



# Optimització de l'ús de la proteïna en dietes per a orada (*Sparus aurata*)

Albert Caballero Solares

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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 D'ECOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES DEL MAR

**OPTIMITZACIÓ DE L'ÚS DE LA PROTEÏNA EN  
DIETES PER A ORADA (*Sparus aurata*)**

Albert Caballero Solares

2015





FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT D'ECOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES DEL MAR

# OPTIMITZACIÓ DE L'ÚS DE LA PROTEÏNA EN DIETES PER A ORADA (*Sparus aurata*)

Memòria presentada per **Albert Caballero Solares** per optar al grau de doctor  
per la Universitat de Barcelona

Director i tutor:

Autor:

Dr. Felipe Fernández González

Albert Caballero Solares

2015



“Fish, you are going to have to die anyway. Do you have to kill me too?”

Ernest Hemingway (*The Old Man and the Sea*)



## AGRAÏMENTS

Aquesta tesi doctoral representa el final d'una llarga etapa, d'hores de feina immers en un projecte il·lusionant. No podria recordar en quin moment exacte vaig decidir que aquest era el següent pas a seguir, ni com, de cop i volta, vaig trobar-me pensant en beques, projectes i experiments que em conduïrien pel camí que ara conclou. El que sé del cert és que arribo a aquest punt amb satisfacció tot i els alts i baixos d'aquest trajecte i, sobretot, sentint un fort agraïment envers aquells que m'hi han acompanyat.

Tornar a Barcelona després de cinc anys a Canàries va ser la primera aventura i la Universitat de Barcelona, com a institució i com a casa, m'ho va posar més fàcil. El Màster en Ciències del Mar va ser el primer pas d'aquest camí, i em va permetre conèixer a molts dels que m'han acompanyat la resta d'aquest recorregut. Gràcies a tots aquells que em van brindar l'oportunitat de participar a les campanyes oceanogràfiques del Màster, especialment al Dr. Jordi Flos, la Dra. Montse Vidal, el Dr. Miquel Canals, el Dr. Antoni Calafat, la Dra. Creu Palacín i el Dr. Eduardo Mateos.

No hauria estat possible aventurar-me en aquesta travessa sense el suport econòmic de la beca APIF que em va ser concedida per la Universitat de Barcelona.

Tampoc puc oblidar l'acollida, el suport i els mitjans tècnics que han estat al meu abast durant aquests anys. Dins de la Universitat, les Unitats de Tècniques Separatives i d'Anàlisi de Metalls dels Centres Científics i Tecnològics de la UB, així com el Departament de Nutrició i Bromatologia de la Facultat de Farmàcia. Fora d'ella, l'empresa Piscimar (Burriana, Castelló) i l'Aquàrium de Barcelona, per la seva excel·lent disposició i per proveir-nos d'orades i aigua, respectivament.

Però si algú coneix bé l'esforç, el temps i la dedicació d'aquest projecte, són aquells que hi han pres part directament o que ho han viscut d'una manera més personal. Un sincer agraïment al meu Director, el Dr. Felipe Fernández, per haver-li donat l'oportunitat de treballar en recerca a un autèntic desconegut com era jo a la Facultat de Biologia, per la seva bona disposició, per escoltar les meves idees i pels seus savis consells al llarg de la tesi. A la Dra. Maribel Baanante i el Dr. Isidoro Metón, de qui tant he après. Gràcies per obrir-me les portes del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Farmàcia, on he passat innombrables hores envoltat de bona gent. És precisament aquí on he fet algunes de les més



grans amistats d'aquest camí. A Mari, el teu bon humor i la teva espontaneïtat feien menys rutinàries les hores de treball. A Marina, per les bones converses freaks mentre esperava que el COBAS fes la feina. A Iván, per formar-me en les tècniques i en les bones pràctiques al laboratori, *obrigado!* A Alberto, un gran company i amic dins i fora del laboratori. A Jonás, mai no havia sentit tant a parlar de política entre científics. I a tants d'altres que he conegut en aquest periple, ja sigui a Farmàcia (Diego, Anne, Ahmad, Isadora i Carlos), com a Biologia (Benedicte, Manuel, Irene, Lionel, Marco i Marlon).

Tot això no hauria estat possible sense l'empara i el suport incondicional dels meus pares, Ana i Antonio, el meu avi Miguel, així com de Máximo, Conxita i les meves germanes Bàrbara i Helena. Tampoc puc oblidar a la Ma Àngels, el Jordi i l'Alba, els diumenges a Begues alimentaven els meus ànims per a tota la setmana. Als amics de tota la vida: Toni, Eric, Eli, Mikel, Dailos i Esther, gràcies per distreure'm de les meves angoixes.

A la Maria, qui ha viscut de més a prop els alts i baixos d'aquest procés, qui ha estat el meu consol a les hores més fosques, la meva força i la meva inspiració, a ella li dedico aquesta tesi.

Per últim, un sincer agraïment a les orades que gentilmente van oferir els seus cossos a la ciència. Sense elles aquesta tesi no hauria estat possible.

## ABREVIATURES

6PGD	6-fosfogluconat deshidrogenasa
AABA	àcid $\alpha$ -aminobutíric
AAE	aminoàcids essencials
AANE	aminoàcids no essencials
ACC1	acetil-CoA carboxilasa isoforma 1
ADP	adenosina difosfat
Ala	alanina
AldoA	aldolasa A o fructosa bifosfat aldolasa
ALT	alanina aminotransferasa
AQC	aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat
ARG	arginina
ARNm	ARN missatger
AST	aspartat aminotransferasa
Asx	suma d'asparagina i aspartat
ATP	adenosina trifosfat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , albúmina de sèrum boví
CDA	coeficient de digestibilitat aparent
CDO	cisteïna dioxigenasa
CHO	carbohidrats
CO <sub>2</sub>	diòxid de carboni
CPA	concentrat proteic d'arròs
CPP	concentrat proteic de pèsol
CPS	concentrat proteic de soja
CSA	sulfinat de cisteïna
CSD	sulfinat de cisteïna descarboxilasa, CSA-descarboxilasa
Cys	cisteïna
DHAP	dihidroxiacetona fosfat
DTT	ditiotreitòl
EDTA	àcid etilendiamintetraacètic
F6P	fructosa-6-fosfat
FAS	<i>fattyacid synthase</i> , àcid gras sintasa
FBPasa	fructosa 1,6 bifosfatasa
FCR	<i>feed conversion ratio</i> , taxa de conversió de l'aliment
FFA	<i>free fatty acid</i> , àcids grassos lliures
FM	<i>fish meal</i> , farina de peix
G6P	glucosa-6-fosfat
G6Pasa	glucosa 6-fosfatasa
G6PD	glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
GDH	glutamat deshidrogenasa
GDHox	direcció de desaminació
GDHred	direcció d'aminació
GK	glucoquinasa
Gln	glutamina

GLS	glutaminasa
Glu	glutamat
Glx	suma de concentracions de glutamina i glutamat
Gly	glicina
GOx	glucosa oxidasa
GPDH	glicerol 3-fosfat deshidrogenasa
GPO	glicerolfosfat oxidasa
GS	glutamina sintetasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peròxid d'hidrogen
HCl	àcid clorhídric
HClO <sub>4</sub>	àcid perclòric
HIS	histinina
HK	hexoquinasa
HNO <sub>3</sub>	àcid nítric
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida d'alta eficàcia
HPS	hidrolitzat proteic de soja
IHS	índex hepatosomàtic
ILE	isoleucina
KCl	clorur de potassi
KHCO <sub>3</sub>	bicarbonat de potassi
LDH	lactosa deshidrogenasa
LEU	leucina
LPL	lipoprotein lipasa
LYS	lisina
MET	metionina
MgCl <sub>2</sub>	clorur de magnesi
MS-222	metansulfonat de tricaïna
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , diana de la rapamicina en mamífers
N	nitrogen
N <sub>2</sub>	nitrogen molecular
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfat de sodi
NaCl	clorur de sodi
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleòtid en forma oxidada
NADH	nicotinamida adenina dinucleòtid en forma reduïda
NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NaF	fluorur de sodi
NH <sub>3</sub>	amoníac
NH <sub>4</sub>	amoni
NO <sub>x</sub>	òxid de nitrogen
NSPs	<i>non-starch polysaccharides</i> , polisacàrids distints al midó
PC	piruvat carboxilasa
PEP	fosfoenolpiruvat
PEPCK	fosfoenolpiruvat carboxiquinasa, PEP carboxiquinasa
PFK-1	fosfofructoquinasa
PGI	glucosa 6-fosfat isomerasa
PGLS	6-fosfogluconolactonasa

