, growth, and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci* 44, 1614–1621.
54. Farrell AP, Johansen JA, Steffensen JF, et al. (1990) Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size, and cardiac enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can J Zool* 68, 1174–1179.
55. Panserat S, Me´dale F, Blin C, et al. (2000) Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead sea bream, and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, 1164–1170.
56. Totland GK, Kryvi H, Jødestøl KA, et al. (1987) Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) during long-term sustained swimming. *Aquaculture* 66, 299–313.
57. Yogata H & Oku H (2000) The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. *Fish Sci* 66, 1100–1105.
58. Magnoni L & Weber JM (2007) Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. *J Exp Biol* 210, 4016– 023.
59. West TG, Arthur PG, Suarez RK, et al. (1993) In vivo utilization of glucose by heart and locomotory muscles of exercising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 177, 63–79.
60. Kaushik SJ & Oliva Teles A (1985) Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50, 89–101.

CAPÍTOL II

Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ^{15}N and ^{13}C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)



Publicat a la revista Journal of Comparative Physiology B l'any 2013

Title

Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ¹⁵N and ¹³C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

Authors:

O. Felip*, J. Blasco, A. Ibarz, M. Martin-Perez, J. Fernández-Borràs

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain.

Centre de Referència i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya. *E-mail: olga.felip@ub.edu

***Corresponding address:**

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Avinguda Diagonal, 643, E-08028, Barcelona, Spain

Phone: +34.93.402.15.57

Fax: +34.93.411.03.58

E-mail address: olga.felip@ub.edu

Keywords

Exercise, Carbohydrate-rich diet, Liver, White muscle

Abstract

To determine the effects of sustained swimming on the use and fate of dietary nutrients in gilthead sea bream, a group of fish were forced to undertake moderate and sustained swimming (1.5 BL s^{-1}) for 3 weeks and compared with a control group undertaking voluntary activity. The exercise group showed a significant increase in specific growth rate (C: 1.13 ± 0.05 ; E: $1.32 \pm 0.06 \text{ \% day}^{-1}$, $P < 0.05$) with no significant change in food intake (C: 3.56 ± 0.20 ; E: $3.84 \pm 0.03 \text{ \% of body weight}$). The addition of ^{13}C -starch and ^{15}N -protein to a single meal of 1% ration allowed analysis of the fate of both nutrients in several tissues and in their components, 6 and 24 h after force-feeding. In exercised fish improved redistribution of dietary components increased the use of carbohydrates and lipid as fuels. Gilthead sea bream have a considerable capacity for carbohydrate absorption irrespective of swimming conditions, but in trained fish ^{13}C rose in all liver fractions with no changes in store contents. This implies higher nutrient turnover with exercise. Higher retention of dietary protein (higher ^{15}N uptake into white muscle during the entire post-prandial period) was found under sustained exercise, highlighting the protein-sparing effect. The combined effects of a carbohydrate-rich, lowprotein diet plus sustained swimming enhanced amino acid retention and also prevented excessive lipid deposition in gilthead sea bream.

Introduction

In recent years, scientific advances in our knowledge of the physiology and metabolism of several fish species have improved aquaculture management. The increasing demand for fish meal protein makes that alternative sources of energy should be a requirement for the sustainable development of this industry (Watanabe 2002; Gatlin et al. 2007; Tacon et al. 2010; Kaushik and Seilliez 2010). One approach would be to find fish species naturally adjusted to obtain energy from non-protein sources. Saving dietary amino acids for growth instead of using them for oxidative purposes (known as the protein-sparing effect) implies that the total amount of carbohydrates or lipids has to be increased in fish diets. Several studies have assayed different proportions of dietary non-protein energy sources (lipid and carbohydrate) in different species (rainbow trout, Brauge et al. 1995; brown trout, Arzel et al. 1998; dentex, gilthead sea bream and sea bass, Company et al. 1999; gilthead sea bream, Vergara et al. 1999). The use of dietary lipids instead of protein is well established in fish; even in some cases very high-lipid inclusion in the diet have caused some problems as hepatomegalia and excessive lipid accumulation in the white muscle. However, the effect of carbohydrates saving protein for growth (i.e., the entry of high amounts of carbohydrates in the energy production pathways) remains controversial, particularly in marine fish species (Peres et al. 1999; Enes et al. 2011). Classically, carnivorous fish have been described as diabetics or at least with a limited ability to metabolize glucose (Wilson 1994; Moon 2001; Hemre et al. 2002; Panserat and Kaushik 2002; Stone et al. 2003). High intake of digestible carbohydrate results in prolonged post-prandial hyperglycaemia that persists for many hours in rainbow trout (Bergot 1979; Kaushik and Oliva-Teles 1985; Brauge et al. 1994). However, carbohydrates can promote growth in rainbow trout, because glucose is the preferred oxidative substrate for nervous tissue and blood cells. As carbohydrate digestibility has been increased in modern fish commercial diets through starch extrusion, it has re-opened the discussion about how these carbohydrates affect growth, feed utilization and nutrient deposition. Also carbohydrates in the diet can depress the high rate of amino acids use in gluconeogenic pathways (Cowey et al. 1977; Sanchez-Muros et al. 1996).

Gilthead sea bream is one of the most important cultured fish in the Mediterranean areas, explaining the high numbers of studies about the physiology of this species. Surprisingly, only few studies have focused on the metabolism of carbohydrates and their effects promoting growth (Metón et al. 1999; Couto et al. 2008; Enes et al. 2008). Previous studies from our group suggest that gilthead sea bream can use carbohydrate more efficiently as energy fuel than other teleosts, especially salmonids. Enes et al. (2010) found that dietary carbohydrate complexity did not affect growth performance but that feed utilization was more efficient for complex carbohydrate than for glucose.

The activity of α -glucosidase in gilthead sea bream whole intestine was almost twice as much in European sea bass (Papoutsoglou and Lyndon 2005), indicating that gilthead sea bream have a higher capacity to digest carbohydrates than European sea bass. High-carbohydrate, low-protein diets stimulated 6-phosphofructokinase, pyruvate kinase, glucose-6-

phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in the liver of gilthead sea bream but decreased alanine aminotransferase activity (Metón et al. 1999). High-carbohydrate, low-protein diets increased glucokinase (GK) expression (Caseras et al. 2002) and thus allowed metabolic adaptation favouring glycolysis over gluconeogenesis. Gut transit times and enzyme activities indicate differences that could affect the nutritional value of the carbohydrate sources evaluated (Venou et al. 2003). Although it has been suggested that diets containing around 20% digestible carbohydrates ensure high digestibility, growth and feed utilization in this species (reviewed by Enes et al. 2011), other studies did not find any big adverse effects on fish growth rate with higher inclusion levels (Metón et al. 1999; Venou et al. 2003).

Such studies on fish nutrition have paid more attention to nutrient substitution than their assimilation, deposition and use. Discrepancies in the results are related not only to differences in dietary composition, but also to the feeding strategies (Enes et al. 2011 review) and maintenance conditions used in the different studies. There is a delicate equilibrium in the interchange of molecules in the different pathways of intermediary metabolism, because none of the compounds involved can be modified without affecting the function of the others. So, it is necessary to provide the most efficient supply of nutrients to use as energy providing fuels, as growth-promoting structures and as tissue depots between meals. Obviously, the nutrients required also depend on energy requirements. Exercise is closely related to energy consumption and feeding, and it has been associated with animal welfare and improved growth in most animals including various fish species. Husbandry can reduce physical activity and animal performance, and it is well known that wild fish show superior swimming performance to fish kept in captivity, including the brook trout (Vincent 1960), coho salmon (Brauner et al. 1994), Atlantic salmon McDonald et al. 1998) and gilthead sea bream (Basaran et al. 2007). Pelagic fish can easily be exercised in artificial rearing conditions by forcing them to swim against a current, because this is a reflex. Swimming activity changes the amount and proportion of nutrients used by fish, especially in their muscles, and several reviews have been dedicated to this topic (Davison 1997; Palstra and Planas 2011). From a practical point of view, moderate and sustained activity has also been used to improve growth rate and food conversion efficiencies in fish (Jorgensen and Jobling 1993; Davison 1997). Indeed, swimming speeds of up to 1.5 body lengths per second ($\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$) are acceptable for training fish without adverse effects on growth rates (reviewed by Davison 1997). Although gilthead sea bream is now the main species cultivated in the Mediterranean area, there has only been one study of the costs of swimming at different speeds in this species (Steinhausen et al. 2010). These authors found that gilthead sea bream swimming at $1.5 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ accounted for 30–40% of critical velocity (U_{crit}). Thus, animals were swimming at moderate, but sustained, velocity for a long period.

The aim of the present study was to analyse the effects of sustained swimming on the use and fate of dietary protein and carbohydrates labelled with ^{15}N and ^{13}C to trace the intermediary metabolism of gilthead sea bream, nutrient uptake by the main organs and

deposition into stores. Prior to the current study, we conducted a pilot experiment to validate labelling in rainbow trout and gilthead sea bream (Beltrán et al. 2009) and another one to demonstrate that sustained swimming in rainbow trout improves growth, feed intake and carbohydrate use (Felip et al. 2012). We should note that there are no previous studies of the relationship between nutrition and swimming in gilthead sea bream. Our results show that, as exercise improves fish growth and the use of carbohydrates, feed efficiency should increase because feed intake does not change significantly.

Materials and methods

Experimental design and sampling procedures

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) were purchased from a local commercial supplier (Cripesa, Tarragona, Spain) and were held in indoor facilities at the Faculty of Biology (University of Barcelona, Barcelona, Spain) in 400-l seawater tanks equipped with a semi-closed recirculation system with physical and biological filters, ozone skimmers and continuous aeration at 22°C and photoperiod 12L/12D, with a 35% weekly seawater renewal rate. Temperature, flow, oxygen concentration and water characteristics such as pH, nitrite and nitrate parameters were recorded daily. Fish were acclimated to an experimental carbohydrate-rich diet (see Experimental diet composition in Table 1), and the amount supplied was adapted to the daily level of ingestion. After this acclimatization period, all fish were lightly anaesthetized and fitted with a passive integrated transponder (PIT) tag (Trovan Electronic Identification Systems, Madrid, Spain) near the dorsal fin to allow subsequent identification and individual monitoring. Fish were weighed and randomly distributed in four trial tanks (initial weight 50–60 g). In two of the experimental tanks (sustained swimming group, E) the water supply was modified to produce a circular, uniformly distributed flow of 700 litres/h, induced by the perpendicular entrance of water at the surface and a submerged water pump at the bottom of the tank, isolated from the free-living area. The shape of the tank prevented the fish from entering a central area of lower velocity, thus guaranteeing similar swimming velocities throughout the experiment. Both water volume and fish density were the same as in the control group. This design and water flow resulted in a sustained swimming velocity of 1.5 BL.s⁻¹, measured and adjusted at three different tank depths (surface, mid-tank and near the bottom) using a low-speed mechanical flow meter (General Oceanics, Inc., Miami, FL, USA). In the other two tanks fish were held in standard rearing conditions, with a water flow of 350 l/h and vertical water inflow. Fish in these conditions (control group, C) showed only spontaneous movements (voluntary swimming). During the experimental period of 3 weeks both groups were fed twice a day (9:30 a.m. and 5:30 p.m.) until apparent satiety with an experimental diet rich in digestible carbohydrates. Food intake was recorded on a daily basis for each tank and the specific growth rate ($SGR = 100 \times (\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / \text{day}$) was calculated for each individual of each tank at the end of the experimental period.

Table 1 Ingredients and chemical composition of the experimental diet

<i>Ingredients and additives (g/kg)</i>	
Fish meal	450
Gelatinized wheat starch	470
Fish oil	70
Vitamins	10
<i>Proximate composition (% DM)</i>	
Crude protein	37.15
Crude fat	12.51
Crude carbohydrates	40.04
Crude fibre	1.77
Total ashes	8.52
Gross energy	19.3 MJ/kg

After 3 weeks, 20 fish were randomly sampled from each group (E and C), lightly anaesthetized and force-fed a bolus, equivalent to a ration of 1 % of diet labelled with stable isotopes (3% ¹³C algal starch and 1% ¹⁵N Spirulina protein; Martek Biosciences Corporation, Columbia, MD, USA) using a gastric cannula. Two other fish from each group received the same dietary ration containing similar proportions of non-labelled Spirulina protein and algal starch. These four fish were used to determine the natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in the samples (blank values). After force-feeding, fish were held for a few minutes in separate tanks to check the acceptance of the forced meal. Any individual showing a degree of regurgitation was disqualified and another fish was used in its place. The food ingested by each animal was recorded to calculate the percentage of label ingested. Fish were then returned to their respective tanks and maintained for 6 or 24 h postfeeding (the exercise group were swimming until the point of sampling). These two periods were chosen as they represent the times of maximum post-absorption (6 h) and nutrient use completion (24 h). Six hours after forcefeeding, ten fish from each group plus two more fish from each group as blanks were anaesthetized and killed by sectioning the spinal cord. The final body weight, body length and body indices (hepatosomatic, muscle-somatic and perivisceral fat content) were recorded and blood samples were extracted from the caudal vessels using EDTA-Li as an anticoagulant. Plasma was obtained by centrifuging the blood at 13,000xg for 5 min at 4°C and then kept at -80°C until analysis. Samples of liver, white muscle, viscera (gut plus perivisceral fat) and the rest of the fish were rapidly excised, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until analysis. The entire sampling procedure took less than 3 min from the death of the fish, and tissues with high glycogen hydrolytic capacity, such as muscle, were frozen first. The same procedure was repeated at 24 h postfeeding with the other ten fish from each group plus two more fish as blanks.

Analytical procedures

A commercial kit (Commercial Kit Glucofix, Menarini, Italy) based on the enzymatic method of glucose-oxidase described by Werner et al. (1970) was used to determine the plasma glucose concentration. Tissue samples (liver, muscle and viscera) were homogenized in liquid N₂ using a pestle and mortar to obtain a fine powder, and the rest of the fish was homogenized at -20°C with a food homogenizer (Pacojet AG, Zug Switzerland). Samples were shared out for the analysis of percentage lipids, proteins, glycogen and water content, and one part of the sample was used for isotopic analysis. Tissue water content was determined gravimetrically after drying the samples at 100°C for more than 24 h. Lipids were extracted according to the method described by Folch et al. (1957). The washed lipid extracts were dried under a N₂ atmosphere and the lipid content was determined gravimetrically. Protein purification was carried out using defatted samples via precipitation with 10% (v/v) trifluoroacetic acid. The proteins were dried using a vacuum system (Speed Vac Plus, AR, Savant Speed Vac Systems, South San Francisco, CA, USA), and protein content was calculated according to the nitrogen obtained by elemental analysis (Elemental Analyser Flash 1112, ThermoFinnigan, Bremen, Germany) assuming the following conversion factor: 1 g of nitrogen corresponds to 6.25 g of protein. Glycogen extraction and purification were carried out via alcoholic precipitation after tissue hydrolysis using 30% KOH (Good et al. 1933). Glycogen content was analysed using the anthrone colorimetric method described by Fraga (1956).

 $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ determination in tissue

The ¹³C enrichment in the whole tissue and in the main components (glycogen, lipids and proteins) of each sampled tissue and the ¹⁵N enrichment in the whole tissue and in the protein fraction of each tissue were analysed using an elemental analysis isotope ratio mass spectrometer (IRMS). Dried samples of diets and whole tissues, as well as the purified lipid, glycogen and protein from each tissue, were lyophilized and ground in a mortar to a homogeneous powder for isotopic analysis. Aliquots ranging from 0.3 to 0.6 mg were accurately weighed in small tin capsules (3.3 x 5 mm, Cromlab, Barcelona, Spain). Samples were analysed for C and N isotope composition using a Mat Delta C isotope-ratio mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) coupled to an Elemental Analyser (Flash 1112) (at Barcelona University SCT). The EAIRMS burned the samples and converted them into gas (N₂ and CO₂). That gas was transported in a continuous helium (He) flux to determine the percentage carbon and nitrogen in the sample. The isotope ratios (¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N) in the samples were compared with reference gases (N₂ and CO₂) and were expressed on a relative scale as deviation, referred to as delta (δ) units using the notation ‰, parts per thousand, relative to the isotope ratio content of international standards: PDB (Pee Dee Belemnite, a calcium carbonate) for C and air for N.

Delta values were determined as follows:

$$\delta = [(R_{sa} / R_{st}) - 1] \times 1000,$$

where $R_{sa} = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ or ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ of samples and $R_{st} = {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ or ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ of international standards. The same reference material analysed during the analysis period was measured with about 0.2‰ precision for natural materials and about 0.4‰ precision for enriched materials. The δ values were expressed as atom percentage (at %) as follows:

$${}^{13}\text{C at \%} = 100 \times ({}^{13}\text{C} / ({}^{13}\text{C} + {}^{12}\text{C})),$$

$${}^{15}\text{N at \%} = 100 \times ({}^{15}\text{N} / ({}^{15}\text{N} + {}^{14}\text{N})).$$

The net enrichment (APE (*atom percentage excess*)) of ${}^{13}\text{C}$ and ${}^{15}\text{N}$ in glycogen, lipid, protein and whole tissue was calculated by the difference between the atom % of samples and their corresponding blank atom % values:

$$\text{APE} = \text{at\% sample} - \text{at\% blank}.$$

Finally, using the APE values, molecular weight and Avogadro's number, the results were expressed as the percentage of marker in relation to the ingested dose (g/100 g ${}^{13}\text{C}$ or ${}^{15}\text{N}$ ingested) in each tissue fraction (glycogen, lipid and protein), which was calculated as follows:

$$100 \times ((\text{g } {}^{13}\text{C or } {}^{15}\text{N} / \text{g t. fr.}) \times (\text{g t. fr.} / \text{g tissue}) \times (\text{g tissue} / \text{g b.w.}) / (\text{g ingested } {}^{13}\text{C or } {}^{15}\text{N} / \text{g b.w.})) \quad (1)$$

where t. fr. is the tissue fraction and b.w. is the body weight. The free pool of each tissue was calculated as the difference between isotope levels in the entire organ or tissue and the sum of the three tissue fractions. So, the value in an entire organ, or tissue, is the sum of all fractions (Eq. (1) + free pool) for ${}^{13}\text{C}$ or ${}^{15}\text{N}$. In whole fish, this was calculated as the sum of all tissues (liver, WM, viscera and the rest of the fish) for ${}^{13}\text{C}$ or ${}^{15}\text{N}$.

For liver and viscera, the exact mass of the total tissue sample was calculated by weighing the entire individual organs from the experimental fish. However, to estimate the total mass of the WM, we accurately dissected another ten fish under the conditions indicated earlier. The musclematic index (g muscle/100 g body weight) obtained was $38.04\% \pm 0.79$ for the WM of exercised fish and $38.68\% \pm 0.68$ for the WM of control fish ($P < 0.05$).

Statistics

Data for all parameters are presented as mean \pm standard error of mean. Differences of body weight, food intake and SGRs were obtained from Two-way ANOVAs, with tank and conditions (control vs exercise) as the two factors. For the rest of analysis, unpaired T-tests were used to compare the two experimental groups and the two post-prandial times, 6 and 24 h, within the same condition. Differences were considered statistically significant for $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Results

Sustained, moderated swimming for 3 weeks led to an increase in final body weight in gilthead sea bream, although this increase was not significant due to individual variability (Control group (C): 70.15 ± 1.76 ; Exercise group (E): 74.15 ± 1.70 g). Nevertheless, the increase in the specific growth rate in exercised fish was significant (SGR, C: 1.13 ± 0.05 ; E: $1.32 \pm 0.06\%$ day⁻¹, $P < 0.05$) despite there being no significant change in food intake (C: $3.56 \pm 0.20\%$; E: $3.84 \pm 0.03\%$ b. w.). The tissue composition of liver and white muscle is presented in Table 2, showing very similar values in both groups, with the exception of a transitory increase in lipid content at 6 h post-feeding in the white muscle of exercised fish.

Table 2 Effect of the activity to the proximal composition of liver and white muscle in gilthead sea bream

	6 h		24 h	
	Control	Exercise	Control	Exercise
<i>Liver</i>				
HSI	1.99 ± 0.11	1.94 ± 0.14	1.80 ± 0.15	2.04 ± 0.06
Liver water (% w.w.)	62.9 ± 1.02	64.0 ± 0.68	61.2 ± 0.57	$60.67 \pm 0.54^+$
Liver glycogen (% w.w.)	11.9 ± 0.59	12.9 ± 0.80	10.6 ± 1.21	11.1 ± 0.67
Liver lipid (% w.w.)	13.2 ± 0.66	11.3 ± 0.59	11.7 ± 0.88	11.0 ± 0.71
Liver protein (% w.w.)	7.9 ± 0.39	7.8 ± 0.08	7.7 ± 0.34	7.7 ± 0.33
<i>White muscle</i>				
MSI	38.68 ± 0.68	38.04 ± 0.79	38.68 ± 0.68	38.04 ± 0.79
WM water (% w.w.)	76.0 ± 0.29	$77.0 \pm 0.22^*$	76.4 ± 0.29	$76.1 \pm 0.24^+$
WM glycogen (% w.w.)	0.15 ± 0.02	$0.07 \pm 0.01^*$	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.04
WM lipid (% w.w.)	3.7 ± 0.50	$9.5 \pm 1.24^*$	$6.9 \pm 0.96^+$	$4.7 \pm 0.42^+$
WM protein (% w.w.)	18.2 ± 0.41	18.4 ± 0.17	18.7 ± 0.18	$19 \pm 0.19^+$

Values are mean \pm SEM. $n = 10$

* Significant differences ($P < 0.05$) between the two experimental groups and + between 6 and 24 h

Six hours after force feeding a carbohydrate-rich diet, a significant, but transitory increase in plasma glucose levels were seen in the C and E groups. These levels were twofold higher than those recorded 24 h post-feeding, and the changes in plasma glucose profiles were also similar in each group (Fig. 1). Thus, irrespective of the exercise regime, gilthead sea bream showed a notable capacity for carbohydrate absorption and distribution.

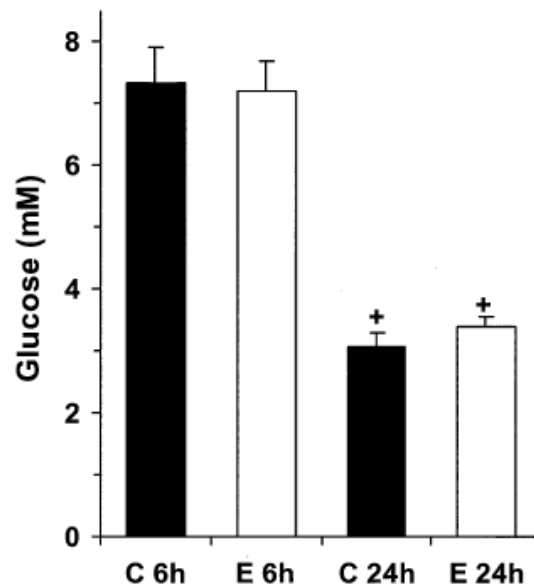


Fig. 1 Plasma glucose concentration (mM) in gilthead sea bream subjected to sustained swimming (E) or to voluntary swimming (C), at 6 and 24 h after force-feeding. Mean values with their standard errors, n 10. * Significant differences between the two experimental groups ($P < 0.05$); + significant differences between 6 and 24 h ($P < 0.05$)

The labelling of the forced meal with 3 % starch- ^{13}C and 1 % protein- ^{15}N allowed us to measure the levels of post-prandial nutrient distribution at 6 and 24 h, reflecting the peak in assimilation and the daily total use, respectively. Total ^{13}C recovery in whole fish decreased markedly from 6 to 24 h (percentage of ^{13}C ingested: 24 and 26% at 6 h, 13 and 15% at 24 h) with no significant differences between groups (see Fig. 5a below for a more detailed explanation of these results). At 6 h post-feeding, transitory increases in ^{13}C deposition were observed in the liver (up to 5%) and viscera (4.5%). In the liver, ^{13}C was found mainly in the tissue fractions of glycogen and freepool (i.e., ^{13}C soluble intermediary metabolites) (Fig. 2a), whereas in the viscera ^{13}C was found in the protein and free-pool fractions (Fig. 3a) with no significant differences between E and C groups. At 24 h post-feeding, ^{13}C recovery from the liver and viscera markedly decreased, revealing the transient role of the gut and liver and the plasticity of liver stores. However, although the liver lipid contents of the two groups were similar, the amount of ^{13}C taken up from dietary starch into the hepatic lipid fraction by the exercised group 24 h post-feeding was twofold higher than that of the control group, indicating a significant increase in lipogenesis under exercise. Likewise, ^{15}N recovery from the whole liver showed the same pattern as that of ^{13}C (Fig. 2b). Dietary ^{15}N -protein was rapidly incorporated into the whole liver at 6 h, but its fate at 24 h was dependent on swimming condition (3.5 ± 0.1 C and 4.2 ± 0.3 E g/100 g ingested ^{15}N $P < 0.05$). Recovery of ^{15}N from whole viscera tissue (Fig. 3b) followed the same pattern as that in the liver, showing significantly higher ^{15}N deposition in the protein fraction in the exercised group at the end of the postprandial period.

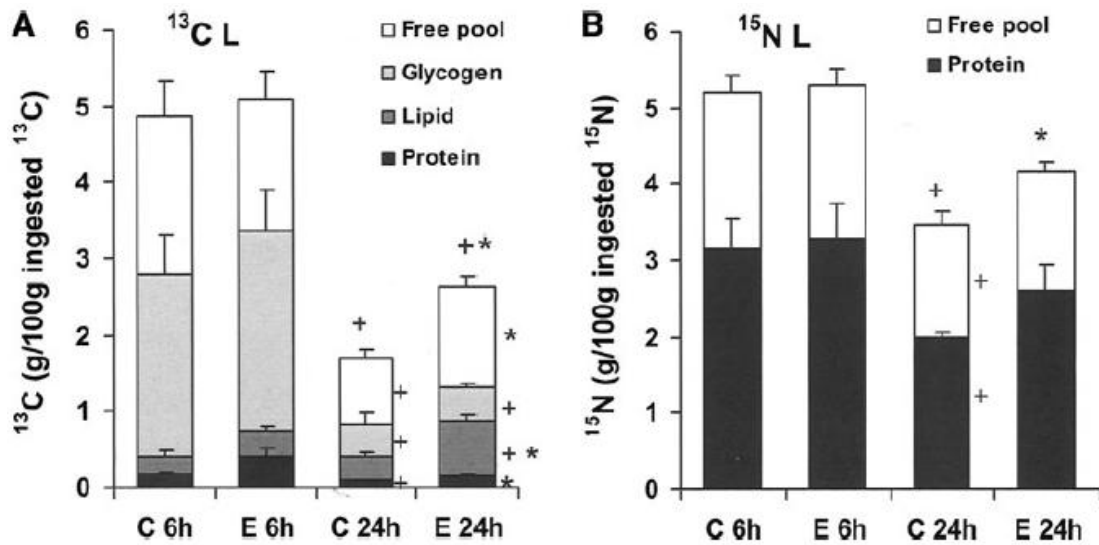


Fig. 2 Recovery of ^{13}C (a) and ^{15}N (b) (as percentage of ingested isotope) from liver fractions (protein, lipid, glycogen and free pool) of gilthead sea bream subjected to sustained swimming (E) or to voluntary swimming (C), 6 and 24 h after force-feeding. Mean values with their standard errors, n 10. * Significant differences between the two experimental groups ($P < 0.05$); + significant differences between 6 and 24 hours ($P < 0.05$)

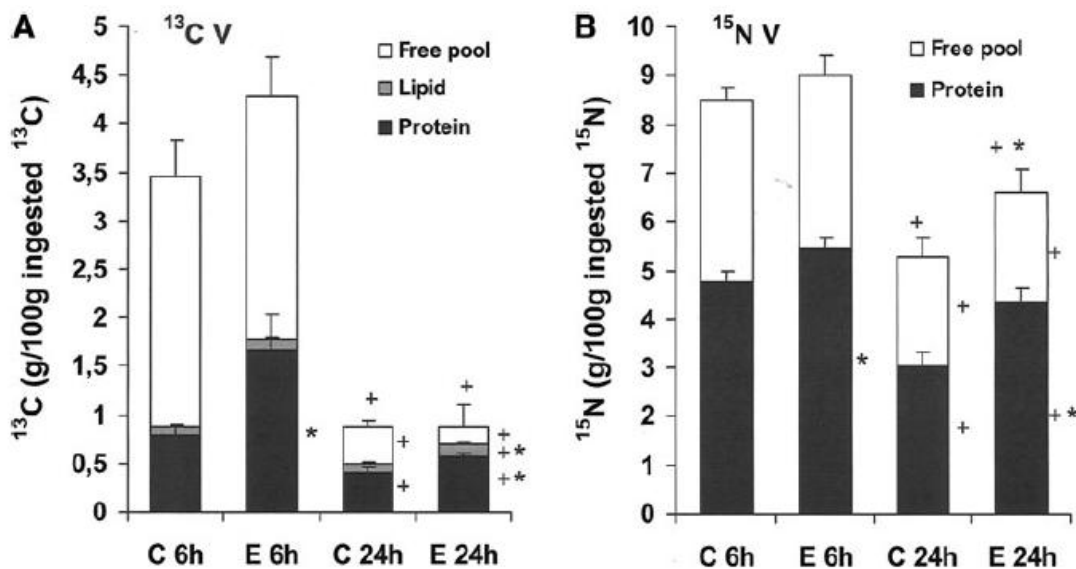


Fig. 3 Recovery of ^{13}C (a) and ^{15}N (b) (as percentage of ingested isotope) from viscera fractions (protein, lipid and free pool) of gilthead sea bream subjected to sustained swimming (E) or to voluntary swimming (C), 6 and 24 h after force-feeding. Mean values with their standard errors, n 10. * Significant differences between the two experimental groups ($P < 0.05$); + significant differences between 6 and 24 hours ($P < 0.05$)

The recovery of ¹³C and ¹⁵N from components of the white muscle of gilthead sea bream is shown in Fig. 4a, b, respectively. At 6 h, labelled carbon was mainly found in the free-pool fraction, with the exercised group showing significantly higher incorporation of carbon from dietary starch into the muscle protein fraction. After 24 h, ¹³C levels in the total white muscle mass of exercised fish were 15-20% higher than in the control group. ¹⁵N recovery in white muscle of exercised fish was also higher, mainly in the protein fraction, indicating greater protein incorporation into the muscle and dietary protein retention in this group compared with the control.

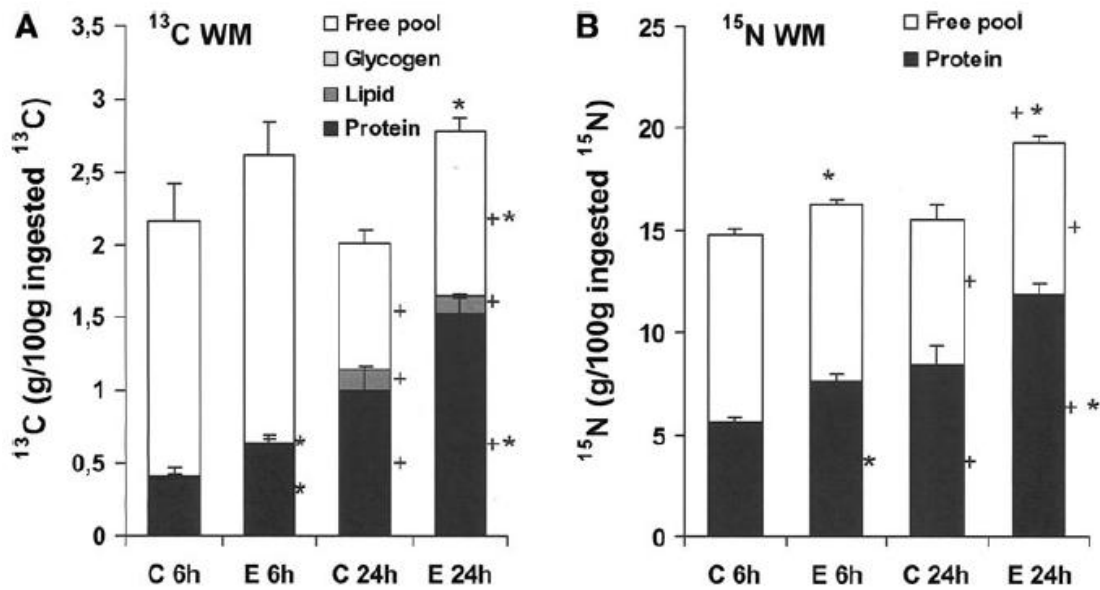


Fig. 4 Recovery of ¹³C (a) and ¹⁵N (b) (as percentage of ingested isotope) from white muscle fractions (protein, lipid, glycogen and free pool) of gilthead sea bream subjected to sustained swimming (E) or to voluntary swimming (C), 6 and 24 h after force-feeding. Mean values with their standard errors, *n* 10. * Significant differences between the two experimental groups ($P < 0.05$); + significant differences between 6 and 24 hours ($P < 0.05$)

To summarize the results, Fig. 5a, b show the total ¹³C and ¹⁵N recovery (sum of all organ or tissue recoveries) from a single meal in whole fish. Sustained swimming in the conditions studied led to higher retention of both ¹³C (via nutrient transformation and isotope retention in protein and lipid fractions) and ¹⁵N (by retention), especially in the protein fractions. It should also be noted that all observed differences between exercised and control gilthead sea bream were achieved after only 3 weeks of sustained swimming at 1.5 BL.s⁻¹.

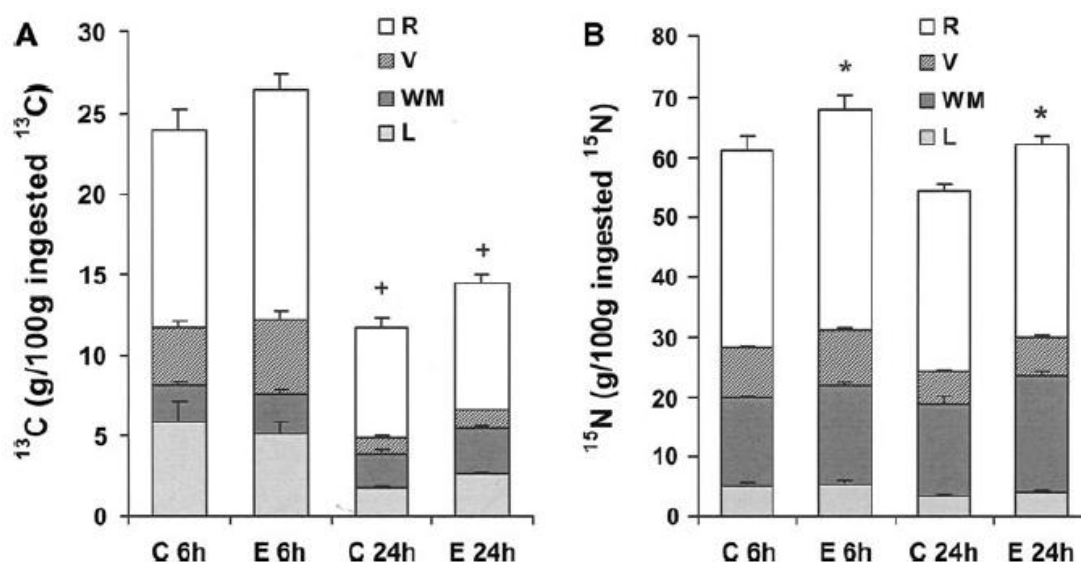


Fig. 5 Recovery of ^{13}C (a) and ^{15}N (b) (as percentage of ingested isotope) from entire organs or tissues (L, liver; WM, white muscle; V, viscera; R, the rest of the fish) of gilthead sea bream subjected to sustained swimming (E) or to voluntary swimming (C), 6 and 24 h after force-feeding. The sum of the stacked bar represents the total recovery from the whole fish (see “Materials and Methods” for details of calculations). Mean values with their standard errors, n 10. * Significant differences between E and C group ($P < 0.05$); + significant differences between 6 h and 24 h ($P < 0.05$)

Discussion

Gilthead sea bream has become, at least among marine teleosts, a clue species for aquaculture because it has been the subject of many studies of fish physiology during the last three decades. Nevertheless, the effects of spontaneous and forced activity on its physiology, especially energy demands and use, have received little attention. The present work is the first demonstration of the improvement in the assimilation and distribution of dietary nutrients in gilthead sea bream in response to sustained swimming activity of $1.5 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$. After 3 weeks of this regime, the exercised group grew better than the control group (under voluntary activity) without increasing feed intake. The significantly higher growth rate of the exercised gilthead sea bream indicates an improved use of energy sources other than dietary protein, whose ingestion was similar in the two groups. Higher growth rates have also been reported in other fish species subjected to exercise, such as the brown trout (Davison and Goldspink 1977), rainbow trout (Houlihan and Laurent 1987; Farrell et al. 1990), Atlantic salmon (Totland et al. 1987) and Arctic charr (Adams et al. 1995). Our group (Felip et al. 2012) observed in rainbow trout under exercise a tendency to better growth but increasing food ingestion. Nevertheless, Christiansen and Jobling (1990) reported on Arctic charr that the improved weight gain in the exercising fish does not appear to be due primarily to increased food consumption, but is rather the result of better fish feed efficiency. In the present study, the proportion of protein in the experimental diet was low (37.2% DM), especially in comparison with the levels proposed by the majority of nutritionists (around 45% DM) for this species, size of fish, and rearing temperature. It should,

however, be noted that the animals in our study were fed to apparent satiety, so total food intake was not limited by the experimental procedure.

Compared with mammals, food intake control is relatively unknown in fish. Fish eat not only to satisfy their energy requirements, suggesting a possible role of energy or nutrient utilization, and thus of nutrient source, in food intake regulation in fish (Saravanan et al. 2012). We hypothesize that the correct combination of dietary composition and exercise may improve growth, and we have done it because gilthead sea bream grew more after 3 weeks of sustained swimming without increasing food intake. Nahhas et al. (1982) and Bagatto et al. (2001) reported that long-term exercise improved swimming efficiency in rainbow trout and zebrafish by reducing the metabolic costs of aerobic swimming. Likewise, Steinhausen et al. (2010) found that the oxygen consumption of gilthead sea bream under sustained swimming at 0.5-1.5 BL.s⁻¹ was not higher than that of fish swimming voluntarily with spontaneous activity. These authors demonstrate that the costs of spontaneous activity may be high and even comparable to those of a fixed, moderate swimming speed. In this sense, sustained swimming at optimal speeds also reduces aggressive interactions in Arctic charr, and such interactions are associated with anaerobic peaks of energy consumption (Adams et al. 1995). Lowered plasma cortisol levels have been reported for Atlantic salmon that was subjected to moderate exercise of between 0.5 and 1.5 BL.s⁻¹ (Boesgaard et al. 1993; Herbert et al. 2011), which improve animal welfare. Thus, some fish species can swim and grow at the same time suggesting either that multiple metabolic costs are easily balanced or that some form of behavioural or physiological efficiency, including changes in digestive and assimilation capacities, arise in response to long-term exercise as it has been proposed by Christiansen et al. (1991) and Adams et al. (1995) in Arctic charr, and by Brown et al. (2011) in New Zealand yellowtail kingfish.

The use of carbohydrate as nutrient varies according to species, size of fish, levels of dietary carbohydrates, and the kind of feed ingredient and digestibility (reviewed by Hemre et al. 2002). The inclusion of carbohydrates in the diet at appropriate levels can improve growth performance, even in carnivorous fish species (Degani et al. 1986; Hemre et al. 1989, 1995; Hung et al. 1989; Stephan et al. 1996; Hemre and Hansen 1998). However, the controversy is open because other studies have found no improvement in growth rate, despite its not being detrimental to growth at certain amounts or with certain kinds of carbohydrate (Peres and Oliveira-Teles 2002; Enes et al. 2006, 2008). The transitory increase observed in this study in plasma glucose levels at 6 h and the similar decline at 24 h post-feeding in both groups revealed that gilthead sea bream have the capacity to incorporate and use a high proportion of carbohydrates from the diet. For many years it has been considered that the use of dietary carbohydrates for energy purposes in carnivorous fish species is limited or at least low (see reviews by Wilson 1994 and Hemre et al. 2002), so anything that would promote the use of dietary carbohydrates as energy fuel, i.e., sustained swimming, should have beneficial effects. Thus, the long-lasting post-prandial hyperglycaemia produced by the ingestion of a carbohydrate-rich diet in rainbow trout (Bergot 1979; Wilson 1994; Hemre et al. 2002; Stone 2003) becomes transitory hyperglycaemia when the animals are forced to exercise (Felip et al. 2012). In the present

study, gilthead sea bream fed with a carbohydrate-rich diet showed only short-transient hyperglycaemias. This was also seen in the group under voluntary activity. Thus, we expect that the beneficial effects of sustained exercise on the use of this diet may be greater in gilthead sea bream than in trout. The observed improvement of fish growth due to moderate, sustained swimming can be explained by tracing the use of two main nutrients (carbohydrate and protein) with ^{13}C and ^{15}N , respectively. Regardless of activity and in parallel with the transient hyperglycaemia, the highest amount of ^{13}C recovered from gilthead sea bream liver at 6 h was in the glycogen fraction, showing that in both groups ingested carbohydrates were initially converted into glycogen, and also found in the free-pool fraction (intermediary metabolites). Both the transient hyperglycaemia and the increase in labelled compounds of intermediary metabolism in the liver should respond to the high GK hepatic activity induced by dietary carbohydrates, as reported by Panserat et al. (2000), Caseras et al. (2002) and Metón et al. (2004) in gilthead sea bream. Nevertheless, in fish subjected to sustained exercise, higher levels of ^{13}C were recovered in all tissue fractions of the liver at 24 h postfeeding without modifying the proximal composition of that tissue (i.e., the amounts of protein, lipid and glycogen in percentages of liver fresh weight). These results demonstrate that exercise induced more metabolic transformations in the liver of gilthead sea bream. Moreover, higher incorporation and deposition of ^{13}C into the white muscle of the exercise group throughout all the postprandial period, with significant differences at 24 h post-feeding, reveals that exercise increases the transformation of carbohydrates and their use in extrahepatic tissues. Our results demonstrated that gilthead sea bream had the capacity to incorporate and distribute high amounts of carbohydrates (as seen in the control group) and that their use improved in exercise (sustained swimming group).

Carnivorous fish such as rainbow trout, Atlantic salmon, European sea bass and gilthead sea bream do not modify liver gene expression and/or the activity of enzymes involved in the gluconeogenic pathways (PEPCK, Fbase and G6Pase) in response to high dietary carbohydrate levels (reviewed by Enes et al. 2009); instead, they seem to regulate the glycolysis/gluconeogenesis ratio through the proportion of carbohydrate and protein in their diets. Thus, high carbohydrate intake increases the rate of glycolysis (gilthead sea bream, Metón et al. 2000), whereas low protein intake depresses the rate of gluconeogenesis (rainbow trout, Kirchner et al. 2003). Some differences in the responses among species could explain the more rapid restoration of plasma glucose levels in gilthead sea bream.

When the percentage of digestible carbohydrates consumed is high, the rate of glucose uptake by tissues increases (Felip et al. 2012) favouring the synthesis of lipid in the liver (Panserat et al. 2009). As previously observed in rainbow trout (Felip et al. 2012), in the present study higher ^{13}C recovery in the hepatic lipid fraction under exercise reflected enhanced lipogenesis from dietary carbohydrates. However, the fact that hepatic lipogenesis increased in the exercised group without changing the total liver fat content, already signalled, indicates higher mobilization of lipids in gilthead sea bream to extrahepatic tissues. In fish species such as rainbow trout, brown trout, Atlantic salmon and fingerling yellowtail, exercise increases the

muscle lipid content. These lipids may be derived from an excess of dietary carbohydrates, as in the rainbow trout (Felip et al. 2012), or an excess of dietary lipids, as found in the gilthead sea bream (Santinha et al. 1999). In the present swimming conditions, gilthead sea bream did not accumulate lipids in white muscle. Thus, although the exercise regime (sustained swimming at $1.5 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$) promoted the incorporation of circulating lipids into the white muscle of gilthead sea bream, as demonstrated by the transitory increase in lipid content at 6 h post-feeding in the white muscle of exercised fish, it also promoted their use, as reflected by the reduction in lipid content 24 h postfeeding. The plasticity of white muscle lipid stores in exercised gilthead sea bream during the day indicates higher rates of lipid transformation and oxidation in the white muscle of this species, because rainbow trout under similar sustained swimming conditions deposit lipids in white muscle (Felip et al. 2012). Endurance swimming increases muscle lipid levels in the white muscle of brown trout (Davison and Goldspink 1977), in the red muscle of Atlantic salmon (Totland et al. 1987) and in the whole body fat of yellowtail (Yogata and Oku 2000). The fact that gilthead sea bream did not increase lipid deposition in white muscle under sustained exercise is consistent with results reported for the red muscle of rainbow trout subjected to moderate exercise (Magnoni and Weber 2007; Felip et al. 2012). The observation that lipid levels in the white muscle of rainbow trout tend to decrease after exhaustive exercise (Milligan and Girard 1993) supports that the use of lipid reserves is determined by the balance between energy input from the diet and energy outputs. In the present trial conditions, the lower levels of lipid in the white muscle of exercised gilthead sea bream, compared with the levels in the control group, are similar to the levels reported for the flesh of wild gilthead sea bream (Morrison et al. 2007; Lenas et al. 2011). Thus, the introduction of forced exercise could promote animal welfare and determine body compositions similar to those found in wild fish, avoiding hepatomegalia or excessive fat deposition in muscle.

Under sustained exercise, gilthead sea bream increased both ^{13}C and ^{15}N incorporations into the protein fractions of all analysed tissues (liver, white muscle and viscera). It demonstrates, first, a high ^{13}C isotopic routing from dietary starch to non-essential amino acids and then to proteins and, second, the increased efficiency of protein retention in the swimming group fed a low-protein diet. The lower recoveries of ^{13}C and ^{15}N in the voluntary activity group in the present study indicated lower energy efficiency in the use of dietary carbohydrates, due to the already mentioned high costs of spontaneous activity. In another study on gilthead sea bream, under similar exercise and dietary conditions, we observed an increase of the aerobic work in white muscle and a reduction in red muscle (Martín-Pérez et al. 2012), being the enzymatic machinery of white muscle modified (increased activity of cytochrome-c oxidase and decreased of citrate synthase) in a form that indicates a marked reduction in the entry of all amino acids into the Krebs cycle and their preservation for protein synthesis. It is of interest to note that following just one forced-feeding with 1% ration, ^{15}N deposition in the whole fish of exercised group increased approximately 34% more than that in the control group. Higher recoveries of total ^{15}N from the protein fraction of both red and white muscles was previously observed in exercised rainbow trout (Felip et al. 2012), but in gilthead

sea bream the higher growth rate occurred without increasing feed intake significantly, thus leading to a conclusion that a proteinsparing effect occurred in the conditions of the study (low protein, high carbohydrate and exercise). That sparing effect associated with enhanced growth may be derived from shifts in fuel use (Ozório 2008; Kaushik and Seiliez 2010) combined with the increased use of dietary carbohydrates under exercise conditions (present study).

In conclusion, the total recovery of dietary ¹³C-starch and ¹⁵N-protein demonstrated that gilthead sea bream, regardless of exercise regime, has a good capacity to incorporate dietary carbohydrates and to use them in energy production and lipogenesis. Swimming at 1.5 BL.s⁻¹ did not increase the catabolic use of dietary protein in gilthead sea bream, but instead increased the efficiency of protein retention and the use of other energy reserves (carbohydrates and lipids), caused a proteinsparing effect and avoided excessive lipid deposition in white muscle.

Acknowledgments

We thank Pilar Teixidor and Pilar Rubio from the “Centre Científic i Tecnològic” (CCIT-UB) for their valuable help during isotopic analyses. This study was supported by a grant from the Spanish government (AGL2009-12427). O. Felip and M. Martín-Pérez received fellowships from FPI-2007 and FI-2007 of the Spanish government and the Catalan government, respectively. The English version was corrected by the Language Advisory Service of the University of Barcelona.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adams CE, Huntingford FA, Krpal J, Jobling M, Burnett SJ (1995) Exercise, agonistic behavior and food acquisition in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Environ Biol Fishes* 43:213–218
- Arzel J, Metailler R, Le Gall P, Guillaume J (1998) Relationship between ration size and dietary protein level varying at the expense of carbohydrate and lipid in triploid brown trout fry, *Salmo trutta*. *Aquaculture* 162:259–268
- Bagatto B, Pelster B, Burggren WW (2001) Growth and metabolism of larval zebrafish: effects of swim training. *J Exp Biol* 204:4335–4343
- Basaran F, Ozbilgin H, Ozbilgin YD (2007) Comparison of the swimming performance of farmed and wild gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquacult Res* 38:452–456
- Beltrán M, Fernández-Borrás J, Médale F, Pérez-Sánchez J, Kaushik S, Blasco J (2009) Natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquacult Nutr* 15:9–18
- Bergot F (1979) Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp Biochem Physiol A* 64:543–547

- Boesgaard L, Nielsen ME, Rosenkilde P (1993) Moderate exercise decreases plasma cortisol levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol A* 106:641–643
- Brauge C, Medale F, Corraze G (1994) Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123:109–120
- Brauge C, Corraze G, Médale F (1995) Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth-performance, body-composition, nitrogen-excretion and plasma-glucose levels in rainbow trout reared at 8-Degrees-C or 18-Degrees-C. *Reprod Nutr Dev* 35:277–290
- Brauner CJ, Iwama GK, Randall DJ (1994) The effect of shortduration seawater exposure on the swimming performance of wild and hatchery-reared juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Can J Fish Aquatic Sci* 51:2188–2194
- Brown EJ, Bruce M, Pether S, Herbert NA (2011) Do swimming fish always grow fast? Investigating the magnitude and physiological basis of exercise-induced growth in juvenile New Zealand yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*. *Fish Physiol Biochem* 37:327–336
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F, Baanante IV (2002) Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 88:607–614
- Christiansen JS, Jobling M (1990) The behaviour and the relationship between food intake and growth of juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Can J Zool* 68:2185–2191
- Christiansen JS, Jørgensen EH, Jobling M (1991) Oxygen consumption in relation to sustained exercise and social stress in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *J Exp Zool* 260:149–156
- Company R, Calduch-Giner JA, Perez-Sanchez J, Kaushik SJ (1999) Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Living Resour* 12:23–30
- Couto A, Enes P, Peres H, Oliva-Teles A (2008) Effect of water temperature and dietary carbohydrate level on growth performance and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A* 151:45–50
- Cowey CB, de la Higuera M, Adron JW (1977) The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr* 38:385–395
- Davison W (1997) The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp Biochem Physiol A* 117:67–75
- Davison W, Goldspink G (1977) The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the brown trout (*Salmo trutta*). *J Exp Biol* 70:1–12
- Degani G, Viola S, Levanon D (1986) Effects of dietary carbohydrate source on growth and body composition of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquaculture* 52:97–104
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2006) Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A* 143:89–96

- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2008) Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 274:101–108
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol Biochem* 35:519–539
- Enes P, Peres H, Couto A, Oliva-Teles A (2010) Growth performance and metabolic utilization of diets including starch, dextrin, maltose or glucose as carbohydrate source by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Physiol Biochem* 36:903–910
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Olive-Teles A (2011) Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Rev Fish Sci* 19:201–215
- Farrell AP, Johansen JA, Steffensen JF, Moyes CD, West TG, Suarez RK (1990) Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size, and cardiac enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can J Zool* 68:1174–1179
- Felip O, Ibarz A, Fernández-Borràs J, Beltrán M, Martín-Pérez M, Planas JV, Blasco J (2012) Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (¹³C starch and [¹⁵N] protein): effects of gelatinisation of starches and sustained swimming. *Br J Nutr* 107:834–844
- Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Fraga F (1956) Determination of glycogen in shellfish with the anthrone reagent (Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona). *Invest Pesq (Spain)* 3–69
- Gatlin DM III, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* 38:551–579
- Good BCA, Cramer H, Somogy M (1933) The determination of glycogen. *J Biol Chem* 100–491
- Hemre GI, Hansen T (1998) Utilisation of different dietary starch sources and tolerance to glucose loading in Atlantic salmon (*Salmo salar*), during parr-smolt transformation. *Aquaculture* 161:145–157
- Hemre GI, Lie Ø, Lied E, Lambertsen G (1989) Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. *Aquaculture* 80:261–270
- Hemre GI, Sandnes K, Lie Ø, Torrissen O, Waagbø R (1995) Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilisation. *Aquacult Res* 26:149–154
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult Nutr* 8:175–194
- Herbert NA, Kadri S, Huntingford FA (2011) A moving light stimulus elicits a sustained swimming response in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Physiol Biochem* 37:317–325

- Houlihan DF, Laurent P (1987) Effects of exercise training on the performance, growth, and protein-turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci* 44:1614–1621
- Hung SSO, Fynn-Aikins K, Lutes PB, Xu R (1989) Ability of juvenile White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to utilize different carbohydrate sources. *J Nutr* 119:727–733
- Jorgensen EH, Jobling M (1993) The effects of exercise on growth, food utilization and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 116:233–246
- Kaushik SJ, Oliva-Teles A (1985) Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50:89–101
- Kaushik SJ, Seilliez I (2010) Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquacult Res* 41:322–332
- Kirchner S, Kaushik S, Panserat S (2003) Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr* 133:2561–2564
- Lenas DS, Triantafyllou DJ, Chatziantoniou S, Nathanailides C (2011) Fatty acid profile of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Verbrauch Lebensm* 6:435–440
- Magnoni L, Weber JM (2007) Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. *J Exp Biol* 210:4016–4023
- Martin-Perez M, Fernández-Borràs J, Ibarz A, Millan-Cubillo A, Felip O, de Oliveira E, Blasco J (2012) New insights into fish swimming: a proteomic and isotopic approach in gilthead sea bream. *J Proteome Res* 11:3533–3547
- McDonald DG, Milligan CL, McFarlane WJ, Croke S, Currie S, Hooke B, Angus RB, Tufts BL, Davidson K (1998) Condition and performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of rearing practices on hatchery fish and comparison with wild fish. *Can J Fish Aquat Sci* 55:476–488
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Canto E, Fernández F, Baanante IV (1999) Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 82:223–232
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV (2000) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Biochim Biophys Acta* 1491:220–228
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV (2004) Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol B* 138:145–153
- Milligan CL, Girard SS (1993) Lactate metabolism in rainbow trout. *J Exp Biol* 180:175–193
- Moon TW (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B* 129:243–249

- Morrison DJ, Preston T, Bron JE, Hemderson RJ, Cooper K, Strachan F, Bell JG (2007) Authenticating production origin of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by chemical and isotopic fingerprinting. *Lipids* 42:537–545
- Nahhas R, Jones NV, Goldspink G (1982) Some aspects of sustained training of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol* 20:351–358
- Ozório ROA (2008) Swimming activity and non-protein energy (NPE) metabolism in fish. *Curr Nutr Food Sci* 4:282–289
- Palstra AP, Planas JV (2011) Fish under exercise. *Fish Physiol Biochem* 37:259–272
- Panserat S, Kaushik S (2002) Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique chez les poissons: exemple de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), faible utilisatrice des glucides alimentaires. *INRA Prod Anim* 15:109–117
- Panserat S, Médale F, Blin C, Brèque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S (2000) Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:1164–1170
- Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerré D, Geurden I, Médale F, Kaushik S, Corraze G (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294:123–131
- Papoutsoglou ES, Lyndon AR (2005) Effect of incubation temperature on carbohydrate digestion in important teleosts for aquaculture. *Aquac Res* 36:1252–1264
- Peres H, Oliva-Teles A (2002) Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205:287–299
- Peres H, Gonçalves P, Oliva-Teles A (1999) Glucose tolerance in Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179:415–423
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Lupianez JA, De la Higuera M (1996) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Adaptive response of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to high carbohydrate/low-protein and high-fat/non-carbohydrate diets. *Aquacult Nutr* 2:193–200
- Santinha JM, Medale F, Corraze G, Gomes EFS (1999) Effects of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult Nutr* 5:147–156
- Saravanan S, Schrama JW, Figueiredo-Silva AC, Kaushik SJ, Verreth JAJ et al (2012) Constraints on energy intake in fish: the link between diet composition, energy metabolism, and energy intake in rainbow trout. *PLoS ONE* 7(4):e34743. doi:10.1371/journal.pone.0034743
- Steinhausen MF, Steffensen JF, Andersen NG (2010) The effects of swimming pattern on the energy use of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Mar Freshwater Behav Physiol* 43:227–241

- Stephan G, Dreanno C, Guiollaume J, Arzel J (1996) Incidence of different amounts of proteins, lipids and carbohydrates in diets on the muscle lipid composition in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ichthyophysiol Acta* 19:11–30
- Stone DAJ (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev Fish Sci* 11:337–369
- Stone DAJ, Allan GL, Anderson AJ (2003) Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquacult Res* 34:123–134
- Tacon AGJ, Marc M, Turchini GM, De Silva SS (2010) Responsible aquaculture and trophic level implications to global fish supply. *Rev Fish Sci* 18:94–105
- Totland GK, Kryvi H, Jødestøl KA, Christiansen EN, Tangeras A, Slinde E (1987) Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during longterm sustained swimming. *Aquaculture* 66:299–313
- Venou B, Alexis MN, Fountoulaki E, Nengas I, Apostolopoulou M, Castritsi-Cathariou I (2003) 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* 225:207–223
- Vergara JM, López-Calero G, Robaina L, Caballero MJ, Montero D, Izquierdo MS, Aksnes A (1999) Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture* 179:35–44
- Vincent RE (1960) Some influences of domestication upon three stocks of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans Am Fisheries Soc* 89:3–14
- Watanabe T (2002) Strategies for further development of aquatic feeds. *Fish Sci* 68:242–252
- Werner W, Rey HG, Wielinger H (1970) On the properties of a new chromogen for the determination of glucose in blood according to the GOD/POD-method. *Z Analyt Chem* 252:224
- Wilson RP (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124:67–80
- Yogata H, Oku H (2000) The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. *Fish Sci* 66:1100–1105

CAPÍTOL III

**Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in
gilthead sea bream**



Publicat a la revista Journal of Comparative Physiology B l'any 2011

Title

Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream

Authors

Antoni Ibarz, Olga Felip, Jaume Fernández-Borràs, Miguel Martín-Pérez, Josefina Blasco, Joan R. Torrella.