PHE	fenilalanina
PK	piruvat quinasa
PMSF	fluorur de fenilmetilsulfonil
POD	peroxidasa
Pro	prolina
PV	proteïna vegetal
RG	retenció de greix
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , espècies reactives d'oxigen
RP	retenció proteica
Ser	serina
SGR	<i>specific growth rate</i> , taxa de creixement específica
TAU	taurina
TG	triglicèrids
THR	treonina
TPI	triosa fosfat isomerasa
Tris	tris (hidroximetil) aminometà
Tyr	tirosina
UV	ultraviolat
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	pentòxid de vanadi
VAL	valina



# INDEX

<b>RESUM</b>	<b>7</b>
<hr/>	
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>13</b>
<hr/>	
1.1. ELS REPTES DE L'AQUÍCULTURA	13
1.2. METABOLISME DE LA GLUCOSA EN PEIXOS	15
1.2.1. Aspectes generals del metabolisme de la glucosa	15
1.2.2. La regulació del metabolisme de la glucosa en peixos	17
1.3. METABOLISME DELS AMINOÀCIDS EN PEIXOS	19
1.3.1. Aspectes generals del metabolisme dels aminoàcids	19
1.3.2. Metabolisme dels aminoàcids en peixos	19
1.4. METABOLISME DEL GLUTAMAT I LA GLUTAMINA	22
1.4.1. Rellevància del glutamat i la glutamina en nutrició animal	23
1.5. INGREDIENTS VEGETALS COM A FONTS DE PROTEÏNA ALTERNATIVES A LA FARINA DE PEIX	25
1.5.1. Avantatges dels ingredients vegetals	27
1.5.2. Deficiències nutricionals dels ingredients vegetals	29
1.5.3. Factors antinutricionals dels ingredients vegetals	32
1.6. LA TAURINA: UN NUTRIENT ESSENCIAL EN LA DIETA DELS PEIXOS	34
1.6.1. Aspectes generals i funcions fisiològiques	34
1.6.2. La taurina com a additiu alimentari en dietes vegetals	35
<b>2. INTERÈS I OBJECTIUS</b>	<b>41</b>
<hr/>	
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>47</b>
<hr/>	
3.1. CONDICIONS DE MANTENIMENT DELS PEIXOS	47
3.2. PREPARACIÓ DE LES DIETES EXPERIMENTALS	49
3.3. ESQUEMA EXPERIMENTAL	50
3.4. SEGUIMENT DEL CREIXEMENT I LA INGESTA DE LES ORADES	52
3.5. SACRIFICI I PRESA DE MOSTRES	54
3.6. ANÀLISI DE LA COMPOSICIÓ CORPORAL	55
3.6.1. Humitat	55

3.6.2. Proteïna crua	55
3.6.3. Contingut de greix	55
3.6.4. Contingut de cendres	56
3.6.5. Anàlisi de la composició en aminoàcids de la dieta	57
3.7. CÀLCULS DE L'APROFITAMENT DE LA DIETA I L'ÍNDEX HEPATOSOMÀTIC	59
3.8. ANÀLISI DE METABÒLITS EN FETGE I SÈRUM	60
3.8.1. Determinació de glucosa i triglicèrids en sèrum	60
3.8.2. Determinació de glucogen i triglicèrids en fetge	61
3.8.3. Determinació de glutamat i glutamina en fetge	62
3.9. ACTIVITAT DELS ENZIMS DEL METABOLISME INTERMEDIARI HEPÀTIC	64
3.9.1. Preparació dels extractes de fetge	64
3.9.2. Determinació de l'activitat enzimàtica	64
3.9.2.1. Determinació de l'activitat glucoquinasa	64
3.9.2.2. Determinació de l'activitat fosfofructoquinasa	66
3.9.2.3. Determinació de l'activitat piruvat quinasa	68
3.9.2.4. Determinació de l'activitat fructosa 1,6-bifosfatasa	68
3.9.2.5. Determinació de l'activitat glucosa 6-fosfat deshidrogenasa	69
3.9.2.6. Determinació de l'activitat 6-fosfogluconat deshidrogenasa	70
3.9.2.7. Determinació de l'activitat alanina aminotransferasa	70
3.9.2.8. Determinació de l'activitat aspartat aminotransferasa	71
3.9.2.9. Determinació de l'activitat glutamat deshidrogenasa	71
3.10. EXPRESSIÓ GÈNICA DELS ENZIMS PER RT-QPCR	73
3.10.1. Aïllament de l'ARN missatger (ARNm)	73
3.10.2. Transcripció inversa	73
3.10.3. PCR quantitativa (qPCR)	74
3.11. ANÀLISI DE LA DIGESTIBILITAT I LA INGESTA DE NUTRIENTS DIGERIBLES	77
3.12. ANÀLISI ESTADÍSTICA	79
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>83</b>
<hr/>	
4.1. EFECTES NUTRICIONALS DE LA SUPLEMENTACIÓ DE GLUTAMINA I GLUTAMAT EN DIETES A BASE DE FARINA DE PEIX	83
4.1.1. Disseny de l'experiment	83
4.1.2. Resultats	86
4.1.3. Discussió	90

4.2.	INCLUSIÓ DE TAURINA EN DIETA A BASE DE PROTEÍNA D'ORIGEN VEGETAL	96
4.2.1.	Experiment 1	96
4.2.1.1.	Disseny de l'experiment	96
4.2.1.2.	Resultats	98
4.2.2.	Experiment 2	104
4.2.2.1.	Disseny de l'experiment	104
4.2.2.2.	Resultats	108
4.2.3.	Experiment 3	122
4.2.3.1.	Disseny de l'experiment	122
4.2.3.2.	Resultats	124
4.2.4.	Discussió	138
4.2.4.1.	Efectes de la taurina sobre el rendiment nutricional de les orades	138
4.2.4.2.	Efectes de la taurina sobre la digestibilitat de la matèria seca, la proteïna i el carboni de la dieta	140
4.2.4.3.	Efectes de la taurina sobre la digestibilitat del fòsfor de la dieta	142
4.2.4.4.	Efectes de la interacció de la taurina amb la farina de peix sobre la nutrició de les orades	143
4.2.4.5.	Efectes de l'hidrolitzat de soja sobre la nutrició de l'orada	146
4.2.4.6.	Rendiment nutricional de les orades alimentades amb dieta vegetal envers el control amb farina de peix	147
4.2.4.7.	Efectes de la taurina sobre el metabolisme intermediari al fetge de les orades	149
4.2.4.8.	Efectes de la substitució de la farina de peix sobre el metabolisme intermediari al fetge de les orades	154
4.3.	COMPLEMENTACIÓ D'UNA DIETA VEGETAL AMB GLUTAMAT	157
4.3.1.	Disseny de l'experiment	157
4.3.2.	Resultats	160
4.3.2.1.	Creixement, eficiència alimentària i composició corporal	160
4.3.2.2.	Digestibilitat aparent de la dieta, ingesta digerible i pèrdues fecals	161
4.3.2.3.	Metabòlits en sèrum i fetge	162
4.3.2.4.	Activitats d'enzims del metabolisme intermediari	163
4.3.3.	Discussió	166



4.3.3.1. Efectes del glutamat sobre el creixement, la ingesta i la retenció proteica	166
4.3.3.2. Efectes de la inclusió de proteïna vegetal i glutamat sobre la digestibilitat de la dieta	168
4.3.3.3. Efectes de la inclusió de proteïna vegetal i glutamat en dieta sobre la composició química de les orades	169
4.3.3.4. Efectes de la inclusió de proteïna vegetal i glutamat en dieta sobre el metabolisme de la glucosa i els aminoàcids en el fetge de les orades	170
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>177</b>
<hr/>	
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>183</b>
<hr/>	
<b>7. ANNEX</b>	<b>209</b>
<hr/>	

**RESUM**

---



## RESUM

Si vol consolidar-se com a explotació econòmicament i ecològicament sostenible, la piscicultura ha de deslligar-se de la pesca mitjançant la reducció del contingut de farina de peix als pinsos. Aquesta fita pot ser assolida ajustant la proporció de proteïna de la dieta als requeriments nutricionals dels peixos, o bé emprant fonts de proteïna vegetal. Per a optimitzar l'ús de la proteïna en dietes per a orada (*Sparus aurata*) es varen usar tres suplementos alimentaris: el glutamat, la glutamina i la taurina. En orades alimentades a base de farina de peix, el glutamat i la glutamina són més eficaços que el midó millorant l'ús de la proteïna ingerida per a creixement. La inclusió d'un 4% de glutamat en dieta a base de farina de peix o proteïna vegetal millora la retenció proteica en promoure l'activitat glucolítica al fetge de les orades. L'augment de la retenció proteica, conjuntament amb l'estimulació de la ingesta de pinso per part del glutamat, resulta en un major creixement en orades alimentades amb proteïna majoritàriament d'origen vegetal (el 90% de la proteïna de la dieta). Els nostres resultats de creixement i eficiència alimentaria assenyalen a la taurina com a nutrient essencial en dietes amb una elevada o total substitució de farina de peix per proteïna d'origen vegetal. En base al creixement, orades alimentades amb proteïna majoritàriament vegetal requereixen una inclusió de taurina en dieta d'entre el 0.52 i el 0.91%. En base a l'eficiència alimentària, aquest requeriment seria del 0.93%. La suplementació d'un 1% de taurina millora el creixement d'orades alimentades amb pinso a base de proteïna vegetal. Aquest increment del creixement deriva de l'estimulació de la ingesta de pinso i la millora de l'eficiència alimentària. La taurina també millora la digestibilitat del fòsfor de les dietes vegetals i, per tant, la ingesta de fòsfor digerible per part de les orades. A nivell metabòlic, la taurina incrementa l'activitat glucoquinasa al fetge de les orades alimentades amb dietes vegetals, alhora que disminueix la glucèmia. La taurina promou la lipòlisi en orada atès que en redueix la proporció de greix corporal. La presència en la dieta d'un 10% de proteïna procedent de farina contraresta l'acció lipolítica de la taurina, alhora que accentua els beneficis de la taurina sobre el creixement i l'eficiència alimentària. La inclusió d'un 6.5-6.6% d'hidrolitzat de proteïna de soja a la dieta afavoreix una major absorció de nutrients i millora el creixement d'orades alimentades amb proteïna exclusivament vegetal. En conclusió, segons els nostres resultats, el glutamat i la taurina representen dos additius alimentaris de gran valor per a la substitució de farina de peix per proteïnes d'origen vegetal i carbohidrats en dietes per a orada.

## RESUMEN

Si quiere consolidarse como explotación económica y ecológicamente sostenible, la piscicultura debe desligarse de la pesca mediante la reducción del contenido de harina de pescado en los piensos. Este objetivo puede alcanzarse ajustando la proporción de proteína de la dieta a los requerimientos nutricionales de los peces, o bien optando por fuentes de proteína vegetal. Para optimizar el uso de la proteína en dietas para dorada (*Sparus aurata*) se usaron tres suplementos alimenticios: el glutamato, la glutamina y la taurina. En doradas alimentadas a base de harina de pescado, el glutamato y la glutamina son más eficaces que el almidón mejorando el uso de la proteína ingerida para crecimiento. La inclusión de un 4% de glutamato en dieta a base de harina de pescado o proteína vegetal mejora la retención proteica al promover la glucólisis en el hígado de las doradas. El aumento de la retención proteica, conjuntamente con la estimulación de la ingesta de pienso por parte del glutamato, resulta en un mayor crecimiento en doradas alimentadas con proteína mayoritariamente de origen vegetal (el 90% de de proteína de la dieta). Nuestros resultados de crecimiento y eficiencia alimenticia señalan a la taurina como nutriente esencial en dietas con una elevada o total sustitución de harina de pescado por proteína de origen vegetal. En base al crecimiento, doradas alimentadas con proteína mayoritariamente vegetal requieren una inclusión de taurina en dieta de entre un 0.52 y un 0.91%. En base a la eficiencia alimenticia, este requerimiento sería del 0.93%. La suplementación de un 1% de taurina mejora el crecimiento de doradas alimentadas con pienso a base de proteína vegetal. Este incremento del crecimiento deriva de la estimulación de la ingesta de pienso y la mejora de la eficiencia alimenticia. La taurina también mejora la digestibilidad del fósforo de las dietas vegetales y, por tanto, la ingesta de fósforo digerible por parte de las doradas. A nivel metabólico, la taurina incrementa la actividad glucoquinasa en el hígado de las doradas alimentadas con dietas vegetales, al mismo tiempo que disminuye la glucemia. La taurina promueve la lipólisis en dorada dado que reduce la proporción de grasa corporal de éstas. La presencia en dieta de un 10% de proteína procedente de harina de pescado contrarresta la acción lipolítica de la taurina, a la vez que acentúa los beneficios de la taurina sobre el crecimiento y la eficiencia alimenticia. La inclusión de un 6.5-6.6% de hidrolizado de proteína de soja en la dieta favorece una mayor absorción de nutrientes y mejora el crecimiento de doradas alimentadas con proteína exclusivamente vegetal. En conclusión, según nuestros resultados, el glutamato y la taurina representan dos aditivos alimenticios de gran valor para la sustitución de harina de pescado por proteínas de origen vegetal y carbohidratos en dietas para dorada.

## ABSTRACT

To be economic and ecologically viable, fish farming must be freed from its dependence on fish meal. This goal can be achieved either by adjusting dietary protein content to fish nutritional requirements or by replacing fish meal by plant proteins. In order to optimize protein utilization in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) we tested three different feed additives: glutamate, glutamine and taurine. In gilthead sea bream fed on fish meal-based diets, glutamate and glutamine are more effective than starch improving dietary protein utilization for growth. The supplementation of 4% glutamate in diet based on fish meal or plant protein improves protein retention through the promotion of glycolysis in the liver of gilthead sea bream. Protein retention improvement, together with the stimulation of feed intake by glutamate supplementation, results in higher growth rates in fish fed on plant protein sources. Our results point to taurine as an essential nutrient to be included in diets with high or total fish meal replacement. On a growth basis, the optimal dietary taurine supplementation of gilthead sea bream is 0.52-0.91%. On a feed efficiency basis, gilthead sea bream have a dietary taurine requirement of 0.93%. The supplementation of 1% taurine improved the growth of sea bream fed on plant-based diets. This growth promotion is due to feed intake stimulation and the improvement of feed efficiency. Taurine also increases phosphorous digestibility in plant-based diets. At a metabolic level, taurine up-regulates glucokinase activity and decreases glycemia. Taurine also promotes lipolysis since it reduces the body fat content of gilthead sea bream. The presence of 10% dietary protein coming from fish meal counteracts taurine lipolytic action, but accentuates taurine benefits on fish growth and feed efficiency. The inclusion of 6.5-6.6% soy protein hydrolysate in plant-based diet leads to a higher nutrient absorption and increases fish growth. In sum, according to our results, glutamate and taurine are two useful feed additives for fish meal replacement with plant protein sources and carbohydrates in diets for gilthead sea bream.