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avd. Diagonal 645, E-08028 Barcelona, Spain.

Xarxa de Referència de Recerca i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya, XRAq.

*Corresponding author:

Telephone: + 34 934039635

Fax: + 34 934110358;

e-mail: tibarz@ub.edu (A. Ibarz)

Keywords: Capillarity, cellularity, growth, fish, hypertrophy, muscle, *Sparus aurata*, swimming

Abstract

Two groups of juvenile gilthead sea bream were kept on two different swimming regimes (Exercise, E: 1.5 body length s⁻¹ or Control, C: voluntary activity) for 1 month. All fish were first adapted to an experimental diet low in protein and rich in digestible carbohydrates (37.2% protein, 40.4% carbohydrates, 12.5% lipid). The cellularity and capillarisation of white muscle from two selected areas (cranial (Cr), below the dorsal fin, and caudal (Ca), behind the anal fin) were compared. The body weight and specific growth rate (SGR) of group E rose significantly without an increment in feed intake, pointing to higher nutrient-use efficiency. The white muscle fibre cross-sectional area and the perimeter of cranial samples increased after sustained activity, evidencing that sustained exercise enhances hypertrophic muscle development. However, we cannot conclude or rule out the possibility of fibre recruitment because the experimental period was too short. In the control group, capillarisation, which is extremely low in gilthead sea bream white muscle, showed a significantly higher number of fibres with no surrounding capillaries (F0) in the cranial area than in the caudal area, unlike the exercise group. Sustained swimming improved muscle machinery even in tissue normally associated with short bouts of very rapid anaerobic activity. So, through its effect on the use of tissue reserves and nutrients, exercise contributes to improvements in fish growth what can contribute to reducing nitrogen losses.

Introduction

The locomotor strategies of animals play an important role in their response to life challenges, conditioning their nourishment, predator-prey interactions and reproduction, and determining migration capacity. Farmed fish lead a more sedentary life than their counterparts in the wild. Mechanical loads are involved in the development and maintenance of vertebrate tissue (Buchanan and Marsh 2002; Davison 1997). Comparative studies of farmed and wild fish reveal useful data about fish domestication processes and provide an insight into fish nutrition, physiology and production. Several studies have shown that wild fish have superior swimming performances than farmed fish. This is the case for brook trout (Vincent 1960), coho salmon (Brauner et al. 1994), Atlantic salmon (McDonald et al. 1998) and gilthead sea bream (Basaran et al. 2007). Consequently, wild fish show superior aerobic and anaerobic capacities. Moreover, fish-rearing conditions also affect fish quality, with cultured fish presenting a higher fat content than their wild counterparts (Vincent 1960; Thorstad et al. 1997; Grigorakis et al. 2002).

Two basic responses to exercise training can be described in humans and in some other mammals. Activities such as running, swimming and cycling increase the aerobic capacity of muscle, which improves endurance (Holloszy and Booth 1976; Hoppeler et al. 1985), whereas isometric exercise (for example, weightlifting) results in fibre hypertrophy and an increase in muscle strength (Goldspink et al. 1976; Hoppeler 1986). Fewer studies have been carried out on exercise in lower tetrapods, such as amphibians and reptiles, due to the difficulties involved in forcing them to exercise at repeatable work rates and the highly anaerobic nature of any exercise (Bennett 1978). But by their nature, fish can easily be exercised by forcing them to swim against the stream. Swimming speeds of two body lengths per second ($\text{BL}\cdot\text{s}^{-1}$) or less are acceptable for training fish without any notable consequences for fish welfare or stress (Sänger and Stoiber 2001). Fish offer several advantages over mammalian models in exercise training studies. Many species of fish control buoyancy via their swim bladder, which limits the effects of gravitational forces compared with terrestrial animals. The locomotory musculature of fish is relatively simple: it is located around the axial skeleton, distributed in discrete myotomes, and the slow and fast muscle fibres are spatially segregated. Moreover, in contrast to mammals in which the recruitment of new skeletal muscle fibres ends soon after birth (Goldspink 1972), limiting muscle development and growth to hypertrophy, fish have the capacity to recruit new skeletal muscle fibres not only throughout larval life but also throughout juvenile and adult stages (Weatherley et al. 1988; Rowleson and Veggetti 2001).

Fish myotomal muscles are arranged to provide the power for different swimming styles. Red muscle, composed of slow oxidative fibres, produces the force required for slower, routine and sustainable movements, including migration over long distances. White muscle is composed of fast glycolytic fibres, which are recruited to produce the force required for rapid movements, such as sprint swimming and escape responses (Gibb and Dickson 2002). In many fish species, an intermediate pink muscle is usually present between the two types of muscle. The white muscle usually represents 35%-50% of body weight, although in male salmon and

tuna it can be nearly 70%, whereas red fibres comprise approximately 0.5–13% of body mass (Goolish 1989; reviewed by Dickson 1996). The pattern of fibre number and fibre size distribution and the pattern of capillaries surrounding each fibre in a particular muscle section are commonly referred to as muscle cellularity and capillarisation, respectively (Johnston 1999; Stoiber et al. 2002). Moreover, muscle cellularity is also the main determinant of both muscle growth and flesh quality (Johnston 1999).

Exercise is a powerful factor in improving growth rate and food conversion efficiency in many species (reviewed in Davison 1997). Increases in cell diameter and fibre numbers in aerobic muscle seem to be general features in teleost fish when exercise is moderate - swimming speeds below 1.5 BL.s⁻¹ - but the effects on white muscle are controversial. Some studies have reported that swimming has no effect on white muscle cellularity (Davie et al. 1986; Sanger 1992), but others show increases in white muscle fibre diameter (Hinterleitner et al. 1992; Davison 1994). It has also been demonstrated that the aerobic capacity of the swimming muscles increases due to exercise (Farrell et al. 1991), which is also linked to the changes in the contractile machinery. The reported data regarding the effects of training upon capillarisation are also controversial; no changes were observed in salmonids (Johnston and Moon 1980; Davison 1983), whereas studies on cyprinids (Sanger 1992) and rainbow trout (Davie et al. 1986) reported that training led to higher capillarisation, mainly in red muscle.

Here we examine the effect of mechanical load on gilthead sea bream white muscle by submitting fish to a 1-month training period. During this period fish were fed on an experimental diet (40.4% CHO, 37.2% protein, 12.5% lipid). Two zones of the fish body (cranial and caudal) were selected to evaluate the effects of exercise on the reared fish. Since these variables are of crucial importance in commercial terms and are usually used as growth markers, our study focuses on white muscle cellularity and capillarisation.

Materials and methods

Fish rearing

Juvenile sea bream (*Sparus aurata* L.) were purchased from a commercial supplier (Cripesa, Tarragona, Spain) who reared the fish in marine cages. One hundred fish were transferred and maintained indoors in the facilities of the Faculty of Biology (University of Barcelona, Barcelona, Spain), in six 200-L seawater tanks equipped with a semi-closed recirculation system with physical and biological filters, ozone skimmers and continuous aeration at 20°C and 12L:12D, with a 35% weekly seawater renewal rate. Fish were first acclimated to a carbohydrate-rich diet (composition: 37.15% protein; 12.51% lipid; 40.04% carbohydrate; 1.77% fibre; and 8.52% ash) and fed to satiation for 2 weeks. After this period, fish were slightly anaesthetised, weighed and randomly distributed in trial tanks (initial body weight and length data are shown in Table 1). Control groups (C: 12 fish per tank, in triplicate) were kept under normal rearing conditions in 200-L circular tanks with a water flow of 350 L/h (vertical water entrance). Exercise groups (E:

12 fish per tank, in triplicate) were kept in 400-L circular tanks in the same semi-closed circuit. To obtain sustained activity, the fish were prevented from entering the central area of lower velocity by a cylindrical tube. This results in a living area corresponding to an effective space of 200 L with the same fish density as in the control tanks. Water flow was 700 L/h with a circular and uniformly distributed flow induced by a perpendicular water entrance and one additional submerged water pump (at the bottom of the tank and isolated from the fish living area). This design resulted in a swimming velocity of 1.5 body lengths per second measured at three different tank depths (at the surface, mid-tank and near the bottom). During the experimental period all groups were fed until apparent satiety twice a day (9:30 a.m. and 5:30 p.m.) and intake was recorded daily.

Sampling and histochemical procedures

After 4 weeks, 10 fish randomly sampled from both C and E groups were sacrificed by severing their spinal cord and the final body weight and body indices (hepatosomatic, muscle-somatic and perivisceral fat content) were recorded. For muscle composition, epaxial white muscle samples were obtained and immediately frozen in liquid nitrogen and then kept at -80°C until the main components were analysed. Muscle composition in water, glycogen, lipid, protein and DNA were analysed as explained elsewhere (Ibarz et al. 2007a, b).

White muscles samples for histochemical examination were dissected from the cranial (Cr) and caudal (Ca) regions. Small strips of white muscle with an approximate length of 1 cm, a width of 1 cm and a thickness of 0.5 cm were obtained from each region. Each sample was immediately soaked in 3-methyl-butane pre-cooled to -160°C and stored in liquid nitrogen until subsequent sectioning (Dubowitz 1985). Serial transverse sections from each sample were cut at a thickness of 16-20 μm in a cryostat (Frigocut, Reichart-Jung, Heidelberg, Germany) at -22°C . Sections were mounted on gelatinised slides and incubated for 5 minutes in a buffered fixative (Viscor et al. 1992) in order to prevent shrinkage or wrinkling. After rinsing the slides thoroughly, we used the ATPase method developed by Fouces et al. (1993) in order to reveal muscle capillaries and a histochemical assay for succinate dehydrogenase to demonstrate the aerobic or anaerobic characteristics of muscle fibres (Nachlas et al. 1957).

Morpho-functional measurements

Images of the stained sections were obtained using a light microscope (BX40, Olympus, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (KP-C550, Hitachi, Tokyo, Japan). To ensure accurate calibration of all measurements, an image of a stage micrometer was obtained each time images of samples were taken. All the parameters listed below were empirically determined from $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ windows of tissue from two different zones or muscle fields in each sample. After testing for the absence of differences between the two muscle fields from each sample (see Statistics), the data obtained from both fields were considered together so that the sample

size was large enough. The following parameters were counted or calculated: capillary density (CD), fibre density (FD), the number of capillaries in contact with each fibre (NCF), the percentage of fibres having no capillaries in contact with them (F0) and the percentage of fibres in contact with at least one capillary (F+). Capillary and fibre counts were calculated to be expressed as capillaries and fibres per mm². The fibre cross-sectional area (FCSA) and fibre perimeter (FPER) were determined directly using a personal computer connected to a digitiser tablet and SigmaScan software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) from digital images. The total number of fibres analysed in each sample muscle ranged from 200 to 300. Two indices expressing the relationship between NCF and the FCSA: $CCA = NCF \times 10^3 / FCSA$ or $CCP = NCF \cdot 10^2 / FPER$, were also calculated. These indices are considered a measure of the number of capillaries per 1,000 μm^2 of muscle FCSA and the number of capillaries per 100 μm of muscle FPER. The maximal diffusion distance (MDD) between the capillary and the central region of the fibre was also calculated for every capillary of the region analysed. A shape factor (SF), circularity, was measured as a function of the FPER and the FCSA following the formula: $SF = (4\pi FCSA) / FPER^2$. Circularity indicates the degree of adjustment of the fibre transverse section to a circular shape (SF=1 for a perfect circle).

Statistics

Data for growth, body indices and white muscle composition under each condition, initially analysed by one-way ANOVA, did not show any differences between the three tanks. The data were then grouped and Student's *t*-tests were performed using *n*=3 tanks for the growth study, and *n*=10 animals per condition for the remaining parameters. To test for the absence of differences between both muscle fields from each muscle sample, the non-parametric Wilcoxon rank-sum test was performed. For the percentage of fibre types, the arcsine transformation was applied as a previous step. The normality of the data was tested by the Kolmogorov-Smirnov test (with Lilliefors' correction) and the comparisons between the control and exercise groups were analysed by the Student's *t*-tests. Data for all the parameters are expressed as sample means \pm standard error of the mean.

For FCSA histograms a dynamic fitting by nonlinear regression was performed for each section (caudal and cranial). The approximation was done by a log-normal (four parameters) equation with a dynamic fit option of 200 for both total number of fits and maximum number of iterations. Log-normal equations have been reported with R value and coefficients and standard errors for each parameter (*a*, *b*, *x*₀ and *y*₀). Individual data were linearised by an $\ln(x+1)$ transformation, thus avoiding negative values and possible $\ln(0)$. With this linearisation, a linear regression was obtained to test for the difference in regression slope. All statistical analyses were performed using SigmaStat 4.0 (in SigmaPlot 11.0 Software, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) with significance at $p < 0.05$.

Results

Table 1 shows the body weight and organ indices, growth rate and muscle composition of gilthead sea bream submitted to two swimming-activity regimes. Noticeably, the fish that maintained a swimming speed of 1.5 BL.s⁻¹ for 1 month presented a significantly higher body weight without any differences in food intake (C: 2.8 ± 0.1 vs E: 2.6 ± 0.1 g of feed per 100 g body weight). Other body indices, such as the condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI), body percentage of perivisceral fat and muscle-somatic index (MSI), did not alter significantly (Table 1). Epaxial white muscle samples of the exercising fish reduced lipid content by 30% compared to the control group values, but protein percentage did not change. Therefore, the increment in total body weight with similar muscle-somatic index and protein percentage implies increased muscle mass with a net gain of total protein content in white muscle. A slight decrement in the DNA content (7%) was observed in fish under sustained activity, but there was no difference in the DNA content of total white muscle mass (calculated by multiplying body weight per MSI per DNA levels) between the C and E groups (total muscle DNA ranged from 8.6 to 8.7 mg).

Table 1 Growth, body indices and muscle composition of gilthead sea bream submitted to two regimes of swimming activity

	Control	Exercise
Growth^a		
Initial weight (g)	88.4 ± 0.98	90.5 ± 1.17
Final weight (g)	98.2 ± 2.3	107 ± 2.2*
SGR	0.61 ± 0.15	0.76 ± 0.06*
Body indices^b		
CF	1.50 ± 0.03	1.41 ± 0.06
HSI	2.06 ± 0.16	2.09 ± 0.15
Periv. fat index	2.15 ± 0.13	2.01 ± 0.13
MSI	40.9 ± 0.78	40.6 ± 0.65
Muscle composition^b		
% protein	20.5 ± 0.18	20.6 ± 0.18
% lipid	2.17 ± 0.14	1.68 ± 0.15*
µg DNA/g	214 ± 8	201 ± 3*

SGR specific growth rate in % per day = $100 \times [\ln(\text{final weight}) - \ln(\text{initial weight})]/21$ days; *CF* condition factor = body weight \times $100 \times \text{total length}^{-3}$; *HSI* hepatosomatic index = liver weight \times $100 \times \text{body weight}^{-1}$; *Periv. fat index* perivisceral fat index = fat weight \times $100 \times \text{body weight}^{-1}$; *MSI* musculosomatic index = total muscle weight \times $100 \times \text{body weight}^{-1}$

* Significant difference by Student's *t* test ($p < 0.05$)

^a Values are mean ± standard error of the mean of triplicate tanks

^b Values are mean ± standard error of the mean of 10 fish for each condition

Muscle cellularity and capillarisation were studied in two different zones: cranial (Cr) and caudal (Ca). For both zones and conditions the histochemical assay for succinate dehydrogenase (SDH) revealed a lack of staining, indicating the absence of SDH activity and thus the anaerobic character of those muscle sections. Illustrative images from muscle section are shown in Figure 1.

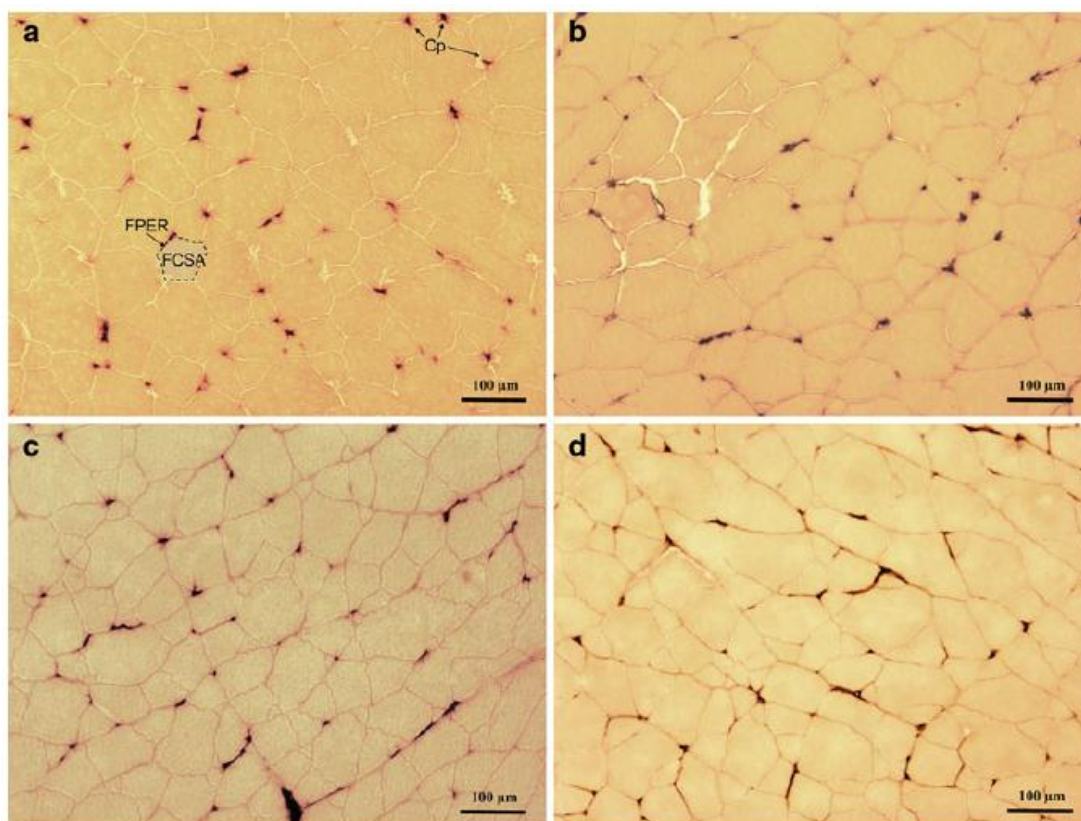


Figure 1. Illustrative images of cross sectional muscle of juvenile gilthead sea bream. A) Cranial section of control fish; B) Cranial section of exercised fish; C) Caudal section of control fish; D) Caudal section of exercised fish. All images correspond to one representative serial transverse section and capillaries revealed by an ATPase detection method (see “Material and Methods” section for further information). Cp: capillaries; FCSA: fibre cross sectional area; FPER: fibre perimeter.

Morphometrical fibre parameters and fibre density (cellularity) from both muscle samples are shown in Table 2, and capillarisation parameters in Table 3. Fish under the sustained swimming regime presented significant increases in the parameters related to muscle fibre size in the cranial zone (Table 2). Likewise, the fibre perimeter was 11% higher and the fibre area was 17% higher than the control ones. These increases took place without any change in the shape factor of the fibres. Fibre cross-sectional area (FCSA) distributions, along with adjust equations, in both sections of the gilthead sea bream white muscle are shown in Figure 2, and linearised regression parameters of those equations are reported in Table 3. The slope for the cranial area of control group was higher (in absolute value) than those of the other

groups. The number of small fibres ($FCSA < 2500 \mu\text{m}^2$) was significantly higher for the cranial area of control group, whereas white muscle fibres with $FCSA > 9000 \mu\text{m}^2$ were lower (Table 3), indicating that, in the short 1 month period of sustained activity, white muscle fibres achieved higher perimeters and areas.

Table 2 Morphometrical fibre parameters and fibre density (cellularity) in cranial (Cr) and caudal (Ca) muscles of control (C) and exercising (E) fish

	CrC	CrE	CaC	CaE
FCSA (μm^2)	3749 \pm 216	4399 \pm 122*	4430 \pm 107 ⁺	4333 \pm 152
FPER (μm)	244 \pm 7.6	270 \pm 3.1*	273 \pm 4.5 ⁺	270 \pm 4.9
SF	0.68 \pm 0.01	0.66 \pm 0.01	0.66 \pm 0.00	0.65 \pm 0.01
FD (fibres/mm ²)	243 \pm 18	201 \pm 5	198 \pm 9	215 \pm 17

Values are mean \pm standard error of the mean ($n = 5$ animals)

Significant differences ($p < 0.05$) between groups are indicated following the code: *CrC versus CrE; ⁺CrC versus CaC

FCSA fibre cross-sectional area, FD fibre density, FPER fibre perimeter, SF shape factor (circularity)

Table 3 Capillarisation parameters in cranial (Cr) and caudal (Ca) muscles of control (C) and exercising (E) fish

	CrC	CrE	CaC	CaE
CD	56 \pm 3.1	56 \pm 4.9	65 \pm 7.2	71 \pm 7.6
NCF	0.73 \pm 0.08	0.84 \pm 0.13	0.98 \pm 0.09	1.03 \pm 0.06
CCA	0.58 \pm 0.07	0.50 \pm 0.04	0.49 \pm 0.04	0.58 \pm 0.04
CCP	0.58 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.56 \pm 0.03	0.60* \pm 0.02
MDD (μm)	42 \pm 1.8	48 \pm 1.8	46 \pm 0.9	45 \pm 1

Values are mean \pm standard error of the mean ($n = 5$ animals)

Significant differences ($p < 0.05$) between groups are indicated following the code: *CrE versus CaE

CD capillary density (capillaries/mm²), NCF number of capillaries in contact with each fibre; CCA = $NCF \times 10^3 / FCSA$, relationship between NCF and the FCSA; CCP = $NCF \times 10^2 / FPER$, relationship between NCF and the FPER; MDD maximal diffusion distance between the capillary and the centre of the fibre

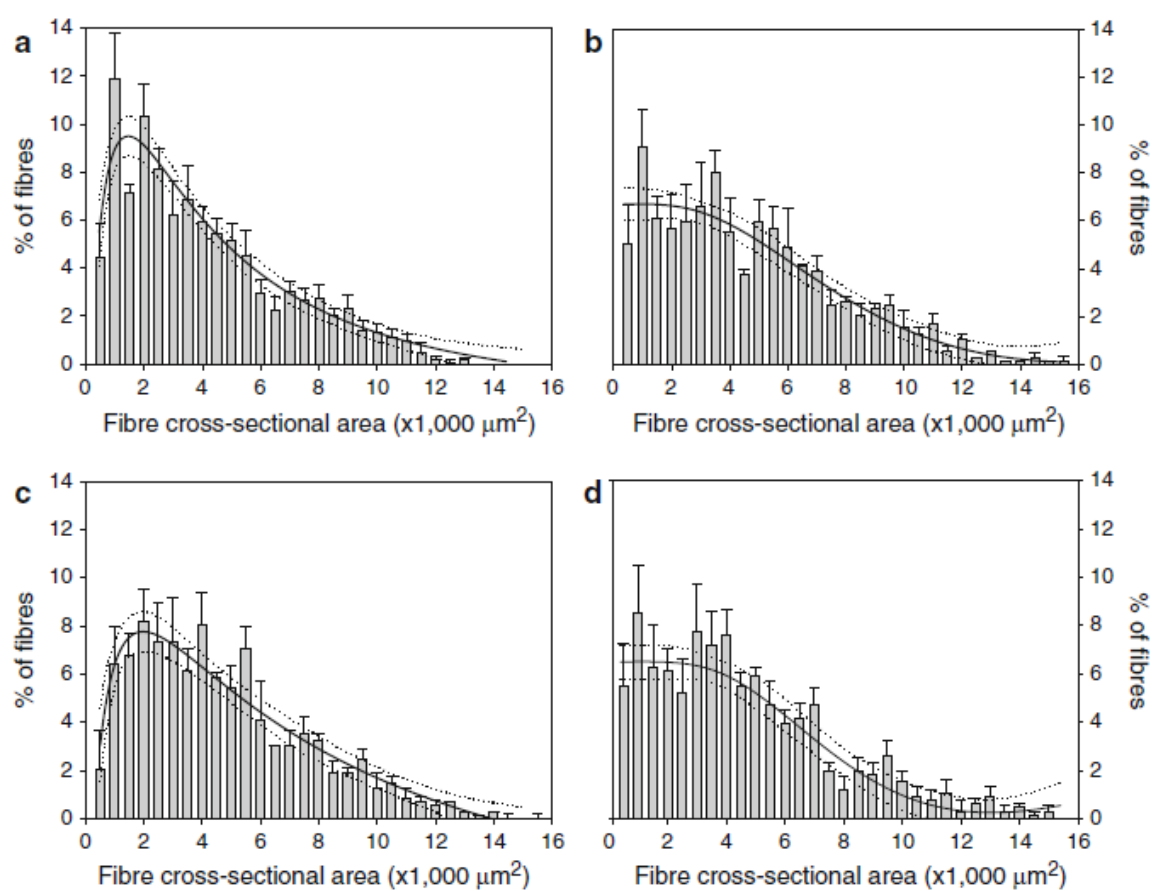


Figure 2. White muscle cross-sectional area histograms. A) Cranial-Control; B) Cranial-Exercise; C) Caudal-Control; and D) Caudal-Exercise. Muscle fibre areas were grouped in 50x1000 μm^2 groups and the data correspond to mean \pm SEM frequency of 5 animals. Regression parameters are shown and analysed in Table 4. See “Material and Methods” (“Statistics”) for further information.

The measures of capillarisation shown in Table 3 are the number of capillaries per fibre and distance (NCF and CD), two derived indices relating, respectively, the capillaries that surround a fibre to its cross-sectional area and perimeter (CCA and CCP), and the mean diffusion distances of the capillaries to the centre of the fibre (MDD). Moderate but sustained exercise affected the capillarisation of the caudal area by slightly increasing the surrounding capillarity of the fibre perimeter (CCP data, $p < 0.05$, Table 3). However, white muscle capillarisation was very low in both the cranial and caudal localisations, scarcely reaching a mean of one capillary per fibre. Unlike the exercised fish, the gilthead sea bream in the control group presented a high proportion of fibres with no capillaries (F0) in contact with them, these being significantly ($p < 0.05$) more abundant in the cranial zone ($38.3 \pm 3.4\%$ and $27.2 \pm 2.8\%$, CrC versus CaC, respectively, Figure 3). Moreover, those fibres in contact with capillaries (F+) generally only had contact with one or two, with a maximum of four capillaries observed on only a few occasions. This determines high diffusion distances, which confirms the mainly anaerobic character of the fish white muscle.

Table 4 Regression parameters for cranial (Cr) and caudal (Ca) fibre cross-sectional area (FCSA in μm^2) of white muscles of gilthead sea bream submitted to two swimming regimes (C: voluntary activity, and E: 1.5 b.l.s^{-1})

Parameters	CrC	CrE	CaC	CaE
Log-normal regression ^a				
<i>R</i>	0.87	0.84	0.87	0.79
<i>a</i>	10.91 ± 0.84	-6.60 ± 0.64	10.91 ± 0.84	-6.25 ± 0.44
<i>b</i>	1.14 ± 0.13	0.67 ± 0.13	1.14 ± 0.13	0.53 ± 0.09
x_0	1.49 ± 0.10	16.07 ± 2.76	1.49 ± 0.10	13.15 ± 1.15
y_0	-1.52 ± 0.95	6.71 ± 0.33	-1.52 ± 0.95	6.54 ± 0.36
Linear regression ^b				
<i>R</i>	0.91	0.85	0.80	0.80
y_0	2.48 ± 0.06	2.37 ± 0.07	2.32 ± 0.08	2.27 ± 0.08
<i>a</i>	$-0.173 \pm 0.007 \text{ a}$	$-0.151 \pm 0.008 \text{ b}$	$-0.150 \pm 0.009 \text{ b}$	$-0.147 \pm 0.009 \text{ b}$
<i>N</i> ^c	149	152	149	154
Percentage of muscle fibres with				
FCSA $\leq 2,500$	$42.0 \pm 2.7 \text{ a}$	$31.9 \pm 1.9 \text{ b}$	$30.8 \pm 3.3 \text{ b}$	$35 \pm 4.7 \text{ a,b}$
$2,500 < \text{FCSA} \leq 6,000$	37.1 ± 0.9	40.5 ± 1.8	44.0 ± 4.5	40.5 ± 4.3
$6,000 < \text{FCSA} \leq 9,000$	15.1 ± 1.5	17.5 ± 1.5	16.6 ± 2.2	15.1 ± 1.5
FCSA $> 9,000$	$5.8 \pm 1.4 \text{ a}$	$10.1 \pm 1.5 \text{ b}$	$8.6 \pm 0.9 \text{ b}$	$9.4 \pm 2.2 \text{ b}$

The *R* values of both fit regressions (log-normal and linear regression) were significant ($p < 0.0001$) in all groups. For further explanation see “Statistics”

Different letters correspond to significant different groups ($p < 0.05$)

^a Log-normal regression (four parameters) adjusts the profiles shown in Fig. 1 to the following equation: $F = y_0 + a \times \exp(-0.5 \times (\ln(x/x_0)/b)^2)$

^b Data was linearised by $\ln(x + 1)$ transformation and follow the equation: $F = y_0 + a \times x$

^c *N* corresponds to the number of individual data from five fish for each condition

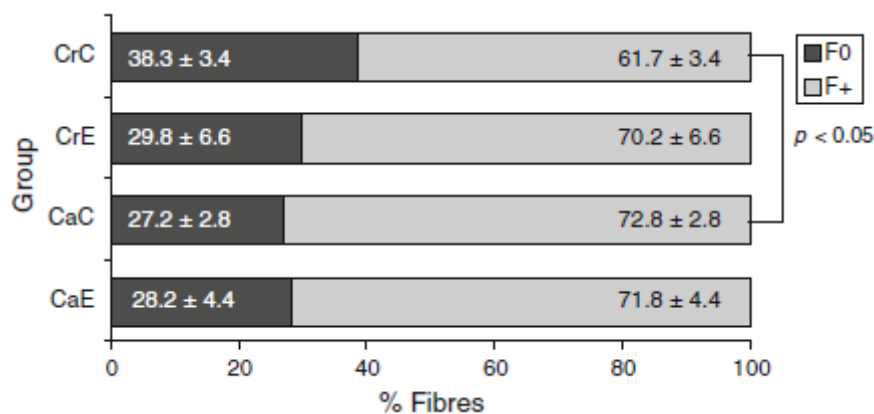


Figure 3. White muscle capillary surrounding. Bar chart showing the percentage of fibres with no surrounding capillaries (F0) and the percentage of fibres contacting at least one capillary (F+). CrC, Cranial-Control; CrE, Cranial-Exercise; CaC, Caudal-Control; and CaE, Caudal-Exercise. Data are mean \pm SEM of 5 animals. Significant differences between groups are indicated on the graph.

Discussion

The present work is the first attempt to study the muscle cellularity of gilthead sea bream using sustained activity as a rearing condition to enhance the growth of fish on a rich carbohydrate diet. During recent years, new extrusion feed techniques permit improved availability of highly digestible carbohydrates and recent studies of sea bream have focused on this source to diminish dietary protein levels and waste nitrogen (Georgopoulos and Conides 1999; Venou et al. 2003; Fernández et al. 2007). The aim of replacing dietary protein and lipid by using a carbohydrate source also aims to increase the quality of meat by reducing lipid deposition in the sedentary fish. In the present study, the reduction of dietary protein did not limit energy availability as fish were fed to apparent satiety and thus, the levels of dietary protein proposed (37.2%) should be not considered as a limiting factor for growth. In studies on other species, mainly salmonids, differences in fibre size and number along the length of the body (Stickland 1983; Mascarello et al. 1995) or in ventral and dorsal regions (Kiessling et al. 1991) have been reported. Our data show that untrained gilthead sea bream (with body weight of approximately 100 g) had cranial fibres with lower cross-sectional areas and perimeters than caudal fibres. However, Abdel *et al.* (2005) did not show significant differences in white muscle size distribution when measuring muscle cellularity in the cranial and caudal areas of sea bass (*D. labrax*) with body weights of over 350 g. Although there are few published data, this disparity could be related to the fish size and age, which would mean that muscle growth potential is not the same in early stages of live as in adults. In fact, fish muscle plasticity has been strongly linked to the existence of seasonal cycles (reviewed by Johnston 1999).

Our results also show that the dynamics of gilthead sea bream growth are highly sensitive to swimming regimes. Thus, induced swimming at $1.5 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$ affected white muscle fibres at cranial level, with increases in both area and perimeter values, but it did not modify the caudal fibres. Larger fibre sizes led to increased muscle masses and a higher total body weight, supporting the theory that normal sedentary rearing conditions under-exploit the growth potential of fish muscle. Indeed, exercise is a powerful stimulus in muscle hypertrophy, although the effects of muscle recruitment on hyperplasia have not been determined (Johnston 1999). Little is known about the origin of new fibres produced during the post-larval growth phase, and hyperplastic and hypertrophic growth usually occurs simultaneously in fish (reviewed by Johnston 1999). Nevertheless, in fast-growing fish, including cultured species that reach larger sizes, hyperplasia usually continues for longer than in small fish, in which hyperplasia stops earlier and hypertrophy is a more effective growth mechanism (Kiessling et al. 1991; Valente et al. 1999; Rowleson and Veggetti 2001; Aguiar et al. 2005). In the current trial, the changes observed in the distribution of the muscle fibre cross-sectional area were interpreted as markers of changes in the relative contribution of hyperplastic and hypertrophic growth processes. Muscle protein percentage and total muscle DNA content remained invariable, which indicates that hypertrophy is the main muscle-growth mechanism in this short-term exercise, although hyperplastic effects cannot be ruled out, since the test period was short (1 month).

Few studies exist on muscle capillarity in fish, but all show that fish white muscle is poorly capillarised compared with mammal muscles, reflecting the low O₂ fluxes that fish white muscle needs. Only highly aerobic fish muscle presents high capillary-to-fibre number ratios. In carp, it was 2.2 at 28°C, but increased to 4.8 as the fibre size increased with acclimation to 2°C (Johnston 1982a); in tuna red muscle it was below 2, but with a relatively small fibre size (Mathieu-Costello et al. 1996), and it was 12.9 in the highly aerobic muscle of anchovy (Johnston 1982b). Therefore, the fact that 30-40% of the fibres in the white muscle of gilthead sea bream had no surrounding capillaries (F0) should be not surprising. Apart from escape bouts or prey capture, the low capillarisation of fish white muscle paralleled very low tissue metabolic activity rates and slow oxygen and nutrient supplies, these being lower in the cranial location of untrained fish than in exercised. The induced sustained activity, however, increased the number of capillaries in contact with each fibre (NCF) in the caudal area. Capillarisation in this zone relates to a higher number of pink fibres in the caudal area and, as a consequence, a greater need for oxygen.

In general, fish appetite is stimulated by activity and exercised fish generally consume more food. Nevertheless, a unit mass of growth is achieved when a lower amount of food is consumed, and the mass gain is achieved faster (Davison 1997). Another important aspect of the present study is that for gilthead sea bream under the conditions studied, muscle growth, and consequently whole-body growth, was achieved without significant increases in food consumption. Moreover, the lipid content of white muscle diminished in trained fish, an important aspect that can contribute to increased muscle quality, thus avoiding the excessive fat deposition of many cultured fish species (Cakli et al. 2007; Grigorakis 2007).

Conclusions

All the present results lead to the conclusion that firstly, moderate sustained activity improves whole-body growth through hypertrophic white muscle growth, and secondly, through its effects on the use of tissue reserves and nutrients, the exercise would contribute to a reduction in water contamination by lowering nitrogen waste from dietary protein. The markedly higher white muscle development was seen in the cranial region.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Catalan government and the Spanish government Ministry of Culture. O. Felip and M. Martín-Pérez received fellowships from FPI-2007 and FI-2007 of the Spanish government and the Catalan government, respectively. The authors thank David Rizo for his technical assistance in processing muscle samples and Dr. Ginés Viscor and Dr. Martín Rios for their valuable contribution in editing the manuscript.

References

- Abdel, I., López-Albors, O., Ayala M. D., García-Alcazar, A., Abellán, E., Latorre, R., Gil, F., 2005. Muscle cellularity at cranial and caudal levels of the trunk musculature of commercial size sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Anat. Histol. Embryol.* 34, 280–285.
- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato L.E., Pai-Silva, M. D., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *J. Fish Biology* 67, 1287–1298.
- Basaran, F., Ozbilgin, H., Ozbilgin, Y. D. 2007. Comparison of the swimming performance of farmed and wild gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture Research* 38, 452-456.
- Bennett, A. F. 1978. Activity metabolism of the lower vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 40, 447-469.
- Brauner, C. J., Iwama, G. K., Randall, D. J. 1994. The effect of short-duration seawater exposure on the swimming performance of wild and hatchery-reared juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 2188-2194.
- Buchanan, C. I., Marsh, R. L. 2002. Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp. Biochem. Physiol.* 133 A, 1101-1107.
- Davie, P. S., Wells, R. M. G., and Tetens, V., 1986. Effects of sustained swimming on rainbow trout muscle structure, blood oxygen transport, and lactate dehydrogenase isozymes: evidence for increased aerobic capacity of white muscle. *J. Exp. Zool.* 237, 159-171.
- Davison, W. 1983. Changes in muscle cell ultrastructure following exercise in *Salmo trutta*. *Experientia* 39, 1017-1018.
- Davison, W., 1989. Training and its effects on teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 94A, 1-10.
- Davison, W. 1994. Exercise training in the banded wrasse *Notolabrus fucicola* affects muscle fibre diameter but not muscle mitochondrial morphology. *N. Z. Nat. Sci.* 21, 1-16.
- Davison, W., 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A, 67-75.
- Dickson, K. A. 1996. Locomotor muscle of high-performance fishes: What do comparisons of tunas with ectothermic sister taxa reveal?. *Comp. Biochem. Physiol.* 113A, 39-49.
- Dubowitz, V. (1985). *Muscle Biopsy: a Practical Approach*. Baillière Tindall, London, UK.
- Farrell, A. P., Johansen, J. A., Suarez, R. K., 1991. Effects of exercise training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* 9, 303-312.
- Fernández, F., Miquel, A. G., Córdoba, M., Varas, M., Metón, I., Caseras, A., Baanante, I. V., 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 343, 1-10.

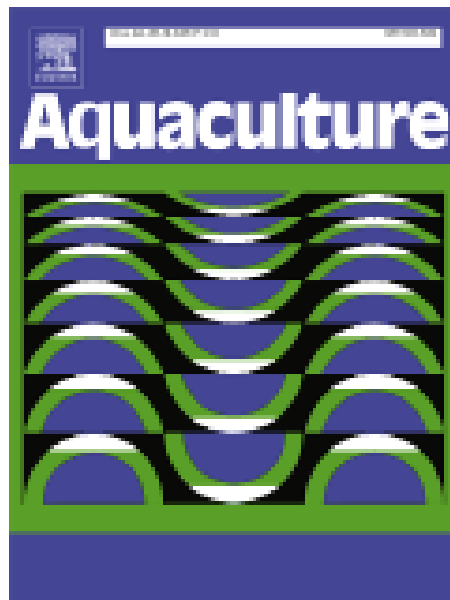
- Fouces V., Torrella J.R., Palomeque J., Viscor G. 1993. A Histochemical ATPase method for the demonstration of the muscle capillary network. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 283-289.
- Georgopoulos, G. B., Conides, A. J., 1999. Study on the effects of dietary starch on growth, food conversion and digestibility of adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). *J. Aquac. Trop.* 14, 143-152.
- Gibb, A. C., Dickson, K. A., 2002. Functional Morphology and Biochemical Indices of Performance: Is there a Correlation Between Metabolic Enzyme Activity and Swimming Performance?. *Integrative and Comparative Biology* 42 (2), 199-207.
- Goldspink, G., 1972. Postembryonic growth and differentiation of striated skeletal muscle. In: *The Structure and Function of Muscle* (Bourne, G. H., Ed.), pp. 179-236. Academic Press, New York.
- Goldspink, G., Howells, K. F., and Ward, P S. 1976. Effects of exercise on muscle fibre size. In: *Medicine Sport 9. Advances in Exercise Physiology* (Jokl, E., Ed.), pp. 103-113. Karger, Basel.
- Goolish, E. M. 1989. The scaling of aerobic and anaerobic muscle power in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 147, 493-505.
- Grigorakis K., 2007, Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*S. aurata*) and sea bass (*D. labrax*) and factors affecting it: a review. *Aquaculture* 272, 55-75
- Grigorakis, K., Alexis, M. N., Taylor, K. D. A., Hole, M. 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 477-484.
- Hinterleitner, S., Huber, M., Lackner, R., and Wieser, W. 1992. Systemic and enzymatic responses to endurance training in two cyprinid species with different life styles (Teleostei: Cyprinidae). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 110-115.
- Holloszy, J. O., Booth, F. W. 1976. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annual Rev. Physiol.* 38, 273-291.
- Hoppeler, H. 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Inr. J. Sports Med.* 7, 187-204.
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K. E., Lindstedt, S. L., Claassen, H., Vock, P., and Weibel, E. R. 1985. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure. of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 59, 320-327.
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M. A., Sánchez, J., Blasco, J., 2007a. Alteration in lipids metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262, 470-480.
- Ibarz, A., Blasco, J., Sala-Rabanal, M., Gallardo, M. A., Redondo, A., Fernández-Borràs, J., 2007b. Metabolic rate and tissue reserves in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under thermal fluctuations and fasting, and their capacity for recovery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 1034-1042.

- Johnston, I. A. 1982a. Capillarization, oxygen diffusion distances and mitochondrial content of carp muscles following acclimation to summer and winter temperatures. *Cell Tissue Res.* 222, 325-337.
- Johnston, I. A. 1982b. Quantitative analyses of ultrastructure and vascularization of the slow muscle fibres of the anchovy. *Tissue Cell* 14,319-328.
- Johnston, I. A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johnston, I. A., Moon, T. W. 1980. Exercise training in skeletal muscle of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Exp. Biol.* 87,177-194.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., Kiessling, K.-H., 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in relation to ration and age: I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93, 335–356.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., and K. H. Kiessling, 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93, 335–356.
- Mascarello F., Rowlerson A., Radaelli G., Scapolo P.A., Veggetti A. 1995. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* L.: I. Myosin expression and organization of fibre types in lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16, 213-222.
- Mathieu-Costello, O, Brill R.W., and Hochachka P.W, 1996. Structural basis for oxygen delivery: muscle capillaries and manifolds in tuna red muscle. *Comp Biochem Physiol* 113A, 25-31.
- McDonald, D. G., Milligan, C. L., McFarlane, W. J., Croke, S., Currie, S., Hooke, B., Angus, R. B., Tufts, B. L., Davidson, K. 1998. Condition and performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of rearing practices on hatchery fish and comparison with wild fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 476-488.
- Nachlas, M. M, Tsou, K. C, De Souza, E., Cheng, C. S., Seligman, A.M., 1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem* 5: 420-436.
- Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G., Veggetti, A., 1995. Differentiation and growth of muscle in fish *Sparus aurata* L.: II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16, 223–236.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: *Muscle Development and Growth*. (Johnston I.A., ed.). pp 103-140. Academic Press, London.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer T., Tolasa, S., 2007. Quality differences of whole gutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18, 391-397.
- Sänger, A. M. 1992. Effects of training on axial muscle of two cyprinid species: *Chondrostoma nasus* (L.) and *Leuciscus cephalus* (L.). *J. Fish Biol.* 40, 637-646.
- Sänger, A. M., Stoiber, W., 2001. Muscle fibre diversity and plasticity. In: *Muscle Development and Growth*. (Johnston I.A., ed.). pp 187-237. Academic Press, London.

- Stickland, N. C., 1983. Growth and development of the muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.* 137, 323–333.
- Stoiber, W., Haslett, J. R., Wenk, R., Steinbacher, P., Gollman, H.-P. and Sanger, A. M. 2002. Cellularity changes in developing red and white fish muscle at different temperatures: simulating natural environmental conditions for a temperate freshwater cyprinid. *J. Exp. Biol.* 205, 2349 -2364.
- Thorstad, E. V., Finstad, B., Okland F., McKinley, R. S., Booth, R. K. 1997. Endurance of farmed and sea-ranched Atlantic salmon *Salmo salar* L at spawning. *Aquaculture Research* 28, 635-640.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., Silva, M.W., Oliveira, M.H., Monteiro R.A.F., Fauconneau, B., 1999. Growth dynamics of white and red muscles in fast and slow growing strains of rainbow trout, *J. Fish Biol.* 55, 675–691.
- Venou, B., Alexis, M. N., Fountoulaki, E., Nengas, I., Apostolopoulou, M., Castritsi-Cathariou, I. 2003. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient, utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzymes activities. *Aquaculture* 25, 207-223.
- Vincent, R. E. 1960. Some influences of domestication upon three stocks of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Transactions of the American Fisheries Society* 89, 3-14.
- Viscor G, Torrella JR, Fouces V, Palomeque J. 1992. Skeletal muscle capillarization and fiber types in urban and homing pigeons (*Columba livia*). *Comp Biochem Physiol* 101A, 751-757.
- Weatherley, A. H., Crossmon, G., 1937. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, 69, 33-38.
- Weatherley, A. H., Gill, H. S., Lobo, A. E. 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish Biology* 33, 851-859.

CAPÍTOL IV

Diets labelled with ^{13}C -starch and ^{15}N -protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)



Sotmès a revisió a la revista Aquaculture l'any 2013

Title

Diets labelled with ¹³C-starch and ¹⁵N-protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).

Authors

Olga Felip*, Josefina Blasco, Antoni Ibarz, Miguel Martín-Pérez, Jaume Fernández-Borràs

Centre de Referència i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya,
Departament de Fisiologia i immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain.

* Corresponding author:

Departament de Fisiologia i immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de
Barcelona, Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain

Phone: +34.93.402.15.57

Fax: +34.93.411.03.58

E-mail address: olga.felip@ub.edu

Running title: Daily rhythms of nutrients use in *Sparus aurata*

Abstract

Physiological activities of animals are strongly regulated by daily rhythms, and mealtime can act as a rhythm marker that influences nutrient assimilation and use. Over a period of two months, three groups of gilthead sea bream (in triplicate) were fed with two different diets: a commercial diet (Cd), and an experimental carbohydrate-rich diet (Ed) according to three food regimes. Meals were delivered twice daily (at 10 am and 5 pm) and the three feeding regimes were as follows: Cd/Cd, Cd/Ed and Ed/Cd. The aim of this research was to determine the effects of meal timing and meal profile on carbohydrate use and protein retention. This was assessed in two post-feeding experiments (PF1 and PF2) by labelling a single meal with ¹⁵N-protein and ¹³C-starch and determining isotope retention in the main organs and tissue components. PF1 begun at morning mealtime (10 am), PF2 in the afternoon (5 pm) and samples were obtained at the other mealtime and 24 hours after. Proximal composition of liver and muscles presented daily rhythms with small variations of glycogen and protein contents. The recoveries of stable isotopes revealed that post-feeding metabolic changes and fate of the labelled nutrients were due first, to the dietary regime, and second, to the last meal received. The decrease in dietary protein content assimilated each day, observed in fish in the regimes with Ed diet, was compensated by more efficient protein retention combined with increased energy use of carbohydrates. Nevertheless, carbohydrates were not used as efficiently in the afternoon as in the morning.

Key words:

delta (δ) ¹³C; δ^{15} N; feeding rhythm; nutrients fate; protein sparing

1. Introduction

The regulation of food intake is a particularly complex phenomenon that involves the interaction between the gastrointestinal tract, homeostatic control systems, the environment and circadian rhythms (Kulczykowska and Sánchez-Vázquez 2010). The circadian clock is a highly conserved, physiological timing mechanism that allows organisms to anticipate and adapt to daily changes in environmental conditions (Pittendrigh 1993). Most fish species present rhythms that are synchronised with the day-night cycle, primarily influenced by light (Kulczykowska and Sánchez-Vázquez 2010; Cavallari et al. 2011), but there is strong evidence that food availability can also affect circadian rhythms by influencing the synchronisation of certain physiological events. The theory is that when food is periodically restricted, feeding can act as a powerful synchronizer, or *zeitgeber*, of circadian rhythms in vertebrates. The result is an increase in locomotor activity before mealtimes, which is known as food anticipatory activity (Mistlberger 2009). In fish under culture, for example, it has been observed that scheduled feeding acts as a *zeitgeber* for this anticipatory activity (Boulos and Terman, 1980; Spieler, 1992; Mistlberger, 1994; Azzaydi et al. 2007; Mistlberger et al. 2009). As Davidson and Stephan (1999) illustrated, anticipatory activity involves not only behavioural and physiological changes, such as increased locomotor activity, but it can also result in metabolic changes, which allow these animals to optimize their digestive, assimilative and metabolic processes. So, anticipatory activity is the animal's physiological preparation for a recurring event – in this case, mealtimes (Sánchez et al. 2009) – which results in higher intake of food and enhanced use of nutrients (Strubbe and Van Dijk 2002), increasing the efficiency of the digestive system and food utilisation (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez 2009). The effects of feeding time on food intake and growth of farmed fish can be so important that the understanding of fish feeding behaviour is essential for improving food utilization. Optimal nutrition is expected if meals are well-formulated and designed to match the appetite of fish. Thus, during a study conducted on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), Azzaydi et al. (1999) observed that growth performance improved when meals were distributed to match the feeding rhythms of fish. In certain fish species of significant commercial interest, such as the gilthead sea bream (*Sparus aurata*), very little attention has been paid to their natural feeding rhythms, although considerable effort has been devoted to designing practical artificial diets. The energy needs of gilthead sea bream change throughout the day (Sánchez-Muros et al. 2003), with diurnal behaviour (Sánchez et al. 2009) and higher oxygen consumption rates during the daylight hours (Requena et al. 1997).

Sustainable aquaculture requires knowledgeable and effective management to monitor and respond to the effects of food quality and quantity, dietary alterations, feeding times and mealtime frequency. In this sense, voluntary food intake of gilthead sea bream has been described presenting daily rhythmic variations (Anthouard et al. 1996), and the modifications made to their feeding patterns (i.e., scheduled vs. random) affect their physiology (Sánchez et al. 2009). Sanchez-Muros et al. (2003) showed that when this species were fed once a day on demand it preferred the afternoon/evening period (with peaks at specific moments, between 7

pm and 8 pm) and with improved feed efficiency. Consequently, the same food ingested at different times of the day is absorbed with differing efficiencies causing variations in the use of both body energy reserves and dietary nutrients during the circadian rhythm (Madrid 1994).

Little is known about the immediate fate of ingested nutrients and how different diets, with different composition and quality of ingredients, can influence nutrients use. In most farmed fish, dietary proteins can be spared by increasing dietary lipid content (Brauge et al. 1995; Arzel et al. 1998; Company et al. 1999; Vergara et al. 1999). In gilthead sea bream, however, these high-energy and fatty diets can affect the product quality causing an excessive adiposity (Silva et al. 2006; Ozorio 2008) and health problems (Spisni et al. 1998; Ibarz et al. 2010). We have shown that protein deposition increases under conditions of increased physical activity, when part of the dietary energy source is provided by highly-digestible carbohydrates, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and in gilthead sea bream (Felip et al. 2012, 2013). So, if the activity of fish changes along the day, the assimilation, distribution, and use of nutrients should also change in accordance with the stages of their daily rhythm.

The impact of meal timing and diet composition on the use of nutrients in farmed fish is poorly understood. So, the aim of the present study are to determine the rates of assimilation and use of dietary nutrients in gilthead sea bream when diet composition change throughout the day (i. e., different diet composition at two daily mealtimes). To do that, we developed three feeding regimes based on two diets – a commercial diet (Cd), and a low-protein and high-carbohydrate experimental diet (Ed) – supplied at two feeding times per day (at 10 am and at 5 pm). These feeding regimes were Cd/Cd; Cd/Ed, and Ed/Cd. The use of labelled ¹⁵N-protein and ¹³C-starch served us to trace the fate of these dietary nutrients (protein and starch), as it was demonstrated in previous experiments (Felip et al. 2012, 2013). To study the effect of mealtime and the possible presence of a daily rhythm in nutrients use, we performed two postprandial experiments of one forced meal, corresponding to the two mealtimes: at 10 am (post-feeding experiment 1, PF-1 for now onward) and 5 pm (post-feeding experiment 2, PF-2). The retention and allocation of both ¹⁵N and ¹³C isotopes in the main organs and tissue components were measured during the two PF1 and PF2 experiments, and our results demonstrate that dietary protein content was reduced without affecting growth rate because of higher protein retention, and that the proportion of non-protein fuels used changed with the daily activity of the fish.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design and sampling

Juveniles of gilthead sea bream (body weight: 20-22 g) from a local fish farm were acclimated in the facilities of the Faculty of Biology (University of Barcelona, Spain) at a temperature of 24°C, a photoperiod of 12L/12D, and in full-strength seawater in 400 L tanks equipped with a semi-closed recirculation system with physical and biological filters, ozone skimmers and continuous aeration, and with a weekly seawater renewal rate of 35%. Water parameters such as temperature, oxygen content, pH, nitrite and nitrate content were recorded daily. Fish were

weighed and randomly distributed into three experimental groups (with 3 tanks per group) and fed twice a day with a total quantity representing 2.6% of body weight. This ration was near to satiety (determined by visual observation) and 60% of the daily food allowance was provided at 10 am, and 40% at 5 pm. There were three different feeding regimes based on a combination of two diets. The first diet was a commercial feed from Skretting 2mm-pellet (Spain) with 48% protein, 20% lipids, 19.5% extract free of nitrogen (NFE), and 19.5 MJ/kg of digestible energy, hereafter identified as Cd. The second diet, identified as Ed, was an experimental diet with 37.1% protein, 12.5% lipids, 40% high-digestible carbohydrates, and 19.3 MJ/kg digestible energy (Table 1). The three feeding regimes were as follows: Cd/Cd, Cd/Ed, and Ed/Cd, with meals provided at 10 am and 5 pm, respectively (i.e. am/pm) (see Figure 1 for details).

Table 1. Composition of commercial and experimental diets.

	Cd^a	Ed^b
Protein^c	48	37.1
Lipid^c	20	12.5
NFE^c	19.5	
High-digestible CH^c		40
Dig. Energy (MJ·Kg⁻¹)	19.5	19.3
Essential AA (g·Kg⁻¹)		
ARG	29.7	19.8
HIS	13.1	10.1
ILE	19.3	13.3
LEU	40.7	25.9
LYS	26.9	24.1
MET	6.6	6.3
PHE	25.4	14.6
THR	18.4	14.1
VAL	22.7	16.0
ΣE AA/ΣNE AA	0.76	0.88

^a Cd diet: D-2 EXCEL 1P from Skretting (2.5mm pellet diameter). Composition: fish meal, fish oil, soy flour non-GMO, wheat, soybean oil, vitamins and minerals.