## **1. INTRODUCCIÓ**

---





# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. ELS REPTES DE L'AQUÍCULTURA

Des dels anys 70, la cria i l'engreix de peixos en captivitat (piscicultura) ha anat guanyant pes com a font de proteïna d'alt valor nutricional per a la població mundial. Concretament, la producció piscícola ha crescut dels 3,5 milions de tones (Mt) l'any 1970 a les 66,6 Mt l'any 2012 (FAO, 2014). Les últimes dades oficials de la FAO parlen d'una taxa mundial de creixement del 6,2% al període 2000-2012, i no hi ha perspectives que aquesta tendència hagi de canviar al llarg dels propers anys.

Seguint el mateix raonament que va donar lloc a la creació de la ramaderia i l'agricultura, la consolidació de l'aqüicultura sembla el següent pas lògic des del model extractiu de la pesca, ecològicament més agressiva i de rendiment més subjecte a fenòmens climàtics, cap a un model més previsible i fàcil de planificar. No obstant, la farina de peix ha estat i continua sent la font preferent de proteïna de les dietes emprades en aqüicultura. Això implica que una part significativa (entorn del 14% l'any 2012) de les captures del sector pesquer han de ser destinades a la producció de farina de peix (FAO, 2014). Tant és així que l'aqüicultura és considerada corresponsable de la sobreexplotació de determinades pesqueries (Asche, 2008), especialment de petits pelàgics. Degut a l'alt requeriment proteic dels peixos de cultiu, el sector piscícola és un dels majors consumidors de farina de peix. Per tant, actualment la piscicultura no suposa una alternativa real a la pesca, atès que n'és dependent a través de la farina de peix. Aquest vincle pesca/aqüicultura ha estat batejat com a la trampa de la farina de peix o *fish meal trap*.

El sector aqüícola tendeix actualment a la reducció de l'ús de farina i l'oli de peix procedent de la pesca. El principal impulsor d'aquest canvi de tendència és la perspectiva de futur en el preu de la farina. Mentre la demanda de farina de peix creix de manera continua impulsada pel creixement de l'aqüicultura i del sector del porc i l'aviram, la producció pesquera porta des de principis dels anys 90 estancada en les 90 Mt de peix fresc (FAO, 2014). Conseqüentment, el preu de la farina de peix s'ha incrementat dels 300-400 USD/t a principis dels 90, als 1600-1800 USD/t actuals (Asche et al., 2013; YCharts, 2012). Les estimacions de la FAO indiquen un augment del preu de la farina de peix del 13 al 29% cap a l'any 2030.

A fi de reduir la incorporació de farina de peix als pinsos emprats en aqüicultura, tant productors com científics avaluen fonts de proteïna alternatives. Una estratègia àmpliament reconeguda és l'ús de residus de peixos procedents de l'elaboració de productes per a l'alimentació humana. En aquest sentit, l'any 2012 aquests subproductes contribuïren en un 35% a la producció mundial de farina de peix, i el pronòstic és que aquest percentatge s'incrementi a mitjà i llarg termini (FAO, 2014). Una altra alternativa a la farina de peix la representen les farines de carn, fabricades a partir de residus d'escorxadors i carnisseries. Malauradament, la qualitat d'aquests ingredients és molt variable i depèn de la seva proporció de minerals i del procés d'elaboració, atès que normalment són tractats a temperatures elevades, la qual cosa pot comprometre el valor nutricional del contingut proteic (Guillaume and Blanco, 2004). Per la seva àmplia disponibilitat en el mercat mundial i el seu baix preu, les farines i ingredients vegetals representen una alternativa prometedora a la farina de peix. No obstant, els ingredients vegetals presenten característiques nutricionals que limiten la seva inclusió en dietes per a peixos (Gatlin et al., 2007). Tot i així, tal i com es detallarà en propers apartats, els avenços en nutrició de peixos ja permeten substitucions efectives de farina de peix de fins el 75%.

La recerca en nutrició de peixos també ha dedicat grans esforços a la comprensió del particular paper que juguen els carbohidrats en el metabolisme dels peixos. Explicat de forma breu, els peixos utilitzen els carbohidrats de la dieta de manera poc eficient, la qual cosa en limita la seva inclusió (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012; Wilson, 1994). Tot i que encara resten aspectes per esclarir al voltant del metabolisme de la glucosa en peixos, hi ha un consens general que, a diferència dels mamífers, els peixos depenen en major mesura del catabolisme dels aminoàcids per a satisfer les seves demandes energètiques. L'estudi dels requeriments proteics i energètics dels peixos ha permès ajustar la proporció de proteïnes de la dieta (Cho, 1992; Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999). El metabolisme aminoacídic en peixos és un procés summament eficient (Ballantyne, 2001), adaptat a l'oxidació preferent d'aminoàcids no essencials i d'aquells subministrats en excés per la dieta (Abboudi et al., 2009; Conceição et al., 2002; Kim et al., 1992; Rønnestad et al., 2003). Així doncs, l'adequació del perfil d'aminoàcids als requeriments dels peixos facilitaria també l'estalvi de proteïnes i permetria una major inclusió de carbohidrats. Com és evident, una reducció del contingut proteic a les dietes aqüícoles suposaria una menor inclusió de farina de peix, alhora que reduiria l'excreció de compostos nitrogenats al medi a conseqüència de l'oxidació d'aminoàcids.

## 1.2. METABOLISME DE LA GLUCOSA EN PEIXOS

### 1.2.1. Aspectes generals del metabolisme de la glucosa

L'homeòstasi de la glucosa és controlada fonamentalment pel fetge mitjançant el balanç de dues vies metabòliques oposades: la glucòlisi i la gluconeogènesi (Figura 1). La glucòlisi degrada la glucosa a piruvat a través d'una complexa sèrie de reaccions enzimàtiques. L'energia alliberada per aquesta reacció és emmagatzemada en forma de molècules ATP d'alta energia. L'activitat de la major part d'aquests enzims ve determinada per la concentració de substrats i productes. No obstant això, hi ha tres reaccions que no són reversibles sota aquestes condicions. Aquestes són la fosforilació de glucosa a glucosa 6-fosfat per les hexoquinases (HK, EC 2.7.1.1), la fosforilació de fructosa 6-fosfat a fructosa 1,6-bifosfat per la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1, EC 2.7.1.11), i la desfosforilació del fosfoenolpiruvat (PEP) a piruvat per la piruvat quinasa (PK, EC 2.7.1.40). Les activitats d'aquests tres enzims són regulades per molècules diferents als substrats i als productes.

Com a resposta a l'excés de glucosa postprandial, el fetge la polimeritza en glucogen o bé la converteix en lípids. La reserva de glucosa continguda al glucogen és fàcilment mobilitzable quan hi ha necessitat metabòlica, com per exemple en condicions de dejú. Tanmateix, en condicions de dejú, els requeriments de glucosa també poden ser satisfets a través de la síntesi *de novo* de glucosa, altrament anomenada gluconeogènesi. La gluconeogènesi genera glucosa a partir de productes de la glucòlisi i intermediaris del cicle de Krebs. Els aminoàcids entren a la via gluconeogènica directament, prèvia transaminació a piruvat o oxaloacetat, o indirectament a través de la degradació a intermediaris del cicle de Krebs. La gluconeogènesi és catalitzada pels mateixos enzims que la glucòlisi amb l'excepció de tres reaccions. Aquestes són la conversió del piruvat a PEP per part de la piruvat carboxilasa (PC, EC 6.4.1.1) i la PEP carboxiquinasa (PEPCK, EC 4.1.1.32), la desfosforilació de la fructosa 1,6-difosfat a fructosa 6-fosfat per la fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11) i, finalment, la desfosforilació de la glucosa 6-fosfat a glucosa per la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa, EC 3.1.3.9).

Segons els requeriments de la cèl·lula, els intermediaris de la glucòlisi i la gluconeogènesi poden ser destinats a la producció de cofactors NADPH i ribosa 5-fosfat a la via de la pentosa fosfat (Figura 1). Dins d'aquesta via metabòlica es poden identificar dues fases, una oxidativa i una altra no oxidativa. En la fase oxidativa, la glucosa 6-fosfat és oxidada a ribulosa 5-fosfat per tres reaccions consecutives catalitzades per la glucosa 6-fosfat

deshidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49), la 6-fosfogluconolactonasa (PGLS, EC 3.1.1.31) i la 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD, 1.1.1.43). La principal funció d'aquesta fase és la generació de NADPH per a la biosíntesi de lípids i colesterol. En canvi, els enzims de la fase no oxidativa es modulen per a respondre a les necessitats de NADPH, ribosa 5-fosfat i ATP. En aquest sentit, la ribulosa 5-fosfat generada a la fase oxidativa pot ser isomeritzada a ribosa 5-fosfat per a la síntesi de nucleòtids. En cas contrari, si es precisen més cofactors NADPH o ATP, la ribulosa 5-fosfat és metabolitzada a intermediaris de la glucòlisi com la fructosa 6-fosfat i el gliceraldehid 3-fosfat.

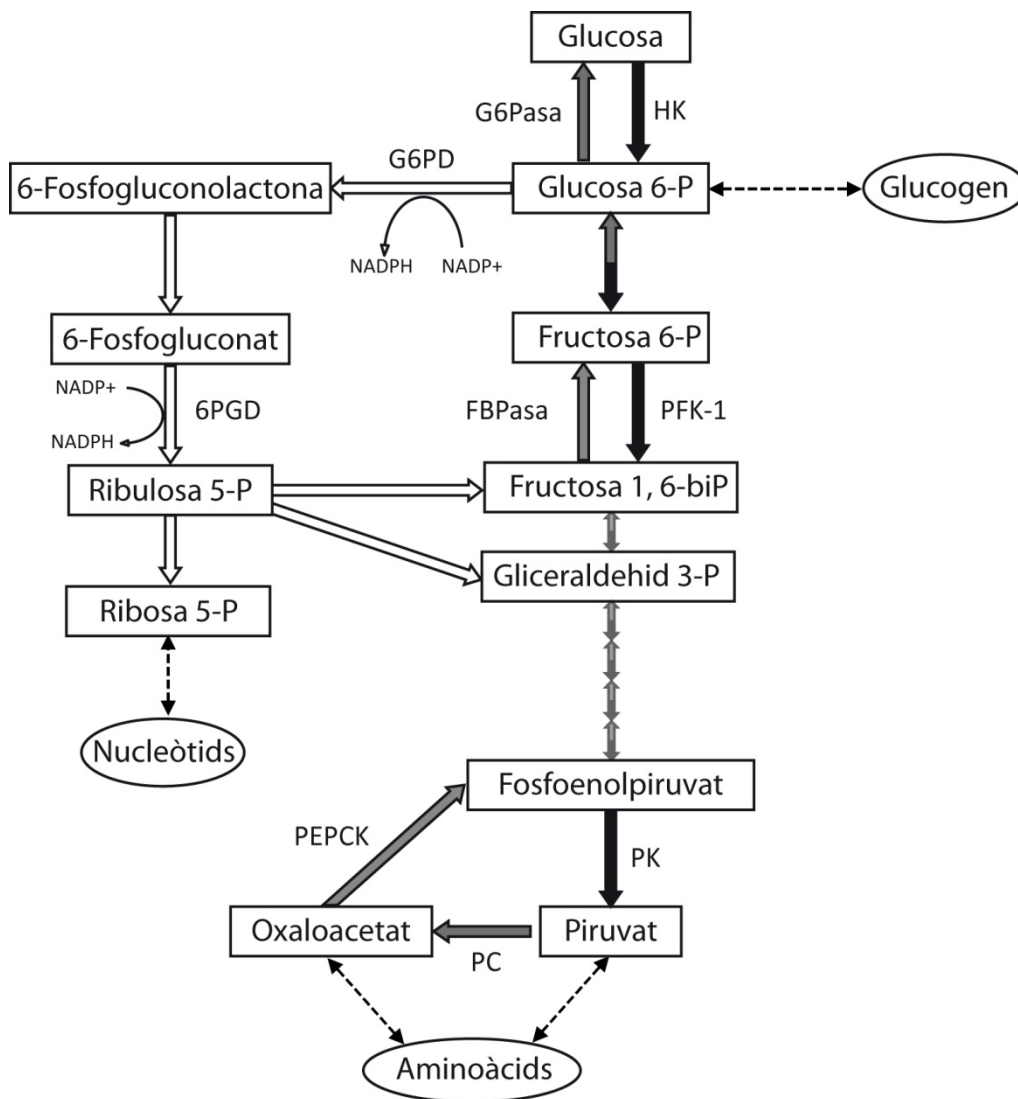


Figura 1. Mapa conceptual de la glucòlisi, la gluconeogènesi i la via de la pentosa fosfat. Les reaccions directes de la glucòlisi són indicades amb fletxes negres, les gluconeogèniques en gris, i les corresponents a la via de la pentosa fosfat en blanc. Les reaccions de la glucòlisi i la gluconeogènesi catalitzades per un mateix enzim són indicades amb una fletxa meitat negra meitat grisa. Les fletxes negres discontinuïtes mostren relacions amb la síntesi/degradació d'altres metabòlits.

### 1.2.2. La regulació del metabolisme de la glucosa en peixos

És ben coneguda la ineficiència dels peixos (especialment els carnívors) a l'hora de metabolitzar l'excés de glucosa procedent de la dieta. Els primers tests de tolerància a la glucosa realitzats en peixos ja exemplificaren aquest tret. Si en humans la glucosa en sang retorna a valors basals d'una a dues hores després de la ingesta, en peixos la hiperglucèmia pot durar més de set hores (Palmer and Ryman, 1972). La ingesta de dietes riques en carbohidrats també deriven en hiperglucèmies postprandials prolongades en peixos (Enes et al., 2009). La capacitat per a metabolitzar els carbohidrats de la dieta varia entre espècies i es relaciona amb l'hàbitat i la seva dieta natural. Així doncs, els peixos omnívors i d'aigua dolça presenten majors capacitats que els peixos carnívors i d'aigua salada (Wilson, 1994).

Els nombrosos estudis publicats sobre el metabolisme de la glucosa en peixos evidencien que aquests disposen de la mateixa bateria d'enzims que els mamífers (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012; Wilson, 1994). Durant molt de temps, el deficient control dels nivells glucèmics als peixos havia estat atribuït, en part, a la manca d'activitat glucoquinasa (GK, EC 2.7.1.2) al fetge (Wilson, 1994). La GK és una isoforma d'hexoquinasa que es caracteritza per la seva baixa afinitat a la glucosa, i que s'expressa al fetge de mamífers així com al dels peixos, tal com han demostrat diferents estudis amb orada (Caseras et al., 2000; Caseras et al., 2002), halibut (Tranulis et al., 1997), salmó atlàntic (Tranulis et al., 1996), truita irisada i carpa (Panserat et al., 2000a).

Les causes de l'ús ineficient dels carbohidrats de la dieta semblen ser derivades dels mecanismes sistèmics i cel·lulars que modulen la degradació i la síntesi de glucosa. Malgrat que el funcionament d'aquests mecanismes encara és motiu de debat i recerca, han estat vàries les hipòtesis proposades. Una de les primeres hipòtesis fou la possibilitat que els peixos presentessin nivells inadequats d'insulina. Aquesta hipòtesi va ser aviat descartada en comptar amb anticossos adequats per a determinar el nivells d'insulina en plasma (Gutierrez et al., 1984; Thorpe i Ince, 1976). Així, els peixos presenten nivells d'insulina similars o superiors als observats en mamífers (Mommsen i Plisetskaya, 1991; Plisetskaya, 1998).