^b Ed diet ingredients and additives: fish meal 450g/kg, fish oil 70g/kg, gelatinized wheat starch 470g/kg, vitamins 10g/kg and minerals. Crude fibre 1.7% DM and total ashes 8.5% DM.

^c values are in percentage of dry matter.

One week before the post-feeding experiments, all the fish were anaesthetised and then tagged with a passive integrated transponder (PIT) tag (Trovan Electronic Identification Systems, Madrid, Spain) near the dorsal fin so that each individual could be identified and monitored during the post-feeding experiments. After 56 days (8 weeks) of submit the fish to the corresponding feeding regime (Regimes Period), two postprandial trials (Post-Feeding Trials) were carried out to analyse the fate of one forced meal (with the corresponding diet for each group) labelled with two stable isotopes: 3% algal ¹³C-starch and 1% *Spirulina* ¹⁵N-protein. Isotope materials (>99% purity) were purchased at Martek Biosciences Corporation (Columbia, MD, USA). One post-feeding study was carried out for the meal provided in the morning (PF1,

n=54; 18 fish per diet) and another post-feeding study was carried out in the afternoon (PF2, n=54; 18 fish per diet), meaning the fish received the labelled food at 10 am or at 5 pm, respectively, and the sampling times correspond to the moment of the other meal of the day and after 24 hours. The fish were lightly anaesthetised and force-fed a labelled-food bolus equivalent to a 1% portion of the corresponding diets. This was delivered through a gastric cannula. After the bolus had been administered, the fish were held for a few minutes in separate tanks to establish whether the forced meal had been entirely accepted. If any of the fish showed signs of regurgitation, they were disqualified and replaced. The amount of food ingested by each fish was recorded and used for correcting the results (and expressed as a percentage of the ingested isotope). Then, the fish were returned to their respective tanks until sampling. On PF1, nine fish from each group were deeply anaesthetised and killed by sectioning the spinal cord at 5 pm (7 hours post-feeding) and another nine fish at 10 am (24 h post-feeding), coinciding with feeding times (Figure 1). Similarly for PF2, another nine fish from each group were killed at 10 am (17 h post-feeding) and nine at 5 pm (24 h post-feeding) (Figure 1). In each experiment, two fish from each group – making a total of 24 fish – received the same amount of diet containing similar proportions of non-labelled *Spirulina* protein and algal starch. They were used to measure natural abundances of ¹⁵N and ¹³C in each sample type (blank values).

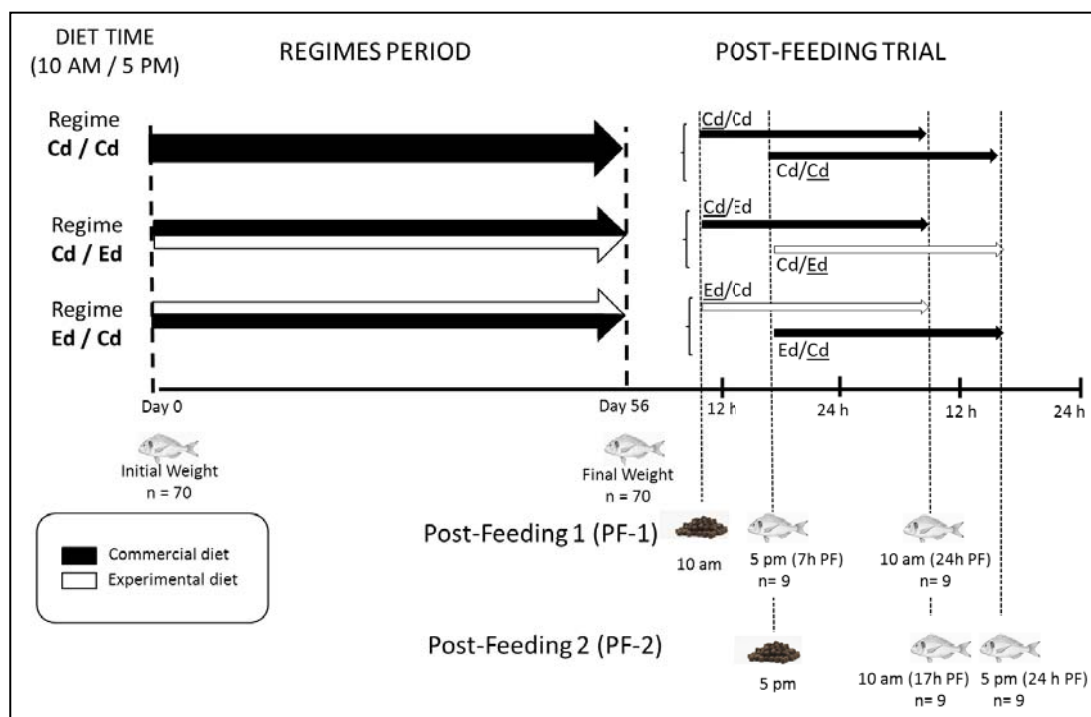


Figure 1. Schedule of experimental design. “Regimes period” extended for 8 weeks where each group were fed twice a day (10 am/5 pm) the corresponding diet (Cd/Cd, Cd/Ed, Ed/Cd). “Post-Feeding trial” is distributed as PF1, when fish were force-fed in the morning (10 am) and PF2, when fish were force-fed in afternoon (5 pm). Underlined diets indicate the supplied food for each regime and PF. Fish symbols indicate sampling times and number of fish (n). Further details are explained in the Materials and Methods section.

Final body weights, standard lengths, and somatic indexes for liver, muscle and perivisceral fat were recorded. Blood samples were extracted from caudal vessels using EDTA-Li as anticoagulant, and plasma was obtained by centrifuging the blood at 13,000 g for 5 min at 4°C, which was then kept at -80°C until analysis. The tissues analysed were liver (whole organ), two pieces of white muscle (epaxial, near the dorsal fin) and red muscle (under the skin, near the lateral line), and viscera (gut plus perivisceral fat). They were rapidly excised and frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until analysis, together with the rest of the fish. The entire sampling procedure took less than 1.5 minutes from the moment the fish was killed, and the tissues with a fast glycogen hydrolytic capacity, such as muscles, were frozen first. Plasma samples were used for glucose, lipid fractions (non-esterified fatty acids, triacylglycerols, phospholipid and cholesterol) and protein analysis. Tissue samples were used to analyse their main components (glycogen, lipid and protein contents) and to measure dietary ¹³C and ¹⁵N incorporation both in the whole tissue samples and in the tissue components.

2.2. Analytical procedures

Plasma levels of glucose, triacylglycerides (TAG), phospholipids (PL), total cholesterol (TC) and non-esterified fatty acids (NEFA) were analysed using commercial kits (from Spinreact, Girona, Spain and Wako Chemicals, Neuss, Germany) and measured in triplicate in pre-diluted plasma, using an endpoint colorimetric assay, following the manufacturer's instructions for each piece of kit. Plasma concentrations are expressed as mM (glucose), mg of lipid fraction per dL (TAG, PL, TC) and mEq/L (NEFA). Plasma total protein, expressed as mg of protein per mL, was determined following the Bradford (1976) method using bovine serum albumin as the standard. Tissue samples of liver, white and red muscles and viscera were homogenised in liquid N₂ using a pestle and mortar to obtain a fine powder, while the rest of the fish was homogenised at -20°C using a food homogeniser (Pacojet AG, Zug, Switzerland). Aliquots of each sample were taken for use in isotopic analyses and to assess the lipid, protein, glycogen and water content of the samples. The water content of tissue samples was determined gravimetrically after drying the samples at 95°C for more than 24 h. Lipids were extracted as described by Folch et al. (1957), and the washed lipid extracts were dried under N₂ atmosphere then determined gravimetrically. Total protein was purified from defatted tissue samples via precipitation with 10% (v/v) trifluoroacetic acid. The extracts were dried with a vacuum system (Speed Vac Plus AR, Savant Speed Vac Systems, South San Francisco, CA, USA) and the protein content was calculated from the total N content obtained by elemental analysis (Elemental Analyser Flash 1112, ThermoFinnigan, Bremen, Germany), assuming 1 g of N for every 6.25 g of protein. Glycogen was extracted and purified from tissues following alkaline hydrolysis with boiling 30% KOH and an alcoholic precipitation, as described by Good et al. (1933). Glycogen content was then assessed using the anthrone colorimetric method described by Fraga (1956).

2.3. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ determination in tissues

Total ¹³C enrichment was measured in tissue samples and in the purified tissue extract components (glycogen, lipid and protein), while ¹⁵N-enrichment was measured in the whole

tissue and in the protein fraction. To measure enrichment, dried samples of fish from each of the two diets and five tissues, plus the purified glycogen, lipid, and protein fractions of each tissue, were lyophilised and ground using a mortar until a very fine, homogeneous powder was achieved. Aliquots ranging from 0.3000 to 0.6000 mg were accurately weighed in small tin capsules (3.3-5 mm, Cromlab, Barcelona, Spain) and analysed for C and N isotope compositions using a Mat Delta C isotope-ratio mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) coupled to an Elemental Analyser (Flash 1112) at the Scientific Services of the University of Barcelona, SCT-UB. The EA-IRMS burned the samples and converted them into gas (N₂ and CO₂) and transported them through a continuous helium flux to determine the carbon and nitrogen content (as a percentage) in the samples. Isotope ratios (¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N) in the samples were compared with the reference gases (N₂ and CO₂) and were expressed on a relative scale as deviation, referred to in delta (δ) units with the notation ‰, parts per thousand, relative to the isotope ratio content of international standards (Pee Dee Belemnite a calcium carbonate, for C and air for N).

Delta values were determined with the equation:

$$\delta = [(R_{sa}/R_{st}) - 1] \cdot 1000$$

where R_{sa} = ¹⁵N/¹⁴N or ¹³C/¹²C of samples, and R_{st} = ¹⁵N/¹⁴N or ¹³C/¹²C of international standards. The same reference material analysed over the analysis period was measured with approximately 0.2 ‰ precision for materials presenting natural abundance and approximately 0.4 ‰ precision for the isotope-enriched materials. The δ values are expressed as atom percentage (at %):

$$^{13}\text{C at \%} = 100 \cdot (^{13}\text{C} / (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}))$$

$$^{15}\text{N at \%} = 100 \cdot (^{15}\text{N} / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N}))$$

The net enrichments (atom percentage excess or APE) in ¹³C and ¹⁵N of glycogen, lipid, and protein fractions, and in the tissue, were calculated by the difference between the at% of samples and their corresponding blank at % values:

$$\text{APE} = \text{at \% sample} - \text{at \% blank.}$$

Finally, using the values of APE, molecular weight and Avogadro's number, the results were expressed as a percentage of the ingested dose (g/100g ¹³C or ¹⁵N ingested) in each tissue fraction (glycogen, lipid and protein), calculated as:

$$100 \cdot ((\text{g}^{13}\text{C or }^{15}\text{N/g t.fr.}) \cdot (\text{g t.fr./g tissue}) \cdot (\text{g tissue/g b.w.}) / (\text{g ingested }^{13}\text{C or }^{15}\text{N/g b.w.}))$$

(1)

where t.fr. is the tissue fraction, and b.w. is body weight. The enrichment of the free pool of each tissue was calculated as the difference between isotope levels in the entire organ, or tissue, and the sum of the three tissue fractions. Therefore, the measurement of an entire organ, or tissue, represents the sum of all fractions (Eq. (1) + free pool) for ^{13}C or ^{15}N . For the whole fish, enrichment was calculated as the sum of all entire organs or tissues (total liver, total muscle mass, viscera and the rest of the fish) for ^{13}C or ^{15}N . For liver and viscera, the exact mass of the total tissue sample was measured by weighing the entire individual organs from each fish. In the case of muscles, however, accurate dissections of another ten fish from each group maintained under the same regime were carried out to estimate total muscle mass. The resulting muscle-somatic index obtained (g muscle/100g body weight) indicated values of 33.8 ± 2.20 for WM and 2.3 ± 0.11 for RM; there were no significant differences between the three groups.

2.4. Statistics

Data for all parameters are presented as mean \pm standard error of the means (s. e. m). Results from each variable of each PF experiment were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA). The two independent factors were the feeding regime (Cd/Cd, Cd/Ed, and Ed/Cd) and the moment the fish were sampled (10 am and 5 pm). At the same time, these two moments of the day correspond to the mealtimes. The samples obtained after 24h post-feeding from both PF1 (at 10 am) and PF2 (at 5 pm) were compared using a two-way ANOVA for which the factors were also regime (R), and the moment of the daily rhythm (D). The interaction between the two factors, if it was significant, is identified as RxD. When a significant difference was detected for the regime factor, a post-hoc analysis across the three groups was carried out using the Tukey's test. Statistical analyses were performed using SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) and all differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Fish were fed twice a day; once at 10 am and once at 5 pm. The total amount of food received each day represented 2.6% of their body weight. At 10 am, they received a quantity representing 1.6% of their body weight and at 5 pm, they received a quantity representing 1% of their body weight. All the animals were divided into three groups with each one receiving a different diet combination. The regimes were: Cd/Cd, Cd/Ed, and Ed/Cd. As Table 2 shows, while the diet change in each regime resulted in minor differences of the total energy supplied to gilthead sea bream each day, the energy assimilated at the end of the day came from different proportion of nutrients supplied at different moments of the day. After 8 weeks, at the end of the growth period, final body weight varied significantly (Table 3), being the group that were fed on the regime Cd/Ed 10% lower than the body weights of the other two groups. The specific growth rate followed the same trend, although it was not significant because of it was calculated from triplicates.

Table 2. Daily dietary nutrient and energy intakes for gilthead sea bream fed a ration of 2.6% b. w. on the three regimes.

Meals (%) Hour	1.6			1.0		
	10:00 am			5:00 pm		
	Regimes	Cd/Cd	Cd/Ed	Ed/Cd	Cd/Cd	Cd/Ed
Protein ^a	0.77	0.77	0.59	0.48	0.37	0.48
Lipid ^a	0.32	0.32	0.20	0.20	0.13	0.20
CHO ^a	0.31	0.31	0.64	0.20	0.40	0.40
Energy ^b	0.31	0.31	0.31	0.195	0.193	0.193

Daily ingesta Regimes	Total (for 24 h)			Nutrient (in % of Cd/Cd)		
	Cd/Cd	Cd/Ed	Ed/Cd	Cd/Cd	Cd/Ed	Ed/Cd
Protein	1.25	1.14	1.07	100	91.3	86
Lipid	0.52	0.45	0.40	100	85.6	76.9
CHO	0.51	0.71	0.84	100	140.4	164.7
Energy	0.51	0.41	0.50	100	99.6	99.4

^a nutrient intake expressed as g/100g body weight^b Energy units: kJ/100g fish body weight**Table 3.** Fish body weight and growth rate of gilthead sea bream fed at 2.6% from three different regimes.

Dietary regime	Cd/Cd	Cd/Ed	Ed/Cd
Initial weight (g) [*]	21.2 ± 0.5	21.3 ± 0.2	21.9 ± 0.2
Final weight (g) [*]	42.5 ± 0.7 ^a	38.2 ± 0.7 ^b	41.4 ± 0.8 ^a
SGR% ⁺	1.20 ± 0.03	1.03 ± 0.09	1.13 ± 0.06

Values are mean ± sem. N = 70 fish per group.

^{*} Values of each regime are from triplicate tanks.Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

It is important to signal that all fish were well adapted to their new diets under the specific feeding regimes before the response of gilthead sea bream to those eating habits was assessed in the two post-feeding experiments, PF1 and PF2. Thus, the results captured not only the short-term physiological effects (i.e. within 24 h) in relation to the last meal eaten, but also the metabolic changes caused in the fish by the different feeding regimes. Figure 2 includes plasma post-feeding levels of glucose and triacylglycerides, revealing differences in the transit and assimilation of both nutrients depending on the most recently consumed meal. As shown, plasma glucose levels of gilthead sea bream fed Ed increased at 5 pm (7 h post-feeding), reaching levels that were twice as high as those seen in fish fed Cd. Similarly, plasma triacylglycerides levels in fish receiving Cd as the last meal were twice as high as those of fish fed Ed. In both PF trials, no significant differences were found for plasma levels of NEFA (ranged: 07-0.9 mEq/L), phospholipids (700-800 mg/dL), total cholesterol (200-250 mg/dL) or protein (15-20 mg/mL).

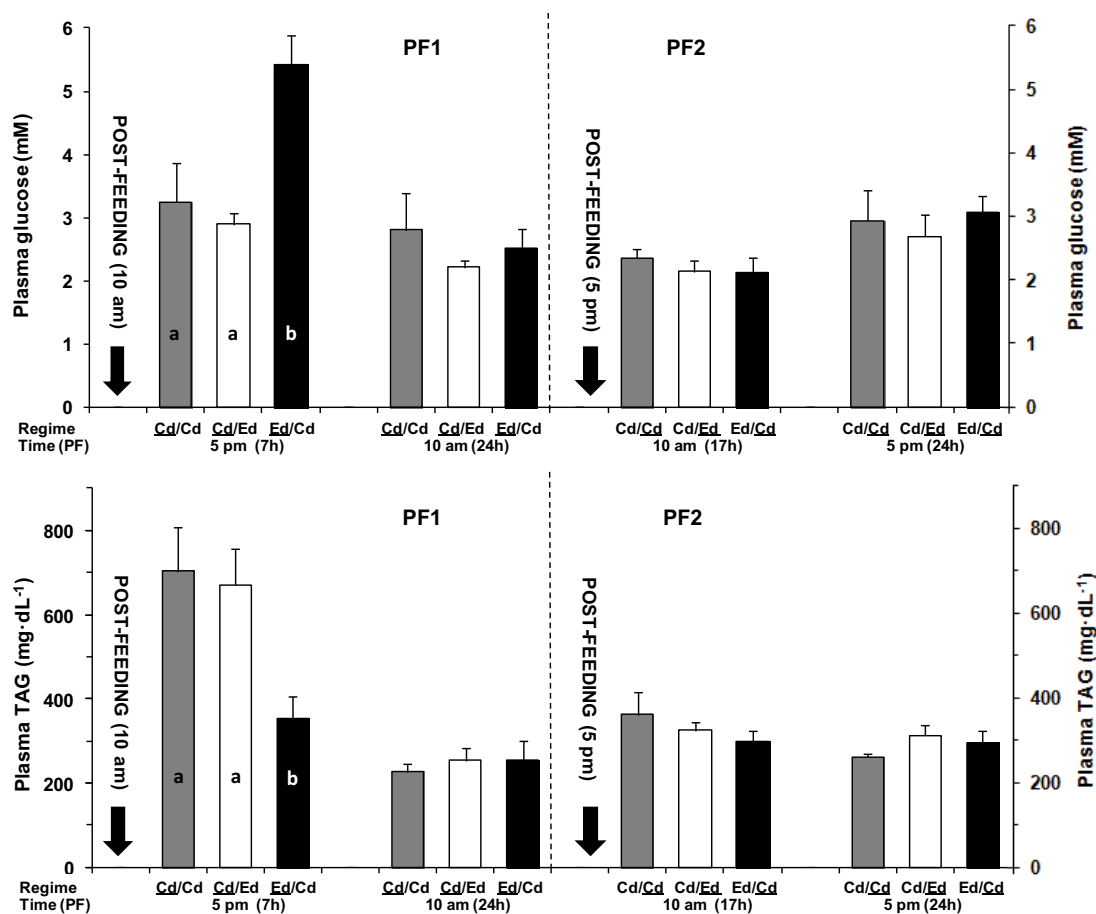


Figure 2. Post-feeding plasma levels of glucose (mM) and triacylglycerides (mg·dL⁻¹) of gilthead sea bream subjected to three different regimes, Cd/Cd (grey colour), Cd/Ed (white colour and Ed/Cd (black colour), after 7 hours (5 pm) and 24 h (10 am) post-feeding on the left for the PF1 and after 17 h (10 am) and 24 h (5 pm) post-feeding on the right for the PF2. The last meal received by post-feeding is underlined and values are means, with their standard errors represented by vertical bars (n=9 for each regime). Significant differences between regimes ($p < 0.05$) are indicated by different letters.

Tissue composition of liver, and white and red muscles at 10 am and 5 pm after 24 hours post-feeding, for both PF1 and PF2, are summarised in Table 4. The fish on the groups receiving Ed diet showed higher deposition of glycogen in the liver, increasing hepatosomatic index significantly (regime factor: $R = 0.007$). No differences were observed for the two time intervals within each post-feeding, but the comparison between PF1 and PF2 values after 24 hours revealed differences in the hepatic protein content (daily rhythm factor: $D = 0.005$, Table 5), with higher levels observed at 10 am than at 5 pm (see Table 4). Daily rhythmicity was also observed in the protein content of the two muscles ($D = 0.042$ for WM and $D = 0.007$ for RM, Table 5), with lower levels observed in the morning (10 am) than in the afternoon (5 pm), whereas the glycogen stores followed the inverse trend.

Table 4. Hepatosomatic index and liver, white muscle and red muscle compositions of gilthead sea bream fed on the three regimes and the two postprandial sampling points (PF1 and PF2).

	PF1 ^a	Regime			Stat ^b	PF2 ^a	Regime			Stat ^b
		Cd/Cd	Cd/Ed	Ed/Cd			Cd/Cd	Cd/Ed	Ed/Cd	
LIVER										
HSI	5 pm (7h)	2.6 ± 0.19	3.0 ± 0.19	2.6 ± 0.16	R	10 am (17h)	2.2 ± 0.15	2.8 ± 0.16	2.3 ± 0.31	R
(% b.w.)	10 am (24h)	2.1 ± 0.12	3.0 ± 0.24	2.7 ± 0.14		5 pm (24h)	2.1 ± 0.08	2.9 ± 0.19	2.5 ± 0.21	
Glycogen	5 pm (7h)	8.8 ± 0.50	11.2 ± 0.87	10.7 ± 0.83	R	10 am (17h)	10.9 ± 0.29	13.4 ± 0.45	10.6 ± 0.43	R
(% w.w.)	10 am (24h)	8.5 ± 0.69	11.1 ± 0.48	10.9 ± 0.66		5 pm (24h)	10.0 ± 0.54	14.5 ± 0.70	10.2 ± 1.23	
Protein	5 pm (7h)	9.4 ± 0.34	8.2 ± 0.27	9.4 ± 0.26	R	10 am (17h)	8.7 ± 0.20	8.1 ± 0.30	8.7 ± 0.37	R
(% w.w.)	10 am (24h)	10.3 ± 0.40	9.0 ± 0.20	9.1 ± 0.49		5 pm (24h)	10.0 ± 0.31	7.4 ± 0.33	8.5 ± 0.22	
Lipid	5 pm (7h)	14.2 ± 1.07	11.5 ± 1.10	10.4 ± 0.70	R	10 am (17h)	13.0 ± 0.73	11.4 ± 1.05	12.9 ± 0.91	R H
(% w.w.)	10 am (24h)	12.2 ± 1.76	11.5 ± 0.70	11.7 ± 1.24		5 pm (24h)	10.6 ± 0.45	9.7 ± 0.78	11.2 ± 0.71	
WM										
Glycogen	5 pm (7h)	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.04	0.4 ± 0.02	R	10 am (17h)	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02	R
(% w.w.)	10 am (24h)	0.4 ± 0.03	0.3 ± 0.05	0.4 ± 0.03		5 pm (24h)	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.04	
Protein	5 pm (7h)	19.2 ± 0.41	19.6 ± 0.40	19.8 ± 0.43	R	10 am (17h)	19.6 ± 0.41	19.8 ± 0.37	19.5 ± 0.29	R
(% w.w.)	10 am (24h)	19.1 ± 0.31	19.5 ± 0.62	18.7 ± 0.17		5 pm (24h)	19.8 ± 0.38	19.6 ± 0.40	19.7 ± 0.49	
Lipid	5 pm (7h)	8.1 ± 0.77	7.9 ± 1.32	4.6 ± 0.48	R	10 am (17h)	4.1 ± 0.47	5.0 ± 0.51	6.5 ± 0.54	R
(% w.w.)	10 am (24h)	6.1 ± 0.91	6.8 ± 1.22	5.6 ± 0.60		5 pm (24h)	4.7 ± 0.49	6.3 ± 1.20	7.0 ± 0.68	
RM										
Glycogen	5 pm (7h)	0.7 ± 0.06	0.7 ± 0.11	0.7 ± 0.08	R	10 am (17h)	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.03	R H
(% w.w.)	10 am (24h)	0.7 ± 0.10	0.5 ± 0.07	0.7 ± 0.09		5 pm (24h)	0.5 ± 0.08	0.6 ± 0.07	0.4 ± 0.08	
Protein	5 pm (7h)	9.3 ± 0.56	9.8 ± 0.64	10.4 ± 0.27	R	10 am (17h)	10.2 ± 0.69	9.3 ± 0.69	11.7 ± 0.29	R H
(% w.w.)	10 am (24h)	10.3 ± 0.51	10.5 ± 0.36	10.3 ± 0.66		5 pm (24h)	11.4 ± 0.88	11.5 ± 0.61	12.4 ± 0.35	
Lipid	5 pm (7h)	36.0 ± 1.68	35.9 ± 2.08	32.3 ± 1.95	R	10 am (17h)	37.7 ± 1.33	30.8 ± 2.42	32.1 ± 1.36	R H
(% w.w.)	10 am (24h)	32.8 ± 2.56	32.0 ± 1.60	30.3 ± 2.05		5 pm (24h)	28.9 ± 2.42	33.5 ± 4.17	30.7 ± 2.12	

Values are mean ± sem. b. w. = body weight; w. w. = wet weight.

^a PF1 Postprandial experiment begun at 10 am; PF2 postprandial experiment begun at 5 pm. Inside parenthesis, hours after force-feeding.

^b Two-way ANOVA of data from PF1 and PF2: R as regime factor, H as hour factor and RxH as interaction.

Table 5. Regime, daily rhythm and interaction *p* values of liver and muscles composition in gilthead sea bream.

	R	D	RxD
HSI	0.001	ns ^a	ns
Liver			
Glycogen	0.002	ns	ns
Protein	0.000	0.005	ns
Lipid	ns	ns	ns
White muscle			
Glycogen	ns	0.035	ns
Protein	ns	0.042	ns
Lipid	ns	ns	ns
Red muscle			
Glycogen	ns	0.046	0.032
Protein	ns	0.007	ns
Lipid	ns	ns	ns

Significance levels of two-way ANOVA (factors: regime R and daily rhythm D) of samples from the two post-feeding experiments after 24 hours. Data are referred on Table 4.

^a ns no significant.

To determine the nutrient distribution, stable isotopes retention were analysed in whole organs and tissue fractions after one forced meal labelled with 3% ¹³C-starch and 1% ¹⁵N-protein administered at 10 am (PF1) or at 5 pm (PF2). The fate of dietary starch can be monitored from the allocation of ¹³C in tissue samples at the two post-feeding times for both PF1 and PF2, as is shown in Figure 3. Significantly higher total recovery of ¹³C was observed in the PF1 samples of fish receiving the Cd diet as their last meal, compared to fish fed Ed at both 5pm or at 10 am. The levels of ¹³C recovery in the livers sampled at 5 pm in PF1 of the two groups fed with Cd diet (i.e., Cd/Cd vs Cd/Ed) were different. As shown in Figure 4, these differences indicate that recovery is lower when fish were from the Cd/Ed regime. Remarkably, ¹³C-starch deposited in liver as glycogen was 3 times higher (*p*<0.05) in PF1 samples of fish fed Cd/Cd, although the last meal received was the same (Cd) for both groups. Similarly, the ¹³C recovery in the liver at 24 hours post-feeding was lower in regimes containing the Ed diet, regardless of whether it was supplied morning or afternoon (i.e. Cd/Ed or Ed/Cd), and this trend was consistent in all liver fractions.