La insulina protagonitza gran part dels desequilibris del control glucèmic en peixos. D'una banda, la secreció d'insulina no respon adequadament a la glucèmia postprandial (Navarro et al., 2002; Polakof et al., 2011). És més, diferents estudis constaten que la secreció d'insulina és induïda amb la ingesta independentment del contingut de carbohidrats d'aquesta (Capilla et al., 2004; del Sol Novoa et al., 2004; Seiliez et al., 2008). En canvi, la glucosa sí és

efectiva reduint l'excreció de glucagó (del Sol Novoa et al., 2004; Milgram et al., 1991). D'altra banda, la insulina sembla tenir un paper menor en la regulació de la glucòlisi i la gluconeogènesi (Enes et al., 2009). Si bé és cert que en peixos l'activitat GK respon proporcionalment a la ingesta de carbohidrats (Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999), aquesta no sembla ser induïda per l'acció directa de la insulina (Borrebaek et al., 2003; Capilla et al., 2003). Pel que fa als enzims gluconeogènics, els diferents experiments realitzats en peixos no són conclusius de cara al paper de la insulina (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012). Per contra, en aquests mateixos experiments el glucagó es mostra clarament com a inductor de la gluconeogènesi en peixos.

### 1.3. METABOLISME DELS AMINOÀCIDS EN PEIXOS

#### 1.3.1. Aspectes generals del metabolisme dels aminoàcids

Una majoria d'aminoàcids són desaminats mitjançant reaccions de transaminació. En aquestes reaccions, el grup amino de l'aminoàcid és transferit a un  $\alpha$ -ceto àcid per produir un nou aminoàcid i l' $\alpha$ -cetoàcid corresponent a l'aminoàcid original (Figura 2). Aquestes reaccions són catalitzades per enzims anomenats transaminases. El principal  $\alpha$ -cetoàcid acceptor de grups amino és  $\alpha$ -cetoglutarat, l'aminació del qual resulta en glutamat. La transaminació no comporta una desaminació neta. La desaminació directa es produeix principalment a través de la degradació del glutamat per la glutamat deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2). Un cop desaminats, els esquelets carbonats dels aminoàcids s'incorporen al cicle de Krebs, des d'on poden ser degradats a  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  o bé derivats a la gluconeogènesi prèvia transformació a oxaloacetat.

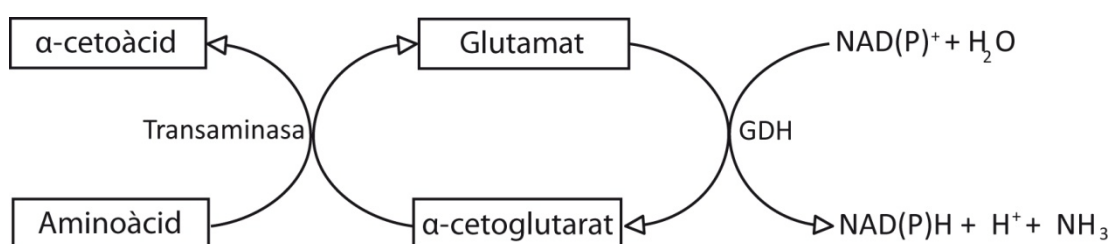


Figura 2. Esquema de la reacció de transaminació d'un aminoàcid catalitzada per una transaminasa, i la posterior desaminació del glutamat per acció de la glutamat deshidrogenasa (GDH).

#### 1.3.2. Metabolisme dels aminoàcids en peixos

Més del 80% dels peixos són carnívors i requereixen alts continguts de proteïna a la dieta, depenent de l'espècie d'un 35 a un 55% (Ballantyne, 2001). La naturalesa predominantment carnívora dels peixos queda reflectida en un metabolisme adaptat a emprar aminoàcids com a principal substrat energètic i gluconeogènic (Ballantyne, 2001; de Silva i Anderson, 1995). En el cas dels teleostis, el catabolisme dels aminoàcids és promogut pel fet que no precisen gastar energia convertint l'amoni en urea, ja que aquests l'excreten directament al medi a través de les brànquies (de Silva i Anderson, 1995; Kaushik i Seiliez, 2010). Així mateix, la conversió de la proteïna ingerida en proteïna somàtica és molt més



eficient en peixos que no en aus i mamífers (Tacon i Cowey, 1985). En contrast amb l'eficient ús dels aminoàcids, la despesa energètica per a la síntesi de proteïna és més elevada en peixos que en mamífers (Kaushik i Seiliez, 2010). En hepatòcits de truita irisada, prop d'un 80% del consum total d'oxigen seria invertit a la síntesi proteica (Pannevis i Houlihan, 1992). Tot i que aquests dos fets semblen en sí una contradicció, convé recordar que el guany en massa muscular és el principal contribuïdor al creixement dels peixos (Mommsen, 2001).

Segons argumentat per Kaushik i Seiliez (2010), la manca de control del catabolisme aminoacídic podria ser el principal factor dels elevats requeriments de proteïna en peixos. No obstant, diferents estudis realitzats en peixos assenyalen una modulació dels enzims del metabolisme dels aminoàcids en resposta de la composició de la dieta. La reducció de la relació proteïna/carbohidrat de la dieta ha demostrat reduir les activitats AST i ALT al fetge de l'orada (Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999), de *Rhamdia quelen* (Bibiano Melo et al., 2006) i de la tilapia (Gaye-Siessegger et al., 2006). Tot i ser capaços de regular el seu metabolisme, possiblement els peixos continuen presentant majors taxes d'oxidació d'aminoàcids que els mamífers. En aquest sentit, a la truita irisada la leucina és oxidada a un ritme dos cops superior al que s'ha observat en mamífers (Fauconneau i Arnal, 1985).

En peixos, el fetge és l'òrgan central en la regulació del metabolisme aminoacídic (Van den Thillart i van Raaij, 1995), de la mateixa manera que ho és en mamífers (Brosnan, 2003). A diferència dels mamífers, però, la taxa d'oxidació dels aminoàcids supera amb escreix la d'incorporació a glucosa a través de la via gluconeogènica (Ballantyne, 2001). En mamífers, l'oxidació completa dels aminoàcids al fetge produiria més ATP del realment requerit per l'animal (Brosnan, 2003), per la qual cosa tendeixen a metabolitzar-los a glucosa. En canvi, en peixos carnívors com el salmó atlàntic, les taxes d'oxidació d'aminoàcids com l'alanina arriben a superar en 10 cops la taxa d'incorporació en glucosa (Mommsen et al., 1985). Amb tot, i com exemple del rol d'aquests compostos al metabolisme dels peixos, els aminoàcids són precursors preferents per a la síntesi de glucosa (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012) i de lípids endògens (Nagai i Ikeda, 1972, 1973).

S'han aconseguit grans progressos en l'optimització de la retenció de la proteïna de la dieta. Una de les estratègies més comunes ha estat manipular la relació proteïna/energia de la dieta. La reducció de la relació proteïna/energia mitjançant nutrients no nitrogenats ha demostrat promoure la retenció proteica en peixos, així com reduir l'excreció de nitrogen soluble al medi (Dias et al., 1998; Kaushik i Seiliez, 2010). Els greixos són fàcilment digerits i

metabolitzats pels peixos. No obstant, nivells massa elevats en dieta poden derivar en una acumulació excessiva de greixos corporals i en un menor creixement (McGoogan i Gatlin III, 1999, 2000). Com ja s'ha detallat anteriorment, la incorporació de carbohidrats es veu limitada per la naturalesa carnívora del metabolisme hepàtic dels peixos.

Els requeriments en aminoàcids essencials són coneguts per a un grup relativament reduït d'espècies, entre elles l'orada. Els reptes nutricionals amb els quals es troba l'aqüicultura són nombrosos, com també ho és la varietat d'espècies criades i engreixades actualment. Per tant, tot sovint la comunitat científica no abasta a determinar els requeriments nutricionals de cadascuna de les espècies. A més a més, resulta difícil establir una metodologia estandarditzada per aquests tipus d'experiments. El requeriment en un aminoàcid essencial està summament condicionat per la composició química i la formulació de la dieta (Kaushik i Seiliez, 2010). Una de les assumpcions de l'estudi de la nutrició de peixos és que els requeriments en aminoàcids essencials s'ajustarien a la pròpia composició del peix. No obstant, el perfil d'aminoàcids essencials del cos dels peixos guarda molta més similitud entre espècies que no pas els requeriments nutricionals (Kaushik i Seiliez, 2010).

Pocs experiments han tractat la influència dels aminoàcids no essencials sobre aquests requeriments (Kaushik i Seiliez, 2010). Conèixer el requeriment dels aminoàcids essencials no és tan evident com podria semblar. Alguns aminoàcids essencials són transformats en no essencials si aquests darrers manquen (de Silva i Anderson, 1995). Com a resultat, el requeriment de la dieta d'un àcid essencial pot reflectir la suma del seu propi requeriment i del d'altres aminoàcids no essencials dels quals és precursor. Un balanç adequat entre aminoàcids essencials i no essencials ha demostrat millorar la retenció proteica en diferents espècies de peix (Aragão et al., 2004; Gómez-Requeni et al., 2003; Green et al., 2002).

#### 1.4. METABOLISME DEL GLUTAMAT I LA GLUTAMINA

La glutamina i el glutamat són dos aminoàcids no essencials (AANE) considerats avui en dia com a aminoàcids funcionals degut a la seva rellevància en la fisiologia i metabolisme dels animals (Rezaei et al., 2013; Wu, 2010).

El glutamat juga un rol clau en el metabolisme aminoacídic a través de la seva conversió en  $\alpha$ -cetoglutarat o en altres AANE (Figura 3), per mitjà de diverses transaminases i la glutamat deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2) (Brosnan, 2000; Brosnan i Brosnan, 2009). Mitjançant aquests enzims, els esquelets de carboni dels aminoàcids poden emprar-se per alimentar el cicle de Krebs o poden ser desviats cap a la producció de glucosa a través de la via gluconeogènica. A més a més, el glutamat és un important precursor del glutatió, un dels principals antioxidants intracel·lulars, i actua com a molècula senyalitzadora de la regulació de l'apetit, de la digestió i del funcionament del sistema nerviós central del mamífers (Brosnan i Brosnan, 2013; Burrin i Stoll, 2009; Torii et al., 2013).

Per altra banda, la glutamina pot ser sintetitzada a partir del glutamat per la glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2), i degradada a glutamat per la glutaminasa (GLS, EC 3.5.1.2) (Newsholme et al., 2003). En mamífers, la síntesi i el catabolisme de la glutamina participen al manteniment de l'homeòstasi àcid-base i de l'amoni (Taylor i Curthoys, 2004). La glutamina resulta quasi essencial per a la proliferació de cèl·lules com a substrat energètic i com a precursora de nucleòtids purínics i pirimidínics (Li et al., 2009b; Wu et al., 2011). La recerca en mamífers ha revelat que el metabolisme de la glutamina activa la diana de rapamicina mTOR (en anglès *mammalian target of rapamycin*), una Ser/Thr proteïna quinasa implicada en el creixement cel·lular, el metabolisme i la síntesi proteica (Durán i Hall, 2012; Fumarola et al., 2005; Wu et al., 2013).

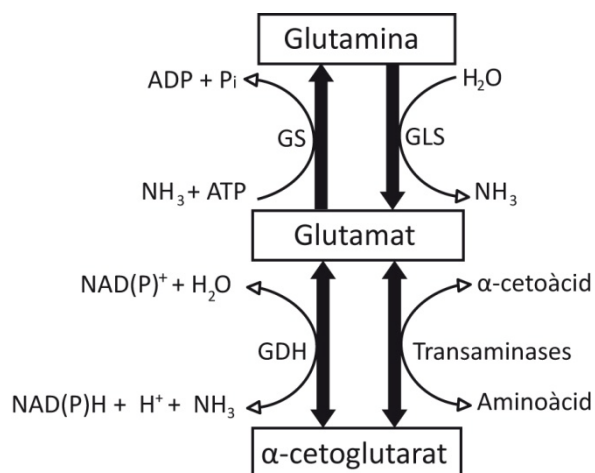


Figura 3. Mapa conceptual del metabolisme del glutamat i la glutamina. Les transaminases i la glutamat deshidrogenasa (GDH) controlen la conversió de  $\alpha$ -cetoglutarat en glutamat i viceversa. La glutamina sintetasa (GS) catalitzen la unió d'un grup amino ( $\text{NH}_3$ ) en glutamat per a formar glutamina. La glutamina deshidrogenasa (GLS) catalitza la conversió de la glutamina en glutamat amb la concomitant alliberament d'amoni ( $\text{NH}_3$ ).

#### 1.4.1. Rellevància del glutamat i la glutamina en nutrició animal

La recerca dels requeriments d'aminoàcids en peixos s'ha centrat habitualment en els aminoàcids essencials (AAE), doncs aquests no poden ser sintetitzats per animals i la seva deficiència afecta negativament el creixement del peix, així com la salut i el desenvolupament (Li et al., 2009b). No obstant això, cada cop són més els estudis que evidencien un paper clau dels aminoàcids no essencials (AANE) en la nutrició dels peixos. Com s'ha pogut comprovar amb diferents espècies de peixos, uns nivells òptims d'AANE milloren l'ús de la proteïna de la dieta i el creixement (Green et al., 2002; Peres i Oliva-Teles, 2006; Schuhmacher et al., 1995). Certament, són diversos els estudis que indiquen que uns nivells adequats d'AANE estalvien part dels AAE de ser oxidats pel peix (Abboudi et al., 2009; Conceição et al., 2002; Kim et al., 1992; Rønnestad et al., 2003). Malgrat que hi ha pocs estudis entorn al rol metabòlic d'un AANE específic, els resultats publicats a dia d'avui indiquen que vies metabòliques com la gluconeogènesi i la lipogènesi poden resultar-ne afectades (Figueiredo-Silva et al., 2010; Kirchner et al., 2003; Moyano et al., 1991).

L'efecte de complementar dietes amb glutamat i glutamina ha estat prèviament estudiat en mamífers, principalment en garrins. Per contra, el nombre d'estudis en peixos és més aviat escàs. En ambdós casos, la major part de la recerca publicada en aquest camp es centra en el seu rol com a font energètica als intestins (Ando, 1988; Blachier et al., 2009; Burrin i Stoll, 2009; Reeds et al., 2000), i els efectes beneficiosos sobre el manteniment de l'estructura i la funció intestinal (Cabrera et al., 2013; Cheng et al., 2011; Cheng et al., 2012; Pohlenz et al., 2012; Qiyu et al., 2011; Rezaei et al., 2013; Wu et al., 2011; Yan i Qiu-Zhou, 2006). No obstant, una part significant del glutamat i la glutamina absorbida per l'intestí aconseguiria arribar al fetge (Brosnan, 2003), el principal òrgan involucrat en la regulació del metabolisme de l'animal en resposta a la composició de la dieta.

Diferents investigacions en garrins han demostrat clarament que la suplementació amb glutamina i glutamat millora l'eficiència de l'aliment i el creixement de l'animal, mentre que l'efecte en el creixement de peixos no és encara conclouent. Pel que fa a la suplementació amb glutamat, hi ha resultats contradictoris; alguns estudis informen d'un augment del creixement als peixos (Hughes, 1985; Oehme et al., 2010), altres parlen de reducció (Fauconneau, 1988; Figueiredo-Silva et al., 2010; Mambrini i Kaushik, 1994), i finalment n'hi ha que assenyalen una manca d'efecte. Contràriament, la major part dels estudis publicats suggereixen que la glutamina actua com a promotor del creixement en peixos (Cheng et al., 2012; Qiyu et al., 2011; Schuhmacher et al., 1995; Wang et al., 2011; Yan i Qiu-Zhou, 2006).