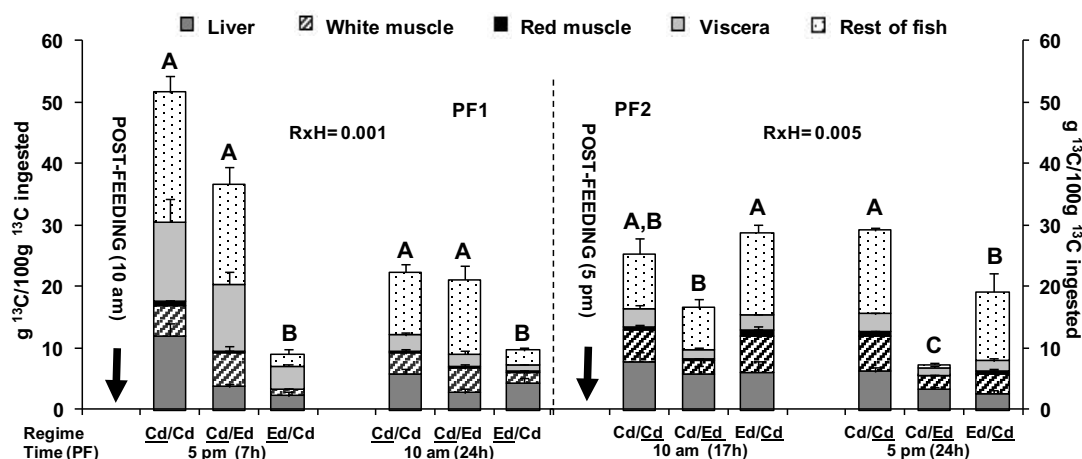


Figure 3. Recovery of ¹³C (as a percentage of ingested isotope) from entire organs or tissues (liver (■), white muscle (▨), red muscle (■), viscera (▨) and the rest of the fish (□)) of gilthead sea bream subjected to three different regimes (Cd/Cd, Cd/Ed, Ed/Cd) after 7 h (5 pm) and 24 h (10 am) post-feeding on the left for the PF1 and after 17 h (10 am) and 24 h (5 pm) post-feeding on the right for the PF2 (see the Materials and Methods section for details of the calculations). The last meal received by post-feeding is underlined and values shown are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n=9$ for each regime). Significant differences between regimes ($p < 0.05$) are indicated by different letters. Two-way analysis of variance of data from PF1 and PF2: R as regime factor, H as hour factor and RxH as interaction.

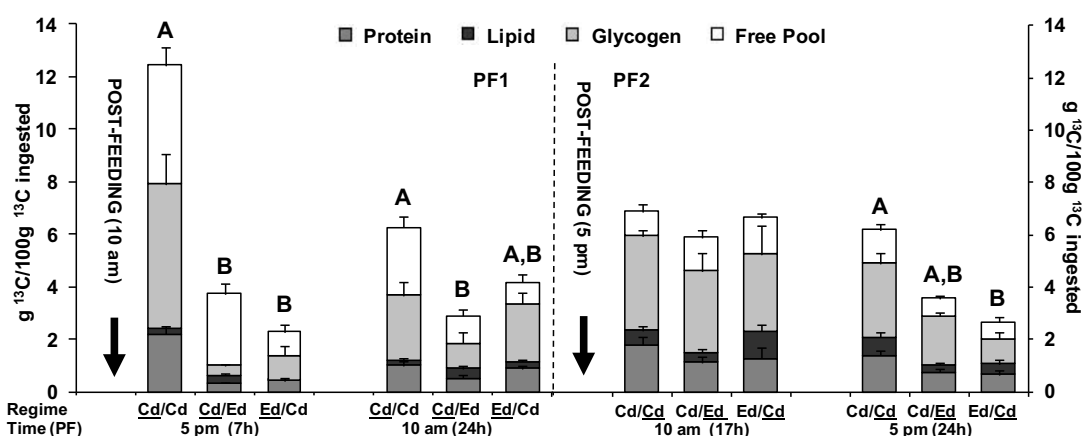


Figure 4. Total ¹³C recovery in the main components of liver (as a percentage of ingested isotope); protein (■), lipid (■), glycogen (▨) and free pool (□) of gilthead sea bream subjected to three different regimes (Cd/Cd, Cd/Ed, Ed/Cd) after 7 hours (5 pm) and 24 h (10 am) post-feeding on the left for the PF1 and after 17 h (10 am) and 24 h (5 pm) post-feeding on the right for the PF2 (see the Materials and Methods section for details of the calculations). The last meal received by post-feeding is underlined and values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n=9$ for each regime). Significant differences between regimes ($p < 0.05$) are indicated by different letters.

Figure 5 shows the recovery levels of dietary ¹⁵N-protein into the protein fraction of white muscle of both PF1 and PF2 studies. The results of the PF1 experiment reveal an inverse relationship between protein intake (see Table 2) and ¹⁵N recovery in the protein fraction of white muscle. Thus, the highest levels of ¹⁵N-protein retention were seen in the group that consumed the Ed diet (low in protein and high in carbohydrates) in the morning as their last meal (i.e. the Ed/Cd group). Interestingly, levels of ¹⁵N recovery were lower in muscle protein samples from fish in the PF2 experiment that consumed the Ed/Cd regime, although the last meal was the commercial diet. This reveals that protein is continuously metabolised and that there was an extra short-term fasting in these fish, especially in those fed the Ed/Cd regime, because they did not receive the second meal of the day during the postprandial experiments.

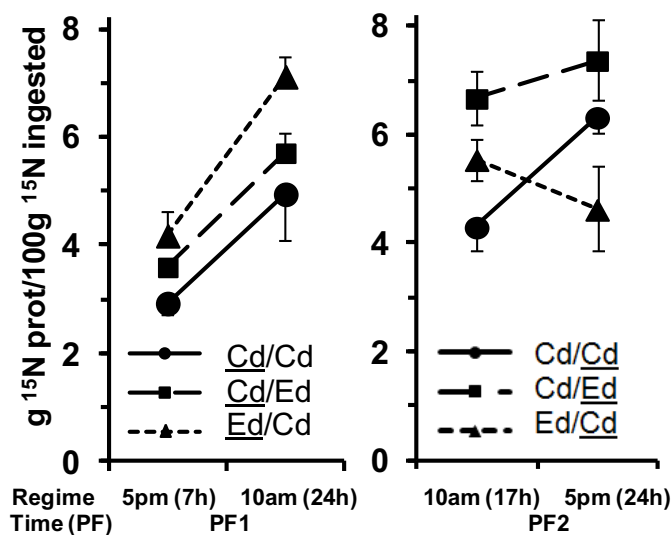


Figure 5. Recoveries of ¹⁵N in the protein fraction of white muscle in both postprandial studies; PF1 (7 hours (5 pm) and 24 h (10 am) hours post-feeding) on the left and PF2 (17 h (10 am) and 24 h (5 pm) hours post-feeding) on the right, in gilthead sea bream subjected to three different regimes (Cd/Cd, Cd/Ed, Ed/Cd). The last meal received by post-feeding is underlined and values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n=9$ for each regime).

Figure 6 shows the values of the total ¹⁵N recovery from dietary protein in gilthead sea bream in the whole fish and tissues analysed at 24 h post-feeding. The ¹⁵N recovery levels in the main organs and in the whole fish increased when protein ingested decreased, similarly to what has been observed in white muscle. The total amount recovered in fish in the Ed/Cd regime in PF2 did not differ from that of Cd/Cd regime, indicating that mobilized protein from the total muscle mass in the first group (indicated before) was still into the fish after 24 h post-feeding. Surely, it did not occur during a normal situation with the fish receiving two meals per day.

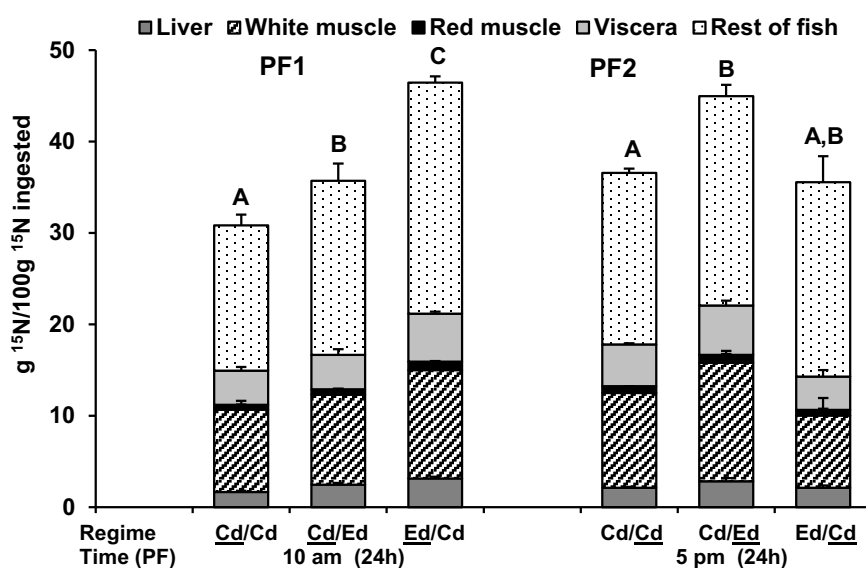


Figure 6. Recovery of ¹⁵N (as a percentage of ingested isotope) from entire organs or tissues (liver (■), white muscle (▨), red muscle (■), viscera (□) and the rest of the fish (▤)) of gilthead sea bream subjected to three different regimes (Cd/Cd, Cd/Ed, Ed/Cd) after 24 h (10 am) post-feeding on the left for the PF1 and after 24 h (5 pm) post-feeding on the right for the PF2 (see the Materials and Methods section for details of the calculations). The last meal received by post-feeding is underlined and values are means, with their standard errors represented by vertical bars ($n=9$ for each regime). Significant differences between regimes ($p<0.05$) are indicated by different letters.

4. Discussion

Feeding time must have major effects on food intake and growth of farmed fish, and matching it with appropriate food composition and fish appetite should result in optimum feeding regimes. When daily food delivery is distributed over several meals and adjusted to suit the feeding rhythms of fish, rather than equally sized meals, growth performance can be improved (Azzaydi et al. 1999). We observed that the combined effects of a low-protein, carbohydrate-rich diet (Ed) distributed over a month period in the morning and afternoon, reduced the daily intake of dietary protein in Ed/Cd and in Cd/Ed. However, the fish in the group receiving the Ed diet in the afternoon grew significantly less than fish in the other groups, indicating a differential effect of feeding times and diet composition on sea bream growth rate. As Carter et al. (2001) described, growth changes caused by the physiological effects of feed intake can be seen after only 4 weeks, meaning that the present study was long enough to reveal measurable differences in growth rate.

Previous studies have linked plasma parameters and feeding time in gilthead sea bream. Montoya et al. (2010) and Gómez-Milán et al. (2011) observed the highest glycaemia levels between 7 and 10 h after the usual feeding time in gilthead sea bream, indicating that daily variations in blood glucose levels are strongly influenced by feeding time. The plasma glucose and triacylglyceride levels observed in the present study were strongly influenced by diet

composition. Glucose levels in fish fed Ed were twice as high as those fed Cd (and vice versa for triacylglycerides) after only 7 hours PF. Previous research has revealed that being fed a diet containing relatively high levels of digestible carbohydrate and lipids leads to an increase in concentrations of glucose and triacylglycerols in the plasma of rainbow trout (Brauge et al. 1994, 1995). The increased glucose levels observed in the present study in the plasma of gilthead sea bream at 7 h post-feeding is consistent with data published (Gutiérrez et al. 1984; Laidley and Leatherland 1988). Montoya et al. (2010) and Gómez-Milán et al. (2011) suggest that plasmatic glucose content is of endogenous origin, likely due to an increase in cortisol-mediated gluconeogenesis. However, this was not the case in the present study because the carbohydrate-rich diet also had low protein content. Thus, fish receiving the experimental diet (Ed) as their last meal were able to assimilate and distribute the overload of dietary carbohydrates – which is consistent with previously reported data (Felip et al. 2013) – without the need to maintain the hyperglycemia reported for other fish species such as rainbow trout (Kaushik and Oliva-Teles 1985; Brauge et al. 1994). Fast transition of hyperglycaemia and lower deposition in liver glycogen after 24 h for fish receiving the experimental diet indicate that the oxidative use of carbohydrates must be increased in both Cd/Ed and Ed/Cd regimes, although clear differences were observed between the two. Similarly, López-Olmeda et al. (2009) described for the first time a change in daily rhythm related to tolerance levels of carbohydrate ingestion in a teleost fish (goldfish *Carassius auratus*) highlighting the impact of mealtimes on glucose metabolism.

It is well documented that fish subjected to a long-lasting nutritional regime display recurring physiological changes that are repeated in 24 hour cycles (reviewed by Carter et al. 2001). The results from the isotope distributions of both PF experiments, and of tissue composition, confirm the existence of a daily rhythm of deposition of reserves in gilthead sea bream. There are two specific pieces of evidence: regardless of the feeding regimes to which the fish were subjected, liver composition of gilthead sea bream differed between 10 am and 5 pm, with glycogen levels increasing and protein content decreasing in the afternoon; there was also a clear contrast in the composition of red and white muscles between 10 am and 5 pm, with glycogen levels decreasing and protein content increasing in the afternoon. Although we have not found other studies on this subject in fish, Polakof et al. (2007) reported that liver protein content decreases in rainbow trout in the afternoon with the decreased catabolism of amino acids in fish fed at night.

Tissue stores were clearly different in gilthead sea bream depending on the feeding regime. Thus, increased glycogen deposition in liver and higher hepatosomatic index were found in both groups receiving the carbohydrate-rich diet, and they were especially prevalent in fish fed Ed diet in the afternoon. From our knowledge, there are no other studies linking the importance of feeding strategies, such as the time schedule of meals, with increasing levels of dietary carbohydrates. The desired effect of carbohydrates starving dietary protein for growth, however, remains in dispute, particularly in marine species (see Enes et al. 2011 for review). We observed that gilthead sea bream subjected to increased aerobic physical activity

(moderate and sustained swimming for one month) increases the use of carbohydrates and lipids as energy fuels promoting increased retention of dietary protein (Felip et al. 2013). In the present study, post-feeding distribution of the two isotopically-labelled nutrients – proteins and starch – revealed that their use was dependent on the diet composition and the moment of the day when fish were fed. After 24 h, lower total ¹³C retentions from ¹³C-starch were observed in both groups fed the carbohydrate-rich, low-protein diet as the last meal. These groups were Ed/Cd for PF1, and Cd/Ed for PF2, and it indicates higher use of carbohydrates for energy when they represent a large proportion of the diet. Panserat et al. (2000), Caseras et al. (2002) and Metón et al. (2004) reported higher activities of several hepatic glycolytic enzymes in gilthead sea bream feeding on high levels of dietary carbohydrates.

The distribution of ¹³C reflected that of dietary carbohydrates, and it showed marked differences, mainly in liver, between both groups fed with the Ed diet under different regimes (Ed/Cd vs Cd/Ed). Total ¹³C recovery seen in PF1 in lipid, protein, glycogen and free pool fractions of the liver at 5 pm (or 7 h post-feeding), as well as in the total liver mass at 24 hours (10 am), were lower in these groups than the recovery levels in the group fed with the commercial diet. Here, it is important to note that both Cd/Ed and Cd/Cd groups received the same Cd diet as their last meal. In PF2 at 10 am (17 h post-feeding), no differences were observed between the regimes in terms of the recovery of ¹³C in liver fractions when dietary nutrients met the energy demand at night. These results demonstrate that fish intermediary metabolism was adapted not only to the diet but also to mealtime, although further studies on this area are needed.

When protein intake is lower (as in both groups of gilthead sea bream fed with the Ed diet), increased protein retention was observed. It was indicated by higher ¹⁵N recovery in whole gilthead sea bream, and especially in the protein fraction of white muscle. These results of improved protein efficiency retention are consistent with those of Carter et al. (1993) and McCarthy et al. (1994), who observed that improved food conversion rates into growth efficiency appear to be linked to lower rates of protein degradation (turnover) in the so-called “efficient fish” for those authors, rather than to higher rates of protein synthesis. Stimulation of proteins synthesis following feeding and the incorporation of infused amino acids into proteins are both associated with an increase in oxygen consumption (Brown and Cameron 1991). In this sense, since amino acids are the main liver gluconeogenic precursors (Moon and Foster, 1995), alternative energy fuels (fat and starch) used in higher proportions during periods of increased activity must help preserving proteins instead of degrading them into amino acids to support glucose formation in the liver. We have previously shown that, in the case of gilthead sea bream, increased energy demands (i.e. sustained exercise) may be met by a carbohydrate-rich diet resulting in a protein sparing effect and improved growth rate (Ibarz et al. 2011; Martín-Pérez et al. 2012; Felip et al. 2013). Additionally, the present data of daily protein retention indicate that “morning carbohydrates” (supplied at 10 am under the Ed/Cd diet regime) would meet the energy demands and in doing so preserve dietary proteins for growth. The group Ed/Cd fed with Cd diet in PF2 showed mobilisation of white muscle protein because the fish did

not receive a second meal in 24 hours. At 17 hours post-feeding, fish expecting for a second meal at 10 am must have burned all the easily-mobilised reserves (i.e. carbohydrates) and it must have started some catabolic processes, including proteolysis. It is our opinion that if the fish had received the second meal of the day, would not have produced such mobilization.

In summary, under the conditions of the study, sea bream showed higher activity during the day, increasing metabolic interconversions in the fish and increasing protein retention efficiency in white muscle. Dietary protein retention, muscles composition and growth rate were not affected in a well-balanced, rich-carbohydrate diet. At the contrary, when the fish became adapted to being fed a diet with high levels of digestible carbohydrate, the use of this compound for energy increased. Tissue retentions of stable isotopes revealed that post-feeding metabolic changes in the distribution and fate of the labelled nutrients (¹³C-carbohydrate and ¹⁵N-protein) are due, firstly, to the dietary regime, but conditioned, secondly, by the last meal received. A decrease in dietary protein content was compensated for by more efficient retention combined with increased energy use of the other dietary nutrients, which in this case were carbohydrates. Nevertheless, under the conditions of the study, carbohydrates supplied in the afternoon were not used as efficiently as if they were supplied in the morning. A practical result of this study is that improving fish diet composition can be possible, if food supply is adjusted, increasing the proportion of non-protein ingredients during periods of higher activity.

Acknowledgments

We thank Pilar Teixidor and Pilar Rubio from the “Centre Científic i Tecnològic” (CCIT-UB) for their valuable help during stable isotope analyses. This study was supported by a grant from the Spanish government (AGL2009-12427). O. Felip and M. Martín-Pérez received fellowships from FPI-2007 and FI-2007 of the Spanish government and the Catalan government, respectively. We also thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for reviewing the English version.

The authors declare that they have no conflict of interest.

The experiments complied with the Guidelines of the European Union Council (86/609/EU), the Spanish Government (RD 1201/2005) and the University of Barcelona (specific ethics approval number for the protocol was CEEA-96/09) for the use of laboratory animals.

References

- Anthouard, M., Desportes, C., Kentouri, M., Divanach, P., Paris, J., 1996. A study of behavioural-patterns of *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus sargus*, *Puntazzo puntazzo*, *Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus* (teleostei, fishes), in a self-feeding situation. *Biol. Behav.* 11, 97–110.

- Arzel, J., Metailler, R., Le Gall, P., Guillaume, J., 1998. Relationship between ration size and dietary protein level varying at the expense of carbohydrate and lipid in triploid brown trout fry, *Salmo trutta*. *Aquaculture* 162, 259–268.
- Azzaydi, M., Martínez, F.J., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A., 1999. Effect of meal size modulation on growth performance and feeding rhythms in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 170, 253–266.
- Azzaydi, M., Rubio, V.C., Martínez, F.J., López, F.J.M., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S., Madrid J.A., 2007. Effect of restricted feeding schedule on seasonal shifting of daily demand-feeding pattern and food anticipatory activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chronobiol. Int.* 24, 859–74.
- Boulos, Z., Terman, M., 1980. Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4, 119–131.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brauge, C., Médale, F., Corraze, G., 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123, 109–120.
- Brauge, C., Corraze, G., Médale, F., 1995. Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth-performance, body-composition, nitrogen-excretion and plasma-glucose levels in rainbow trout reared at 8-Degrees-C or 18-Degrees-C. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 277–290.
- Brown, C.R., Cameron, J.N., 1991. The relationship between specific dynamic action (SDA) and protein-synthesis rates in the channel catfish. *Physiol. Zool.* 64, 298–309.
- Carter, C.G., Houlihan, D.F., Brechin, J., McCarthy, I.D., 1993. The relationships between protein-intake and protein accretion, synthesis, and retention efficiency for individual Grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Can. J. Zool.* 71, 392–400.
- Carter, C.G., Houlihan, D.F., Kiessling, A., Médale, F., Jobling, M., 2001. Physiological effects of feeding, in: Houlihan, D.F., Boujard, T., Jobling, M., (Eds.), *Food intake in fish*. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 297-331.
- Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernández, F., Baanante, I.V., 2002. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 88, 607–614.
- Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Fröhlich, N., López-Olmeda, J.F., Foà, A., Berti, R., Sánchez-Vázquez, F.J., Bertolucci, C., Foulkeset N.S., 2011. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol* 9(9): e1001142. doi:10.1371/journal.pbio.1001142.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Perez-Sanchez, J., Kaushik, S.J., 1999. Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.* 12, 23–30.

- Davidson, A.J., Stephan, F.K., 1999. Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol. Behav.* 66, 309–15.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2011. Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Rev. Fish Sci.* 19, 201–215.
- Felip, O., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Beltrán, M., Martín-Pérez, M., Planas, J.V., Blasco, J., 2012. Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (^{13}C starch and ^{15}N protein): effects of gelatinisation of starches and sustained swimming. *Br. J. Nutr.* 107, 834–844.
- Felip, O., Blasco, J., Ibarz, A., Martín-Pérez, M., Fernández-Borràs, J., 2013. Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ^{15}N and ^{13}C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Comp. Physiol. B* 183, 223–234.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fraga, F., 1956. Determination of glycogen in shellfish with the anthrone reagent (Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de antrona). *Investigaciones Pesqueras* 3, 69.
- Gómez-Milán, E., de Haro, C., Sánchez-Muros, M. J., 2011. Annual variations of the plasmatic levels of glucose and amino acid and daily changes under different natural conditions of temperature and photoperiod in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Fish Physiol. Biochem.* 37, 583–592.
- Good, B.C.A., Cramer, H., Somogy, M., 1933. The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.* 100, 491.
- Gutiérrez, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Planas, J., 1984. Daily rhythms of insulin and glucose levels in plasma of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after experimental feeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55, 393–397.
- Ibarz, A., Padrós, F., Gallardo, M.A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Tort, L., 2010. Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: review of cold-induced alterations and 'Winter Syndrome'. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 20, 539–556.
- Ibarz, A., Felip, O., Fernández-Borràs, J., Martín-Pérez, M., Blasco, J., Torrella, J.R., 2011. Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream. *J. Comp. Physiol. B* 181, 209–217.
- Kaushik, S.J., Oliva-Teles, A., 1985. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50, 89–101.
- Kulczykowska, E., Sánchez-Vázquez, F.J., 2010. Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. *Aquac. Res.* 41, 654–667.
- Laidley, C.W., Leatherland, F.J., 1988. Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and

- spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol. A* 89, 495–502.
- López-Olmeda, J.F., Egea-Álvarez, M., Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important?. *Physiol. Behav.* 96, 631–636.
- López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Zebrafish temperatura selection and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to ahemeral cycles of light and temperatura. *Chronobiol. Int.* 26, 200–218.
- Madrid, J.A., 1994. L'alimentation a la demande et les ritmes endogènes. *Aqua. Revue.* 52–53.
- Martin-Perez, M., Fernández-Borràs, J., Ibarz, A., Millan-Cubillo, A., Felip, O., de Oliveira, E., Blasco, J., 2012. New insights into fish swimming: a proteomic and isotopic approach in gilthead sea bream. *J. Proteome Res.* 11, 3533–3547.
- McCarthy, I.D., Houlihan, D.F., Carter, C.G., 1994. Individual variation in protein-turnover and growth efficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Proc. Biol. Sci. B* 257, 141–147.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F., Baanante, I.V., 2004. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B* 138, 145–153.
- Mistlberger, R., 1994. Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Res.* 18, 171–195.
- Mistlberger, R.E., 2009. Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1718–1729.
- Montoya, A., López-Olmeda, J.F., Yúfera, M., Sánchez-Muros, M.J., Sánchez-Vázquez, F.J., 2010. Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 306, 315–321.
- Moon, T.W., Foster, G.D., 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences, in: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P., (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes; Metabolic biochemistry*. Elsevier Science Publishers B.V., New York, pp. 65-100.
- Ozorio, R.O.A., 2008. Swimming activity and non-protein energy (NPE) metabolism in fish. *Curr. Nut. Food. Sci.* 4, 282–289.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead sea bream and common carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, 1164–1170.
- Pittendrigh, C.S., 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 16–54.
- Polakof, S., Míguez, J.M., Soengas, J.L., 2007. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 363–374.

- Requena, A., Fernández-Borràs J., Planas, J., 1997. The effects of a temperature rise on oxygen consumption and energy budget in gilthead sea bream. *Aquac. Int.* 5, 415–426.
- Sánchez-Muros, M.J., Corchete, V., Suárez, M.D., Cardenete, G., Gómez-Milán, E., de la Higuera, M., 2003. Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture* 224, 89–103.
- Sánchez, J.A., López-Olmeda J.F., Blanco-Vives B., Sánchez-Vázquez F.J., 2009. Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiol. Behav.* 98, 125–129.
- Silva, P., Andrade, C.A.P., Timoteo, V.M.F.A., Rocha, E., Valente, L.M.P., 2006. Dietary protein, growth, nutrient utilization and body composition of juvenile blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *Aquac. Res.* 37, 1007–1014.
- Spieler, R.E., 1992. Feeding entrained circadian rhythms in fishes, in: Ali, M.A., (Ed.), *Rhythms in Fishes*. Plenum. Press., New York, pp. 137-147.
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., Tomasi, V., 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *J. Fish Dis.* 21, 177–184.
- Strubbe, J.H., van Dijk, G., 2002. The temporal organization of ingestive behaviour and its interaction with regulation of energy balance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 485–98.
- Vergara, J.M., López-Calero, G., Robaina, L., Caballero, M.J., Montero, D., Izquierdo, M.S., Aksnes, A., 1999. Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture* 179, 35–44.

6. DISCUSSIÓ GENERAL

6. DISCUSSIÓ GENERAL

Els treballs que componen la present tesi tenen com a objectiu general abordar la millora del cultiu de peixos d'interès comercial, a partir de l'optimització de l'ús dels nutrients. Més concretament, es va determinar com es pot influir en la capacitat d'aprofitament dels carbohidrats digeribles de la dieta en dues espècies de peixos carnívors, com són la truita (*O. mykiss*) i l'orada (*S. aurata*). Per aconseguir-ho, primer es va intentar incrementar la demanda energètica del peix mitjançant un exercici moderat però sostingut (a 1,3 LC.s⁻¹ en la truita i 1,5 LC.s⁻¹ en l'orada, en els Capítols I, II i III), i també es va variar la distribució dels nutrients en els diferents moments d'alimentació del dia (estudi del règim diari en el Capítol IV). Mantinent els animals en aquestes condicions, es van estudiar les relacions entre la nutrició i el metabolisme dels peixos. Es va analitzar la composició tissular dels animals; es va fer el seguiment del nutrients marcant-los amb traçadors metabòlics (midó amb C¹³ i proteïna amb N¹⁵); i es van estudiar els canvis de les fibres musculars. Tot això, s'estudià de forma integrada amb d'altres estudis del grup de recerca sobre l'efecte del dejuni i realimentació en la proteòmica dels músculs blanc i vermell i el cultiu primari de miòcits, analitzant els canvis durant la diferenciació. Així doncs, aquests estudis tenen la finalitat de comprendre la fisiologia d'aquestes espècies principalment, en els aspectes del desenvolupament muscular, amb l'objectiu d'optimitzar la producció.

Dietes riques en Carbohidrats per la truita: midó cru o gelatinitzat?

Fins pràcticament a finals dels anys 90, els peixos (sobretot les espècies considerades carnívores) han estat descrits com animals diabètics o, si més no, poc adaptats a poder emprar quantitats grans de carbohidrats en les dietes artificials produïdes per aqüicultura. Aquesta idea ha estat recollida en diversos treballs (Wilson 1994; Moon 2001; Hemre i col. 2002; Panserat i Kaushik 2002; Stone i col. 2003), i és conseqüència de pressuposar una capacitat limitada dels peixos per metabolitzar la glucosa. Posteriorment, el processament per extrusió del midó de la dieta (sobretot de cereals i blat de moro) ha incrementat la digestibilitat d'aquests carbohidrats. Això ha contribuït, en les modernes dietes de peixos, a que augmenti la quantitat total disponible de carbohidrats i ha reobert l'antiga discussió sobre com aquests carbohidrats afecten al creixement o, fins i tot, a l'estat sanitari dels peixos. Aquest fet també ha propiciat que es duguin a terme més estudis sobre la utilització i la deposició d'aquests nutrients.

Aquesta situació sobre l'ús dels carbohidrats de la dieta, especialment controvertida en el cas dels salmònids, feia necessari un estudi en la truita irisada on primer s'analitzés la distribució d'elevats nivells de carbohidrats de la dieta en funció del grau de gelatinització, mitjançant la incorporació de C¹³-midó (Capítol I). Com a resultat d'aquest estudi es determinà que existeix una absorció més elevada dels carbohidrats en el grup alimentat amb midó gelatinitzat, en contrast amb el grup alimentat amb midó cru, tot mostrant uns nivells de glucosa en plasma incrementats i provocant una hiperglucèmia prolongada durant diverses hores.

Aquest nivell excessiu de glucosa en plasma ja havia estat descrit en la truita per diversos autors (Bergot 1979; Kaushik i Oliva-Teles 1985; Brauge i col. 1994), però també vàrem observar que el manteniment de la hiperglucèmia havia de ser causat per una baixa taxa d'utilització de la glucosa pels teixits perifèrics, retardant així la retirada de la glucosa de la circulació en comparació amb animals endotèrmics (Furuichi i Yone 1981; Wilson 1994; Moon 2001). No obstant això, en aquesta mateixa espècie, s'ha descrit que un nivell apropiat d'hidrats de carboni en la dieta serveix per promoure el creixement i podria tenir l'efecte d'estalvi de proteïnes per al creixement. La glucosa, a més de ser el substrat oxidatiu preferent pel teixit nerviós i les cèl·lules sanguínies, és el metabòlit intermediari per excel·lència, i la truita irisada és capaç d'incrementar-ne l'ús quan aquest augmenta en sang (Blasco i col. 2001). A més, la presència de quantitats més elevades d'hidrats de carboni a la dieta podria actuar reduint l'activitat gluconeogènica i, així, desviaria aminoàcids de les vies oxidatives cap a vies sintètiques (Cowey i col. 1977; Sánchez-Muros i col. 1996). Quan es van començar aquests estudis, les opinions en favor de que la ingesta d'hidrats de carboni podia induir canvis tendents a conservar els aminoàcids i activar altres vies metabòliques, encara eren molt controvertides (revisat per Wilson 1994; Hemre i col. 2002; Stone 2003; Enes i col. 2009, 2011).

Diversos estudis han analitzat els efectes de la ràtio entre l'energia i la proteïna de la dieta, sobretot pel que fa a preservar la proteïna ingerida canviant-ne la proporció amb la de les fonts no-proteïques, lípids i carbohidrats (Brauge i col. 1995, en truita irisada; Arzel i col. 1998, en truita de riu; Company i col. 1999, en dèntol, llobarro i orada; Vergara i col. 1999, en orada; Peres i Oliva-Teles 2002, en llobarro). L'efecte d'estalvi proteic dels lípids de la dieta està ben descrit (Beamish i Medland 1986; Rasmussen i col. 2000) i ha condicionat el desenvolupament de dietes artificials altament energètiques per als peixos, encara que puguin desembocar en la deposició excessiva de lípids al filet dels peixos (Alexis 1997; Spisni i col. 1998; Caballero i col. 1999, 2004). Per altra banda, l'efecte dels carbohidrats sobre l'estalvi de proteïnes encara és controvertit, particularment en algunes espècies de peixos carnívors (Peres i col. 1999; Enes i col. 2011). És conegut que la digestibilitat del midó depèn de la complexitat de la molècula (Enes i col. 2008) i de la font de midó, ja sigui farina de blat, farina de blat de moro, etc. (Venou i col. 2003).

Com a resultat del primer dels estudis d'aquesta tesi s'ha demostrat que, en la truita irisada, el grup alimentat amb midó gelatinitzat presentava una major recuperació de l'isòtop C¹³ en els teixits (indicatiu de més incorporació del carbohidrat de la dieta), seguit d'una elevada deposició en les fraccions proteica i lipídica dels músculs (principalment al múscul vermell). Amb aquestes accions els peixos disminuïen els nivells de glucosa en plasma, però a la vegada s'observava un increment de la mida del fetge com a conseqüència de la incorporació d'aquests carbohidrats a la fracció de glicogen, causant un increment de la lipogènesi hepàtica (Felip i col. 2012). La presència de lípids sintetitzats *de novo* en el fetge es demostrava per una elevada incorporació de C¹³ en la fracció lipídica del fetge i pels nivells incrementats de lípids en el múscul blanc. Per tant, aquests lípids podien posteriorment ser dipositats en el propi òrgan o transportats als altres teixits, com passà en el múscul. Com a

conclusió de l'estudi es demostrà que la truita presenta certes limitacions metabòliques a l'hora de disposar de nivells alts de carbohidrats, al menys des del punt de vista pràctic de la seva producció en aqüicultura.

Una qüestió que va sorgir com a resultat d'aquest estudi va ser que, si mitjançant l'increment de la demanda energètica de l'animal es podria augmentar l'eficiència en l'ús dels carbohidrats de la dieta, especialment en el cas de la truita irisada quan aquests són elevats. Això significa, en el cas d'un animal poiquiloterm, augmentar la seva taxa metabòlica, i es pot aconseguir augmentant la temperatura a la que es cultiva (aspecte poc pràctic en aqüicultura ja que es sol fer a les temperatures descrites com a òptimes per el creixement de l'espècie) o bé augmentat la seva activitat física (l'exercici natatori aeròbic).

Beneficis de la natació sostinguda en l'ús i el destí dels carbohidrats de la dieta

El següent punt desenvolupat fou l'estudi de les condicions que permetrien solucionar, o evitar en part, l'excessiu engreixament dels filets i del fetge del peix, tot augmentant la taxa de producció d'energia aeròbica a partir de nutrients no proteics. En les espècies de clar interès comercial aquest engreixament es produeix usualment degut a que l'energia de la dieta prové d'una gran quantitat de lípids. Tot i això, en estudis com els del bloc anterior, s'ha comprovat que també succeeix quan l'energia prové d'una elevada proporció de carbohidrats. Quan cal plantejar-se una manera d'augmentar l'ús dels nutrients (lípids i carbohidrats) amb finalitat energètica, el primer a considerar és la relació entre la nutrició i l'activitat natatòria del peix. Per exemple, mitjançant la inducció d'un exercici moderat però sostingut (de 24 hores al dia), tot determinant si la condició fa incrementar les despeses energètiques de l'animal. El fet de plantejar-se l'exercici des d'un punt de vista pràctic del cultiu de peixos no és, d'entrada, contradictori, ja que se sabut que l'activitat moderada i sostinguda millora la taxa de creixement i l'eficiència de conversió alimentària dels peixos en determinades condicions (Jorgensen i Jobling 1993; Davison 1997). Fins i tot s'ha proposat l'exercici com una eina per reduir l'estrès produït pel confinament i les elevades densitats d'estabulació d'aquests animals (Huntingford 2010; revisat per Palstra i Planas 2011). La informació sobre el tema dels efectes de l'exercici segueix sent escassa en peixos, i se centra principalment en salmònids. De totes maneres, la principal conclusió de l'estudi que vàrem desenvolupar sobre els efectes de l'exercici en la truita irisada és que, quan aquesta es sotmet a la combinació d'una natació moderada i sostinguda i una dieta baixa en proteïna i rica en carbohidrats durant un mes, respon augmentant la taxa específica de creixement (Felip i col. 2012). En activitat sostinguda, s'havia descrit una major despesa energètica a través de l'increment del potencial aeròbic dels músculs vermell i blanc, amb taxes de creixement incrementades però sense utilitzar dietes amb elevats continguts de carbohidrats (Houlihan i Laurent 1987; Farrell i col. 1990).

Dels estudis desenvolupats en orada sota condicions molt similars d'alimentació i exercici, també podem concloure que aquesta presenta una taxa específica de creixement significativament més elevada (Ibarz i col. 2011; Felip i col. 2013a). No obstant això, hi ha

marcades diferències específiques, perquè mentre que la truita irisada augmentà el consum d'aliment per compensar els majors costos energètics a causa de l'exercici, l'orada no presentà canvis significatius en la quantitat d'ingesta. Això suggereix que, durant la natació sostinguda, l'orada usa la dieta rica en carbohidrats més eficientment que la truita irisada. Un primer resultat conjunt dels estudis desenvolupats és que les dues espècies presenten diferències envers un tipus d'exercici molt similar (moderat però de molt llarga durada). El fet que les orades no mengin significativament més, però sí que creixin més, indica un millor aprofitament de la dieta en una situació en què la taxa metabòlica s'hauria d'haver vist augmentada. La hiperglucèmia postprandial de llarga durada en la truita, després de la ingesta d'una dieta rica en carbohidrats, va desaparèixer molt més ràpidament quan les truites irisades van ser sotmeses a exercici moderat i sostingut (Felip i col. 2012). Per altra banda, l'orada alimentada amb la dieta rica en carbohidrats presentava curts períodes d'hiperglucèmia en ambdós grups experimentals, tant en les orades sotmeses a exercici sostingut, com en les que estaven en condicions normals de cultiu (és a dir, sotmeses a activitat natatòria voluntària) (Felip i col. 2013a). Aquests resultats revelaren que l'orada és una espècie que té la capacitat d'incorporar una gran proporció de carbohidrats de la dieta i d'utilitzar-los eficientment. Per tant, és també d'esperar que els efectes beneficiosos (estalvi proteic) de l'exercici sostingut sobre l'ús d'aquesta dieta altament carbohidratada, siguin majors en la orada que en la truita.

Els estudis sobre nutrició de peixos han prestat més atenció a la substitució de nutrients i el seu efecte sobre el creixement, que a l'assimilació, deposició i ús d'aquests nutrients. Així i tot, els estudis existents demostren que la taxa d'utilització de la glucosa pot modificar-se quan es produeixen canvis en la demanda d'energia, com per exemple en situacions de dejuni (Blasco i col. 2001), hipòxia (Haman i col. 1997) o sota condicions d'exercici (West i col. 1993). En relació amb l'activitat natatòria dels peixos, s'ha demostrat que canvia la quantitat i proporció dels nutrients utilitzats, especialment en els músculs i segons els tipus d'exercici (Davison 1997; Palstra i Planas 2011). Ara bé, no tenim constància d'estudis que descriguin com es distribueixen, es mobilitzen, o a on es dipositen els diferents nutrients de la dieta en condicions de demanda energètica incrementada. Existeix un equilibri delicat en l'intercanvi de molècules a les diferents vies del metabolisme intermediari, però cap dels compostos que hi estan implicats pot ser modificat de manera important sense que s'afecti alhora la funció dels altres. La incorporació de dos isòtops estables (C^{13} i N^{15}), marcant respectivament una quantitat molt significativa del midó (3%) i la proteïna (1%) de les dietes, ens ha permès estudiar el destí d'ambdós nutrients en els casos de la truita irisada i l'orada (Beltrán i col. 2009), sota les diverses condicions experimentals exposades en la present tesi (capítols I i II). L'ús de proteïna de la dieta marcada amb N^{15} com a traçador, permet mesurar sense els inconvenients d'emprar marcatge radioactiu, la retenció de proteïna en els teixits principals del peix després de tan sols una sola ingesta. L'ús de C^{13} marcant el midó permet analitzar l'assimilació i la distribució dels principals carbohidrats de les dietes artificials. No obstant això, cal assenyalar dues limitacions del mètode per a l'avaluació de la utilització de C^{13} -midó: primer, la quantitat de marcadors perdut amb els aliments no digerits, que no s'ha

mesurat en cada dieta, però sabem que la digestibilitat del marcador és molt alta en les dues espècies d'estudi (truita irisada i orada); i segon, que hi pot haver part de la glucosa assimilada de midó que s'elimini a través de l'orina dels peixos quan la glucèmia és més elevada que la capacitat de reabsorció, tot i que si el període de la hiperglucèmia es curt no representarà una quantitat important (Blasco i col. 1996; Bucking i Wood 2005). Per tant, amb l'ús combinat dels dos isòtops (N^{15} -proteïna i C^{13} -midó marcats), i analitzant l'absorció dels nutrients de la dieta pels òrgans principals i la deposició en els principals components tissulars (glicogen, lípid i proteïna), es va poder determinar la resposta del metabolisme intermediari als canvis de dieta en relació a les condicions modificades. Aquest marcatge va anar seguit d'un experiment postprandial en el qual es va tenir en compte la fisiologia de cada espècie a l'hora d'establir el moment de recol·lecció de les mostres. D'aquesta manera, per als experiments presentats, es va escollir 11 h post-ingesta en el cas de la truita irisada i 6 h en el cas de l'orada. Aquestes hores asseguren, per a cada una de les espècies, la màxima distribució dels nutrients en els principals òrgans. També es va mostrejar a les 24 h postprandials, ja que representa el punt de completa utilització dels nutrients just abans d'una nova ingesta (i també és el període de dejuni usualment emprat en els estudis de fisiologia, important a l'hora de fer comparacions amb valors d'altres grups).

Per tant, gràcies al marcatge isotòpic del midó i de la proteïna de la dieta, es pot determinar com es metabolitzen i s'utilitzen aquests nutrients. A la vegada, també permet explicar els mecanismes que porten a un major creixement dels peixos sota les condicions estudiades, tot analitzant la influència del grau de gelatinització dels carbohidrats, de l'exercici sostingut i del moment del dia en que s'administren els nutrients.

En els estudis post-ingesta, els animals adaptats a una natació sostinguda van presentar una major absorció i incorporació del midó- C^{13} de la dieta en el fetge a les 24h de l'alimentació, tant per la truita com per l'orada (Felip i col. 2012, 2013). Tant l'escurçament del període d'hiperglucèmia com l'augment dels nivells de compostos marcats en el fetge, per efecte del metabolisme intermediari, són indicatius d'una captació hepàtica incrementada. La qual cosa es relaciona amb l'augment de l'expressió de l'enzim glucoquinasa induït per l'increment dels carbohidrats de la dieta descrit per Caseras i col. (2002), Metón i col. (2004), i Enes i col. 2008 en l'orada, i per Panserat i col. (2000) en la truita. Mentre que l'orada sembla ser capaç de regular la ràtio de les taxes de glucòlisi i de gluconeogènesi segons la quantitat dels carbohidrats de la dieta, els peixos carnívors del grup dels salmònids (com la truita irisada o el salmó Atlàntic) no modifiquen l'expressió gènica del fetge o l'activitat dels enzims que participen en les vies gluconeogèniques (PEPCK, FBase i G6Pase) en resposta als alts nivells de carbohidrats de la dieta (revisat per Enes i col. 2009). Aquest fet podria explicar el restabliment més ràpid dels nivells plasmàtics normals de la glucosa en l'orada que en la truita irisada.

L'estudi de Panserat i col. (2009) demostra que, quan el percentatge d'hidrats de carboni digeribles ingerits diàriament per la truita excedeix les capacitats per utilitzar aquest nutrient, la taxa de captació de glucosa pels teixits augmenta. Aquest fet afavoreix l'augment de

lipogènesi en el fetge i, conseqüentment, la deposició de lípids en diversos teixits, incloent-hi els músculs. Aquests dipòsits contenen principalment àcids grassos saturats. Aquesta deposició lipídica, per producció endògena excessiva, es pot prevenir augmentant la despesa energètica a través d'exercici natatori forçat. L'augment de l'activitat metabòlica aeròbica permetria un major ús dels carbohidrats com a combustible metabòlic, tal com van observar Magnoni i col. (2013). Aquests autors reforcen aquesta idea, descrivint un augment de l'expressió gènica dels transportadors de glucosa, concretament GLUT-4, i una regulació a l'alça dels gens d'enzims implicats en la via de la glucòlisi, tant en múscul blanc com en múscul vermell de truites irisades sotmeses a exercici continuat. Els resultats obtinguts emprant els marcadors isotòpics dels nutrients (Felip i col. 2012), concordarien amb d'altres estudis que mostren que els lípids sintetitzats *de novo* en el fetge poden ser transportats com lipoproteïnes plasmàtiques cap al múscul en exercici, amb la finalitat de ser oxidats (Magnoni i Weber 2007) o utilitzats per reposar les reserves (Sheridan 1988). En el cas de l'orada podem arribar a la conclusió que, com a conseqüència de l'exercici, augmenten les transformacions metabòliques en el fetge, i que la major recuperació de C¹³ a la fracció lipídica del fetge en el grup exercitat demostra l'augment de la lipogènesi hepàtica. Aquesta síntesi augmentada però, ha d'anar acompanyada de la mobilització d'aquests lípids a teixits extrahepàtics ja que el contingut total de lípids en el fetge no va augmentar significativament. Això demostra que les dues espècies es comporten de forma similar en aquest aspecte. De totes maneres hi ha diferències específiques degut al fet que, la truita sota condicions d'exercici, va acumular lípids en el múscul blanc, i en canvi l'orada sota condicions similars no ho va fer. Aquesta última espècie té la capacitat d'augmentar les taxes de transformació i d'oxidació de lípids en aquest múscul. Alguns estudis han assenyalat la disminució dels nivells de lípids en el múscul blanc de la truita irisada després de l'exercici exhaustiu (Milligan i Girard, 1993; Wang i col. 1994) però, quan la natació és sostinguda o de resistència, s'ha vist en diverses espècies que es produeix majoritàriament l'efecte contrari (en truita de riu, Davison i Goldspink 1977; en salmó Atlàntic, Totland i col. 1987; i en seriola japonesa, Yogata i Oku 2000). En els estudis de la present tesi es va trobar que a les 24 h post-ingesta, el múscul vermell de la truita sotmesa a exercici sostingut, presentà una major recuperació de C¹³ en la fracció lliure (o fracció de molècules solubles) dels teixits. Això és indicatiu d'una elevada activitat metabòlica oxidativa en el teixit. Aquesta elevada activitat metabòlica del múscul vermell durant la natació moderada i sostinguda en els peixos ja havia estat descrita i es deu a l'oxidació no només d'àcids grassos, sinó també de glucosa (West i col. 1993). Malgrat tot, les diferències entre espècies en aquest aspecte també són grans. Així, en orades sotmeses a condicions similars d'exercici i dieta, trobem resultats similars de gran activitat metabòlica, però en aquest cas en múscul blanc. En un estudi paral·lel i complementari als presentats (Martín-Pérez i col. 2012), s'han descrit els canvis moleculars associats al proteoma dels dos tipus de múscul en orades sotmeses al mateix tipus d'exercici que el que s'ha emprat aquí. Així, es va comprovar que s'incrementa la capacitat de síntesi proteica (mesurada per la ràtio RNA/proteïna), l'ús energètic de metabòlits (estimat per l'augment del fraccionament isotòpic de les reserves, $\Delta\delta C^{13}$ -lípid i $\Delta\delta C^{13}$ -glicogen),

i la capacitat aeròbica dels enzims en el múscul blanc, mentre que el recanvi (*turnover*) proteic, expressat pel fraccionament del nitrogen ($\Delta\delta N^{15}$), no canvia. El múscul vermell, contràriament, no va presentar canvis en cap dels paràmetres esmentats. A més, l'exercici va induir canvis en les proteïnes que intervenen en diverses vies metabòliques del múscul blanc i que afecten al catabolisme dels carbohidrats, la síntesi de proteïnes, la contracció muscular i la detoxificació. També s'observà l'expressió disminuïda d'altres proteïnes en el múscul vermell, les quals participen en la producció d'energia, la contracció muscular i els processos homeostàtics. Com a conseqüència dels resultats assolits en aquest treball (Martín-Pérez i col. 2012) i els de la present tesi, s'obre una porta per comprendre millor els processos adaptatius dels músculs dels peixos basant-se en la resposta fenotípica. Per això es pot concloure que la natació moderada i sostinguda, en el cas de l'orada, és assolida també pel múscul blanc, que amb el seu treball ajuda a reduir la càrrega del múscul vermell alhora que col·labora en el rendiment de la natació i en l'eficiència de conversió dels aliments. Per tot això, es conclou també que els carbohidrats de la dieta tenen un paper important en el metabolisme del múscul durant l'exercici sostingut (Felip i col. 2012, 2013).

Millora en l'estalvi proteic i implicacions de l'exercici en el creixement hipertròfic del múscul.

Al percebre una corrent d'aigua, els peixos presenten un reflex de natació en contra, de manera que és una forma molt senzilla de provocar la inducció d'un exercici. El forçar una activitat natatòria de manera moderada i sostinguda (a 1,3 o 1,5 LC.s⁻¹ durant un mes), a més a més de tots els canvis descrits fins ara en l'adaptació fisiològica i en les característiques metabòliques, principalment pretenia aconseguir una millora de la producció en aqüicultura de la truita irisada i l'orada per dues vies: 1) afavorir el creixement i 2) optimitzar l'ús de les proteïnes de la dieta. Com ja s'ha assenyalat en la truita, l'exercici moderat i sostingut no va perjudicar significativament el creixement dels animals, però en el cas de l'orada fins i tot n'augmentava la taxa de creixement. L'ús del marcador isotòpic N¹⁵ ha permès aclarir alguns aspectes de les implicacions de l'exercici en el destí de les proteïnes de la dieta. Així, s'ha mostrat en ambdues espècies que els animals exercitats presentaven una major recuperació del marcador N¹⁵ en la fracció proteica dels músculs blanc i vermell i, per tant, un increment en la deposició de les proteïnes provinents de la dieta (que eren les macades amb N¹⁵) (Felip i col. 2012, 2013). Per tant, els carbohidrats digeribles combinats amb l'exercici van induir un efecte d'estalvi proteic que va afavorir el creixement dels animals, alhora que permeté reduir les despeses de nitrogen de la proteïna de la dieta. Aquest augment de la retenció proteica es va produir juntament amb l'increment de la relació citocrom c-oxidasa / citrat sintasa en el cas del múscul blanc d'orada. El canvi enzimàtic observat (augment de la citocrom c-oxidasa mentre que disminueix la citrat sintasa), és indicatiu del manteniment de la producció d'energia i de la preservació dels aminoàcids per a la síntesi proteica al disminuir el seu ús en vies catabòliques (Martín-Pérez i col. 2012).

Hi ha dues diferències clau entre les espècies estudiades en la present tesi. La primera rau en que l'orada exercitada, a més a més d'una major incorporació de N¹⁵ en la fracció proteica dels músculs, presentà també una elevada incorporació de C¹³ a la fracció proteica dels principals teixits. Aquest fet indica un elevat moviment isotòpic (*isotopic routing*) dels carbohidrats de la dieta que fa pensar en una major capacitat d'aquesta espècie per obtenir energia a partir dels carbohidrats de la dieta. El fet que l'efecte d'estalvi proteic es pugui relacionar amb un major creixement dels animals, com ha quedat demostrat en truites i orades exercitades (Capítols I, II i III), pot ser degut a canvis en l'ús dels combustibles metabòlics (Ozório 2008; Kaushik i Seilliez 2010), veient-se incrementat l'ús dels carbohidrats sota condicions d'exercici sostingut. La segona diferència entre la truita i l'orada es troba en el fet que, malgrat que ambdues espècies presenten un major creixement sota condicions d'exercici, per aconseguir-ho la truita requereix incrementar la ingesta, mentre que l'orada no.

Per dur a terme el tercer estudi de natació forçada (Ibarz i col. 2011), es va col·laborar amb el grup de recerca de Fisiologia de l'Exercici. En comprovar els beneficis aconseguits en el creixement de l'orada, es va plantejar estudiar també si hi havia canvis en la cel·lularitat i la capil·laritat de les fibres musculars, originant aquests estudis el tercer capítol de la present tesi. Agafant com a model estudis en d'altres espècies, es van determinar els paràmetres d'histologia muscular que podien relacionar els canvis en les fibres amb l'increment observat del creixement. És a dir, la densitat de fibres i capil·lars, l'àrea i el perímetre de les fibres, el nombre de fibres que no presenten capil·lars en contacte, el nombre de fibres en contacte almenys amb un capil·lar i, sobretot, la distribució de les fibres segons la seva mida. Aquest treball també ha estat el primer en investigar la cel·lularitat del múscul de l'orada en condicions d'activitat sostinguda i alimentada amb una dieta baixa en proteïnes i alta en hidrats de carboni digeribles. Alguns estudis han descrit diferències en el nombre i la mida de les fibres al llarg de tota la longitud corporal del peix (Stickland 1983; Mascarello i col. 1995) o a les regions ventral i dorsal (Kiessling i col. 1991), mentre que d'altres autors no han trobat diferències (Abdel i col. 2005). Existeix escassa literatura en aquest sentit, però sembla que aquestes diferències podrien estar relacionades amb la grandària i l'edat del peix, el que indicaria que el creixement potencial del múscul dels peixos difereix entre les primeres etapes de creixement i l'edat adulta del mateix. El major creixement que presenta l'orada sotmesa a exercici sostingut ($1,5 \text{ LC}\cdot\text{s}^{-1}$) es va poder relacionar amb una estimulació de la hipertròfia muscular, i amb un augment de l'àrea i el perímetre principalment de les fibres anteriors (epaxials) del múscul blanc. Aquest fet també correlaciona directament la major deposició de N¹⁵ observada en el múscul, després de tan sols una ingesta forçada i anàlisi a les 24 h (Felip i col. 2013a), amb el creixement diferencial de les fibres aconseguit en un mes (Ibarz i col. 2011). Per altra banda, a la zona caudal (on trobem barreja de múscul blanc i vermell), les fibres musculars presentaren en els peixos exercitats un augment de la capil·laritat que les irriga quan es comparaven amb les fibres dels animals no exercitats. Això indicaria un increment del subministrament d'oxigen i nutrients a la musculatura de la zona caudal del peix sota condició d'exercici sostingut o de resistència. Aquest tipus de natació està principalment sustentat pel metabolisme aeròbic

(Moyes i West 1995; Coughlin 2002). Com a conclusió dels estudis realitzats se'n pot "derivar" una aplicació pràctica per al cultiu dels peixos: les condicions sedentàries d'estabulació en les quals habitualment es mantenen els peixos d'aquicultura porten a la sub-explotació del potencial de creixement muscular del peix.

Ritmes diaris d'alimentació en l'orada. Canvis en l'ús dels nutrients segons el règim diari

Basant-nos en els fets que, en el cas de l'orada, els carbohidrats de la dieta es poden assimilar i usar eficientment, que l'increment d'activitat n'augmenta l'ús i que l'animal canvia d'activitat de forma natural al llarg del dia, es decidí avaluar la influència dels ritmes diaris d'alimentació sobre l'absorció i l'ús dels nutrients de la dieta (sobretot proteïna i carbohidrats) en aquesta espècie, per tal d'extreure'n el màxim profit de l'alimentació. Els dos aspectes que s'intentaren optimitzar en el tercer bloc de la tesi (Capítol IV) són: l'augment de l'eficiència de retenció proteica i l'ús més eficient dels altres nutrients en funció del moment del dia en que es subministra l'aliment.

La vida dels peixos està subjecta a canvis repetitius de llum i obscuritat amb una periodicitat diària. Aquesta ritmicitat ha determinat patrons de comportament que s'han fixat genèticament en moltes espècies degut a la pressió generada per les forces de la selecció natural tal com, per exemple, l'optimització de l'aliment o evitar als depredadors (Daan 1981). Ara bé, els cicles d'alimentació també poden causar respostes rítmiques en els peixos. Així, quan l'aliment es restringeix de forma periòdica, el moment de l'alimentació pot actuar com un potent sincronitzador, o *zeitgeber*, dels ritmes diaris en els vertebrats. De manera que els moments del dia en què l'animal s'alimenta provocaran un augment en l'activitat locomotora d'aquests abans de la ingesta, fet que es coneix amb el nom d' "activitat d'anticipació a la ingesta" (Mistlberger 2009). En els peixos de cultiu, per exemple, l'alimentació programada sembla que actua com a sincronitzador d'aquesta activitat i, per tant, se li proposa un *rol* adaptatiu, preparant fisiològicament l'animal per a la següent presa d'aliment (Boulos i Terman 1980; Spieler 1992; Mistlberger 1994; Azzaydi i col. 2007; Mistlberger i col. 2009; Sánchez i col. 2009). En el cas de l'orada, Sanchez-Muros i col. (2003) varen observar que quan es troba sotmesa a un règim d'alimentació a demanda, aquesta presenta variacions rítmiques diàries preferint alimentar-se en hores vespertines mostrant una eficiència alimentària millorada. És lògic doncs suposar, que l'orada és una espècie les necessitats energètiques de la qual varien durant el dia (Sánchez-Muros i col. 2003). De fet, el nostre grup de recerca ja havia observat (Requena i col. 1997) que el consum d'oxigen en juvenils d'orada augmentava clarament durant el dia (i sobre tot després de l'alimentació), mentre que a la foscor disminuïa la taxa metabòlica aeròbica.

Amb la finalitat d'adequar i optimitzar el subministrament energètic en el cultiu de l'orada en funció del moment del dia, es dissenyà un experiment on s'alternà l'ús de dues dietes de diferent composició: una dieta comercial (especialment adequada per orada, rica en proteïna i amb un nivell de lípids "baix"), i una dieta experimental relativament baixa en

proteïnes (però de farina de peix de gran qualitat) i rica en carbohidrats digeribles. La seva combinació es va proposar que anés canviant al llarg del dia en els dos moments d'ingesta als quals els animals estaven acostumats d'entrada. Per tant, es van establir tres règims d'alimentació diferents. Al règim 1 (Cd/Cd) se li administrà sempre la dieta comercial, tant al matí (10 h) com a la tarda (17 h). Al règim 2 (Cd/Ed) se li donava la dieta comercial al matí (10 h) i la dieta experimental a la tarda (17 h). I per al règim 3 (Ed/Cd) es va fer al revés: s'administrà la dieta experimental al matí (10 h) i la dieta comercial a la tarda (17 h). L'objectiu plantejat era estudiar la ritmicitat diària en l'ús dels nutrients i determinar quins canvis es donaven per tal de trobar en quin moment del dia podia resultar més eficient un canvi de la composició de la dieta (com ara la reducció dels nivells de proteïna substituïts parcialment per carbohidrats) o del règim, per tal d'optimitzar la retenció de la proteïna provinent de la dieta. S'esperava que el canvi en l'activitat diària (diürna i nocturna) dels peixos actuaria fent una acció similar a la de l'exercici (tractat anteriorment als Capítols I,II,III), com a succés modulador de l'ús dels nutrients en paral·lel als canvis del metabolisme intermediari. Aquest és el treball que constitueix l'article sotmès a la revista *Aquaculture* (Felip i col. 2013b).

En el cas de l'orada, és conegut que diversos components plasmàtics presenten ritmicitat relacionada amb l'alimentació (Montoya i col. 2010; Gómez-Millán i col. 2011). En els estudis anteriors s'ha demostrat que l'orada mobilitza ràpidament quantitats grans de glucosa provinents de la dieta, sense presentar hiperglucèmies mantingudes després d'una ingesta elevada de carbohidrats (Felip i col. 2013a), contràriament al que estava descrit per altres espècies de peixos com la truita (Brauge i col. 1994, Kaushik i Oliva-Teles 1985). En el mateix sentit, aquest estudi de tres règims alimentaris que es proposa, demostra que els nivells de glucosa en plasma i de triacilglicèrids són només el reflex transitori de la composició de l'últim àpat (en aquest cas després d'una ingesta forçada i, per tant, ben determinada). Quan en el darrer àpat es subministraven elevats nivells de carbohidrats (dieta experimental), els nivells de glucosa en plasma a les 7 hores postprandials van ser més elevats. Aquesta hiperglucèmia post-ingesta ja havia estat descrita quan es subministraven dietes riques en carbohidrats (en truita, Brauge i col. 1994 i Laidley i Leatherland 1988; i llobarro, Gutiérrez i col. 1984). De forma similar, quan el darrer àpat incloïa nivells elevats de greixos (dieta comercial), els nivells de triacilglicèrids plasmàtics a les 7 hores també es veïeren incrementats, concordant amb el que s'havia descrit en truites alimentades amb dietes d'elevat contingut de lípids (Brauge i col. 1995). Per tant, es va poder establir que els animals que van menjar la dieta experimental (rica en carbohidrats) en l'última ingesta, eren capaços d'assimilar i distribuir la sobrecàrrega de carbohidrats igualant a 17 i 24 hores post-ingesta els nivells plasmàtics amb els dels altres dos grups alimentats amb la dieta comercial en l'última ingesta. Igual succeïa per als lípids en el cas dels peixos que van menjar la dieta comercial en el darrer àpat. És important destacar que, en els dos casos, abans del següent àpat els animals havien disposat ja dels nutrients no proteics.

En l'estudi de la ritmicitat, quan es comparaven els dos règims que presentaven la dieta experimental amb el règim que incloïa només la dieta comercial, demostrà que l'ús oxidatiu

dels carbohidrats es veia augmentat amb la pròpia activitat diària, encara que els animals no estiguessin sotmesos a exercici forçat. Per tant, es va evidenciar una resposta de ritme diari en la tolerància a la ingestió d'hidrats de carboni, destacant l'efecte de l'hora del dia en el metabolisme de la glucosa. Aquest aspecte està en consonància amb els resultats de l'estudi de López-Olmeda i col. (2009). Un altre fet que va portar a considerar la importància de les respostes del ritme diari d'activitat i que es relaciona directament amb la ingesta de carbohidrats és que, l'increment en la deposició de glicogen en el fetge dels peixos alimentats amb els règims que contenien la dieta experimental, va ser especialment significatiu quan aquesta dieta s'ingeria a la tarda (règim Cd/Ed). En aquest grup es va produir, fins i tot, un augment de la mida de l'òrgan (major índex hepatosomàtic), un reflex de la gran quantitat d'incorporació de glucosa de la dieta. Observant els resultats, se'n poden extreure dos fets que evidencien l'aparició d'un ritme diari en la deposició de reserves en l'orada: per una banda, independentment del règim utilitzat i per tant, del nivell del nutrient, la composició del fetge de l'orada va presentar un augment dels nivells de glicogen i una disminució del contingut de proteïnes per la tarda; i per altra banda, la composició dels músculs vermell i blanc, en canvi, va presentar una disminució dels nivells de glicogen i un augment del contingut de proteïna muscular a la tarda.

L'estudi dels règims alimentaris permeté veure com l'orada respon a l'activitat diària no forçada respecte a l'aprofitament dels nutrients de la dieta. En els estudis anteriors, es demostrà que l'orada sotmesa a una activitat física aeròbica era capaç de millorar el destí dels nutrients de la dieta, augmentant l'ús dels carbohidrats i dels lípids com a font d'energia i promovent una major retenció de proteïnes de la dieta (Ibarz i col. 2011, Felip i col. 2013a). Sota les condicions de l'estudi d'activitat diària i règims alimentaris diferents, les retencions dels isòtops estables en els teixits van revelar que els canvis metabòlics postprandials de distribució i destí dels nutrients marcats (C^{13} -carbohidrat i N^{15} -proteïna) es deuen, en primer lloc, al règim alimentari, però condicionats també per l'últim àpat rebut. És a dir, la freqüència i la quantitat han estat determinants amb el destí dels marcadors. I així, després de 24 hores, els dos grups alimentats en l'última ingesta amb la dieta rica en carbohidrats i baixa en proteïna, van presentar menors retencions totals de C^{13} -midó. Aquest fet implica una activitat incrementada dels enzims glicolítics del fetge, ja observada en l'orada, quan aquesta és alimentada amb dietes riques en carbohidrats (Panserat i col. 2000; Caseras i col. 2002; Metón i col. 2004). Cal remarcar també que les diferències en la distribució del C^{13} , observades principalment en el fetge, es van donar entre els dos grups alimentats amb la dieta experimental sota diferents règims (un els ingeria al matí i els emprava durant el dia i l'altre els ingeria a la tarda i en disposava sobretot a la nit). Això demostra que l'orada és capaç d'adaptar el seu metabolisme no només a la composició de la dieta que ingereix, sinó també al moment del dia en que la rep, però a la vegada indica que es pot optimitzar quan la composició s'adequa als requeriments post-ingesta. Com que l'orada presenta més activitat durant el dia, també augmentaran durant aquest període les interconversions metabòliques i l'ús energètic dels nutrients no proteics.

En aquest estudi dels règims, quan la ingesta de proteïna va ser menor (és a dir, en els peixos que en un moment del dia eren alimentats amb la dieta experimental), es va observar una major retenció de N¹⁵-proteïna en el peix, especialment remarcable a la fracció proteica del múscul blanc. En els treballs de Carter i col. 1993a,b i McCarthy i col. 1994 s'indica que la reducció de l'entrada de proteïna amb la dieta, dins de certs límits, comporta taxes de conversió de l'aliment millorades, reflectint-se en majors taxes d'eficiència de creixement dels animals. Aquest fet, el relacionen, no pas amb taxes més elevades de síntesi, sinó amb baixes taxes de degradació proteica. En un mateix sentit, Moon i Foster (1995) suggereixen que les fonts alternatives d'energia, tal com els lípids i els carbohidrats, s'han d'utilitzar més eficientment durant els períodes de major activitat. Aquest fet faria innecessària una elevada degradació de les proteïnes en aminoàcids per contribuir, sobretot, a la formació de glucosa en el fetge. En el cas de l'estudi dels règims, l'eficiència de retenció de proteïnes en el múscul blanc de l'orada va en concordança amb el subministrament de proteïna en la dieta, i per això una reducció en la dieta es va compensar amb una retenció més eficient. A la vegada, es produïa un ús més gran d'energia provinent dels altres nutrients de la dieta, sobretot dels carbohidrats, en aquest cas concret. Com a conclusió d'aquest estudi s'ha demostrat que, la disminució de la proteïna de la dieta junt amb un augment dels carbohidrats no ha d'afectar negativament el creixement dels animals, sempre i quan els nutrients no proteics es subministrin abans o just al començar el període de major activitat dels animals. Només el grup que ingeria els carbohidrats a la tarda (Cd/Ed) va presentar un pes corporal més baix que els alimentats amb dieta comercial. El subministrament de la dieta baixa en proteïnes i rica en carbohidrats al matí no va afectar negativament a la incorporació de proteïnes de la dieta, ni a les composicions dels músculs, ni a les taxes de creixement. Aquests resultats concorden amb els dels treballs anteriors, on un requeriment augmentat de la demanda energètica en l'orada es pot cobrir mitjançant l'ús dels carbohidrats provinents de la dieta. Per tant, quan els peixos estan acostumats a rebre un alt nivell d'hidrats de carboni digeribles, es promou el seu ús com a font d'energia. I l'adequat subministrament de quantitats elevades de carbohidrats a la dieta pot estimular respostes fisiològiques equivalents a les de les condicions d'exercici: un estalvi proteic (Felip i col. 2013a), també la millora del creixement a través de la hiperplàsia del múscul (Ibarz i col. 2011) i l'estimulació de la funció del múscul blanc i la preservació del múscul vermell (Martín-Pérez i col. 2012).

Les conclusions que es poden extreure d'aquest darrer estudi són que l'orada, mostrant major activitat durant el dia, incrementa les interconversions metabòliques dels nutrients marcats, tot disminuint la retenció del C¹³ dels carbohidrats de la dieta i augmentant l'eficiència de retenció proteica, sobre tot en el múscul blanc. Quan la dieta rica en carbohidrats es donava al matí, no es va afectar negativament la incorporació de les proteïnes de la dieta, ni la composició dels músculs blanc i vermell, ni la taxa de creixement. Quan els peixos estaven habituats a menjar quantitats grans de carbohidrats digeribles, disminuïen la retenció i augmentaven el seu ús com a font d'energia. Així, una lleugera disminució de la ingesta diària de proteïnes va ser compensada amb una major eficiència de retenció. No obstant això, en les

condicions de l'estudi, els hidrats de carboni no van ser utilitzats tan eficientment a la tarda com al matí. Aquest fet però es podria relacionar també amb la diferència d'hores entre els àpats de les 10 h i les 17 h (7 hores durant el dia i 17 hores per la nit). Els canvis en la composició de la dieta requereixen també reajustar el subministrament de nutrients en paral·lel amb les demandes del peix, augmentant la proporció d'ingredients no proteics durant els períodes de més activitat.

Un pas més enllà... implicacions en el cultiu.

L'estalvi proteic no és només un estalvi econòmic en la formulació de les dietes o una millora de l'eficiència en la retenció proteica, sinó que cal tenir present que la proteïna és la font més important de nitrogen alliberada a les aigües, i per tant un focus de contaminació i d'impacte ambiental. L'aplicació pràctica dels resultats assolits la trobem en l'ús d'una dieta baixa en proteïnes i rica en carbohidrats digeribles, la qual es mostra més eficaç sota condicions d'activitat sostinguda i quan és subministrada en el moment adequat del ritme diari, és a dir, durant els períodes de més activitat dels animals. Si es pretén disminuir la quantitat d'energia proteica (per qüestions de sostenibilitat), es pot aconseguir sense que el creixement es vegi afectat i sense augmentar els costos de funcionament, sota les condicions de cultiu indicades.

Les implicacions científiques d'aquests resultats van més enllà d'uns estudis concrets en condicions controlades. Així, les investigacions futures haurien de dirigir-se a l'exploració de l'ús dels nutrients en dietes balancejades i que continguin diferents proporcions de nutrients no proteics (carbohidrats/lípids) com a font d'energia, juntament amb l'optimització de les condicions de natació sostinguda i de la freqüència i quantitat d'aliment diari en altres espècies de peixos. Aquí es pot indicar que estudis recents han relacionat el benestar animal amb el fet que estiguin sota condicions controlades d'exercici, ja que es veuen reduïdes les interaccions, l'agressivitat i l'estrès dels peixos (Palstra i Planas, 2011). És més, l'exercici podria beneficiar el potencial immunològic, incrementant la resistència a patògens (Magnoni i col. 2013).

6.1. BIBLIOGRAFIA

- Abdel I, López-Albors O, Ayala MD, García-Alcazar A, Abellán E, Latorre R, Gil F (2005)** Muscle cellularity at cranial and caudal levels of the trunk musculature of commercial size sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Anat Histol Embryol* 34:280-285.
- Alexis MN, Karanikolas KK, Richards RH (1997)** Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 151:209-218.
- Arzel J, Metailler R, Le Gall P, Guillaume J (1998)** Relationship between ration size and dietary protein level varying at the expense of carbohydrate and lipid in triploid brown trout fry, *Salmo trutta*. *Aquaculture* 162:259-268.
- Azzaydi M, Rubio VC, Martínez FJ, López FJM, Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA (2007)** Effect of restricted feeding schedule on seasonal shifting of daily demand-feeding pattern and food anticipatory activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chronobiol Int* 24:859-74.
- Beamish FWH i Medland TE (1986)** Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 55:35-42.
- Beltrán M, Fernández-Borrás J, Médale F, Pérez-Sánchez J, Kaushik S, Blasco J (2009)** Natural abundance of ¹⁵N and ¹³C in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquacult Nutr* 15:9-18.
- Bergot F (1979)** Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp Biochem Physiol A* 64:543-547.
- Blasco J, Fernández-Borrás J, Marimon I, Requena A (1996)** Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *J Comp Physiol B* 165:534-541.
- Blasco J, Marimon I, Viaplana I, Fernández-Borrás J (2001)** Fate of glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiol Biochem* 24:247-258.
- Boulos Z i Terman M (1980)** Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci Biobehav Rev* 4:119-131.
- Brauge C, Corraze G, Médale F (1995)** Effect of dietary levels of lipid and carbohydrate on growth-performance, body-composition, nitrogen-excretion and plasma-glucose levels in rainbow trout reared at 8-Degrees-C or 18-Degrees-C. *Reprod Nutr Dev* 35:277-290.
- Brauge C, Médale F, Corraze G (1994)** Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123:109-120.
- Bucking C i Wood CM (2005)** Renal regulation of plasma glucose in the freshwater rainbow trout. *J Exp Biol* 208:2731-2739.

- Caballero MJ, López-Calero G, Socorro J, Roo FJ, Izquierdo MS, Fernández AJ (1999)** Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179:277-290.
- Caballero MJ, Izquierdo MS, Kjørsvik E, Fernández AJ, Rosenlund G (2004)** Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *J Fish Dis* 27:531-541.
- Carter CG, Houlihan DF, Buchanan B, Mitchell AI (1993a)** Protein-nitrogen flux and protein growth efficiency of individual Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 12:305-315.
- Carter CG, Houlihan DF, Brechin J, McCarthy ID (1993b)** The relationship between protein intake and protein accretion, synthesis, and retention efficiency for individual grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Can J Zool* 71:392-400.
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F, Baanante IV (2002)** Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 88:607-614.
- Company R, Caldach-Giner JA, Perez-Sanchez J, Kaushik SJ (1999)** Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat Living Resour* 12:23-30.
- Coughlin DJ (2002)** Aerobic muscle function during steady swimming in fish. *Fish Fisher* 3:63-78.
- Cowey CB, de la Higuera M, Adron JW (1977)** The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr* 38:385-395.
- Daan S (1981)** Adaptive daily strategies in behavior. In: Aschoff J (Ed.), *Handbook of Behavioral Neurobiology 4: Biological Rhythms*. Plenum Press, New York, pp. 275-298.
- Davison W (1997)** The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp Biochem Physiol A* 117:67-75.
- Davison W i Goldspink G (1977)** The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the brown trout (*Salmo trutta*). *J Exp Biol* 70:1-12.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2006)** Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp Biochem Physiol A* 143:89-96.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2008)** Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 274:101-108.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2009)** Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol Biochem* 35:519-539.

- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Olive-Teles A (2011)** Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Rev Fish Sci* 19:201-215.
- Farrell AP, Johansen JA, Steffensen JF, Moyes CD, West TG, Suarez RK (1990)** Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size, and cardiac enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can J Zool* 68:1174-1179.
- Felip O, Ibarz A, Fernández-Borràs J, Beltrán M, Martín-Pérez M, Planas JV, Blasco J (2012)** Tracing metabolic routes of dietary carbohydrate and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using stable isotopes (¹³C-starch and ¹⁵N-protein): effects of gelatinization of starches and sustained swimming. *Br J Nutr* 107:834-844.
- Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J (2013a)** Beneficial effects of sustained activity on the use of dietary protein and carbohydrate traced with stable isotopes ¹⁵N and ¹³C in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Comp Physiol B* 183:223-234.
- Felip O, Blasco J, Ibarz A, Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J (2013b)** Diets labelled with ¹³C-starch and ¹⁵N-protein reveal daily rhythms of nutrients use in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* (Submitted).
- Furuichi M i Yone Y (1981)** The utilization of carbohydrate by fishes. 3. Change of blood-sugar and plasma-insulin levels of fishes in glucose-tolerance test. *Bull Jap Soc Scient Fish* 47:761-764.
- Gutiérrez J, Carrillo M, Zanuy S, Planas J (1984)** Daily rhythms of insulin and glucose levels in plasma of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after experimental feeding. *Gen Comp Endocrinol* 55:393-397.
- Gómez-Milán E, de Haro C, Sánchez-Muros MJ (2011)** Annual variations of the plasmatic levels of glucose and amino acid and daily changes under different natural conditions of temperature and photoperiod in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Fish Physiol Biochem* 37:583-592.
- Haman F, Zwingelstein G, Weber JM (1997)** Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273:2046-2054.
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A (2002)** Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult Nutr* 8:175-194.
- Houlihan DF i Laurent P (1987)** Effects of exercise training on the performance, growth, and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aquat Sci* 44:1614-1621.
- Huntingford FA (2010)** Exercise and welfare. In: Proceedings of the FitFish workshop on the swimming physiology of fish, Barcelona, 2-3 July, pp. 29.
- Ibarz A, Felip O, Fernández-Borràs J, Martín-Pérez M, Blasco J, Torrella JR (2011)** Sustained swimming improves muscle growth and cellularity in gilthead sea bream. *J Comp Physiol B* 181:209-217.

- Jørgensen EH i Jobling M (1993)** The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 116:233-246.
- Kaushik SJ i Oliva-Teles A (1985)** Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50:89-101.
- Kaushik SJ i Seiliez I (2010)** Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquac Res* 41:322-332.
- Kiessling A, Storebakken T, Asgard T, Kiessling KH (1991)** Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93:335-356.
- Laidley CW i Leatherland FJ (1988)** Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp Biochem Physiol A* 89:495-502.
- López-Olmeda JF, Egea-Álvarez M, Sánchez-Vázquez FJ (2009)** Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important?. *Physiol Behav* 96:631-636.
- Magnoni L i Weber JM (2007)** Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. *J Exp Biol* 210:4016-4023.
- Magnoni LJ, Crespo D, Ibarz A, Blasco J, Fernández-Borràs J, Planas JV (2013)** Effects of swimming on the red and White muscle transcriptome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a carbohydrate-rich diet. *Comp biochem Physiol A* (submitted).
- Martín-Pérez M, Fernández-Borràs J, Ibarz A, Millan-Cubillo A, Felip O, de Oliveira E, Blasco J (2012)** New insights into fish swimming: a proteomic and isotopic approach in gilthead sea bream. *J Proteome Res* 11:3533-3547.
- Mascarello F, Rowleron A, Radaelli G, Scapolo PA, Veggetti A (1995)** Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* L. I. Myosin expression and organization of fibre types in lateral muscle from hatching to adult. *J Muscle Res Cell Motil* 16:213-222.
- McCarthy ID, Houlihan DF, Carter CG (1994)** Individual variation in protein-turnover and growth efficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *P Roy Soc B- Biol Sci* 257:141-147.
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV (2004)** Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol B* 138:145-153.
- Milligan CL i Girard SS (1993)** Lactate metabolism in rainbow trout. *J Exp Biol* 180:175-193.
- Mistlberger R (1994)** Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Res* 18:171-195.
- Mistlberger R (2009)** Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *Eur J Neurosci* 30:1718-1729.

- Montoya A, López-Olmeda JF, Yúfera M, Sánchez-Muros MJ, Sánchez-Vázquez FJ (2010)** Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 306:315-321.
- Moon TW i Foster GD (1995)** Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Hochachka PW, Mommsen TP (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes; Metabolic biochemistry Vol. 4*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 65-100.
- Moon TW (2001)** Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B* 129:243-249.
- Moyes CD i West TG (1995)** Exercise metabolism of fish. In: Hochachka PW, Mommsen TP (Eds.), *Metabolic Biochemistry; Biochemistry and molecular biology of fishes Vol. 4*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 368-392.
- Ozorio ROA (2008)** Swimming activity and non-protein energy (NPE) metabolism in fish. *Curr Nutr Food Sci* 4:282-289.
- Palstra AP i Planas JV (2011)** Fish under exercise. *Fish Physiol Biochem* 37:259-272.
- Panserat S, Médale F, Blin C, Brèque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S (2000)** Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:1164-1170.
- Panserat S i Kaushik S (2002)** Régulation nutritionnelle du métabolisme glucidique chez les poissons: exemple de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), faible utilisatrice des glucides alimentaires. *INRA Prod Anim* 15:109-117.
- Panserat S, Hortopan GA, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerré D, Geurden I, Médale F, Kaushik S, Corraze G (2009)** Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294:123-131.
- Peres H, Gonçalves P, Oliva-Teles A (1999)** Glucose tolerance in Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179:415-423.
- Peres H i Oliva-Teles A (2002)** Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205:287-299.
- Rasmussen RS, Ostefeld TH, McLean E (2000)** Growth and feed utilisation of rainbow trout subjected to changes in feed lipid concentrations. *Aquacult Int* 8:531-542.
- Requena A, Fernández-Borràs J, Planas J (1997)** The effects of a temperature rise on oxygen consumption and energy budget in gilthead seabream. *Aquacult Int* 5:415-426.
- Sánchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Lupianez JA, De la Higuera M (1996)** Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Adaptive response of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to high carbohydrate/low-protein and high-fat/non-carbohydrate diets. *Aquacult Nutr* 2:193-200.

- Sánchez-Muros MJ, Corchete V, Suárez MD, Cardenete G, Gómez-Milán E, de la Higuera M (2003)** Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture* 224:89-103.
- Sánchez JA, López-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Sánchez-Vázquez FJ (2009)** Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiol Behav* 98:125-129.
- Sheridan MA (1988)** Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp Biochem Physiol B* 90:679-690.
- Spieler RE (1992)** Feeding entrained circadian rhythms in fishes. In: Ali MA (Ed.) Rhythms in Fishes. Plenum. Press. New York, pp. 137-147.
- Spisni E, Tugnoli M, Ponticelli A, Mordenti T, Tomasi V (1998)** Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *J Fish Dis* 21:177-184.
- Stickland NC (1983)** Growth and development of the muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Anat* 137:323-333.
- Stone DAJ (2003)** Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev Fish Sci* 11:337-369.
- Stone DAJ, Allan GL, Anderson AJ (2003)** Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac Res* 34:123-134.
- Totland GK, Kryvi H, Jødestøl KA, Christiansen EN, Tangeras A, Slinde E (1987)** Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during longterm sustained swimming. *Aquaculture* 66:299-313.
- Venou B, Alexis MN, Fountoulaki E, Nengas I, Apostolopoulou M, Castritsi-Cathariou I (2003)** 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* 225:207-223.
- Vergara JM, López-Calero G, Robaina L, Caballero MJ, Montero D, Izquierdo MS, Aksnes A (1999)** Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture* 179:35-44.
- Wang Y, Heigenhauser GJ, Wood CM (1994)** Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. *J Exp Biol* 195:227-258.
- West TG, Arthur PG, Suarez RK, Doll CJ, Hochachka PW (1993)** In vivo utilization of glucose by heart and locomotory muscles of exercising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 177:63-79.
- Wilson RP (1994)** Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124:67-80.
- Yogata H i Oku H (2000)** The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. *Fish Sci* 66:1100-1105.

7. CONCLUSIONS

7. CONCLUSIONS

1. La gelatinització afavoreix la disponibilitat dels carbohidrats en la truita irisada i el període d'hiperglucèmia molt perllongat que s'observà després de la ingesta elevada de carbohidrats, es va escurçar marcadament mitjançant l'exercici. Per tant, la natació sostinguda incrementa l'ús dels carbohidrats de la dieta i dels dipòsits de lípids i glicogen en els músculs en la truita irisada.
2. En la truita irisada sotmesa a exercici sostingut, una part significativa dels carbohidrats de la dieta van ser convertits a lípids en el fetge, i una altra part va ser oxidada en els músculs, especialment en el múscul vermell.
3. La major recuperació de N¹⁵ en el total del peix exercitat 24 h després de la ingesta forçada, principalment en la fracció proteica dels dos músculs (MV i MB), evidencia objectivament que la natació sostinguda augmenta la deposició de proteïnes en la truita irisada, resultant en un estalvi proteic.
4. Les dos espècies de peix presenten marcades diferències en l'ús de nutrients. L'orada té una capacitat considerable per usar els carbohidrats de la dieta per a la producció d'energia, presentant també un major recanvi (*turnover*) dels nutrients amb l'exercici.
5. Una major retenció de les proteïnes de la dieta (major deposició de N¹⁵ en el múscul blanc durant tot el període postprandial) sota condicions d'exercici sostingut, demostra un estalvi proteic (*sparing-effect*) per a l'ús de carbohidrats, evitant la deposició excessiva de lípids en l'orada.
6. El creixement hipertròfic del múscul blanc en activitat moderada i sostinguda, explica l'augment en el creixement de l'orada i és indicatiu de la producció d'un major filet.
7. Quan es combina la major activitat que l'orada presenta durant el dia amb la composició de la dieta, s'incrementen les interconversions metabòliques i l'eficiència de retenció proteica en el múscul blanc. Per això, l'administració d'una dieta rica en carbohidrats al matí no va perjudicar la incorporació de proteïnes de la dieta, ni la deposició en el múscul, ni el creixement.
8. Els isòtops estables van mostrar que els canvis metabòlics postprandials de distribució i destí dels nutrients marcats (C¹³-carbohidrat i N¹⁵-proteïna) són deguts al règim alimentari (nombre de menjars per dia i freqüència), però a la vegada estan condicionats per l'última ingesta rebuda.

Aplicacions pràctiques dels estudis:

9. L'exercici combinat amb la composició de la dieta contribueix a una reducció en la contaminació de l'aigua, degut a la major retenció de la proteïna de la dieta.
10. La reducció en el contingut de proteïna de la dieta va ser compensada amb major retenció proteica, però els carbohidrats no varen ser usats igual d'eficientment a la tarda que al matí.

8. ANEXOS