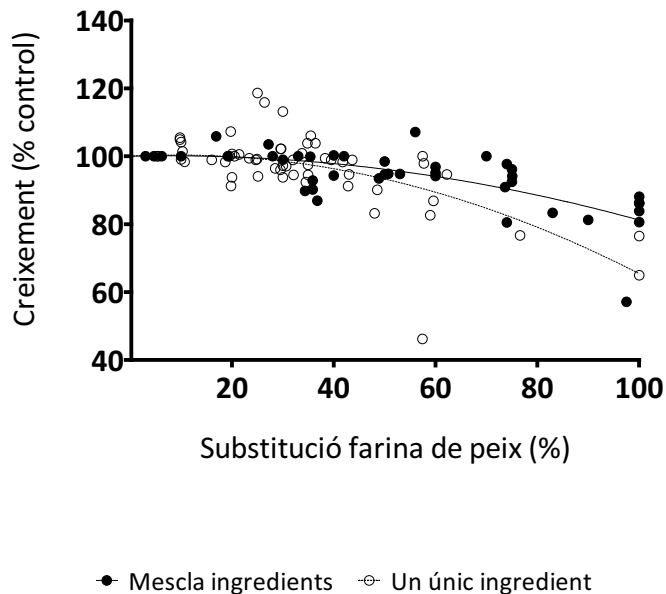
## 1.5. INGREDIENTS VEGETALS COM A FONTS DE PROTEÏNA ALTERNATIVES A LA FARINA DE PEIX

Si vol consolidar-se com a explotació econòmicament i ecològicament sostenible, la piscicultura ha de deslligar-se de la pesca a través de la substitució de la farina de peix per altres fonts de proteïna. D'igual manera que la ramaderia s'abasteix de productes agrícoles per a alimentar el bestiar, l'aqüicultura també hauria de formular dietes amb ingredients la producció dels quals pugui ser planificada i predictable. Des d'aquesta perspectiva, sembla lògic pensar que aquests mateixos productes agrícoles podrien ser inclosos en pinsos per a peixos. No obstant, la seva idoneïtat com alternatives a la farina de peix dependrà, per una banda, que la seva composició nutricional s'ajusti a les necessitats fisiològiques del peix i, per l'altra banda, que siguin àmpliament disponibles en el mercat i a preus competitiu.

Ja a mitjans dels anys 70 es realitzaren estudis als quals es proposava la substitució parcial de farina de peix per ingredients vegetals. Aquests primers treballs foren realitzats en salmònids, fonamentalment truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*), i la font de proteïna vegetal escollida fou la farina de soja (Cho et al., 1974; Dabrowska i Wojno, 1977; Ketola, 1975; Rumsey i Ketola, 1975). Els resultats obtinguts van portar als investigadors a la conclusió que substitucions del 30-50% de la farina de peix per farines vegetals (depenent de les condicions experimentals) perjudicaven el creixement i l'eficiència alimentària dels peixos. Les causes d'aquest pobre rendiment nutricional foren atribuïdes a carències en certs nutrients, fonamentalment aminoàcids essencials, i a la presència de compostos amb activitat antinutricional.

Fins el dia d'avui s'han portat a cap nombrosos estudis amb diferents espècies d'interès aquícola, entre elles l'orada, en els quals s'ha avaluat la viabilitat de diferents ingredients d'origen vegetal: extractes proteics de cereals com l'arròs, el blat i el blat de moro; així com farines i extractes proteics de llegums com la soja o el pèsol. Atès que cadascun d'aquests ingredients posseeix característiques nutricionals pròpies, tant positives com negatives, alguns investigadors recomanen l'ús de mescles de diversos ingredients vegetals, de tal manera que es complementin entre ells i en resulti una dieta nutricionalment més equilibrada (Fournier et al., 2004; Martínez-Llorens et al., 2012; Sánchez-Lozano et al., 2009). Per exemplificar aquest fet, s'analitzaren per aquesta tesi els resultats de creixement d'un recull de 23 treballs realitzats en peixos alimentats amb diferents graus de substitució de farina de peix. Tal i com es representa a la Figura 4, en distingir els treballs que empraren una única font de proteïna

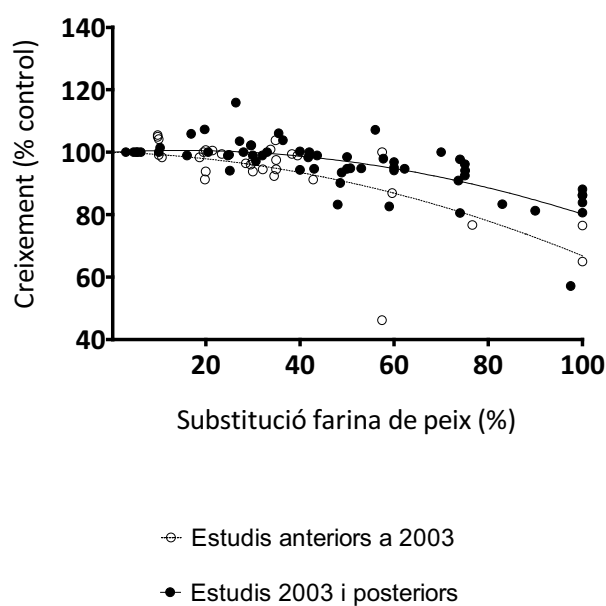
vegetal d'aquells que empraren una mescla d'ingredients vegetals, s'evidencia la conveniència d'utilitzar mescles d'ingredients vegetals com a alternativa a la farina de peix.



Condicció	Model	r <sup>2</sup>	n
Mescla d'ingredients	$y = 100.0 + 0.077x - 0.004x^2$	0.44	73
Un únic ingredient	$y = 100.0 + 0.035x - 0.002x^2$	0.53	48

Figura 4. Relació entre graus de substitució de farina de peix i creixements normalitzats respecte a la dieta control 100% farina de peix. Els cercles plens (●) corresponen als creixements de peixos alimentats amb una mescla d'ingredients vegetals, els cercles buits (○) als alimentats amb un sol ingredient vegetal. La línia contínua representa el model quadràtic que ajusta els valors ●, la discontinua el corresponent als valors ○. Dades recollides de Carter et al. (2012); Chatzifotis et al. (2008); Dabrowska i Wojno (1977); De Francesco et al. (2007); Dias et al. (2009); Dimitroglou et al. (2010); Gómez-Requeni et al. (2005); Gómez-Requeni et al. (2004); Kissil et al. (2000); Kokou et al. (2012); Larsen et al. (2012); Martínez-Llorens et al. (2009); Martínez-Llorens et al. (2012); Nengas et al. (1996); Pereira i Oliva-Teles (2003); Pereira i Oliva-Teles (2004); Robaina et al. (1995); Robaina et al. (1997); Sánchez-Lozano et al. (2009); Sánchez-Lozano et al. (2011); Sánchez-Lozano et al. (2007); Santigosa et al. (2008); Vilhelmsson et al. (2004).

Gràcies al coneixement acumulat al voltant dels requeriments nutricionals dels peixos i les deficiències dels ingredients vegetals, el rendiment de les dietes amb substitució parcial de farina de peix per aquests tipus d'ingredients ha millorat significativament. Tal com s'il·lustra a la Figura 5, per a un mateix nivell de substitució de farina de peix, els estudis posteriors a l'any 2003 presentaren millors resultats de creixement que aquells publicats amb anterioritat. Alhora, aquests avenços han permès que les formulacions proposades pels investigadors fossin cada cop més ambicioses. Per aquest motiu, avui dia gran part dels estudis en nutrició de peixos treballen amb substitucions de farina de peix superiors al 75%. En algunes espècies, com la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) o la còbia (*Rachycentron canadum*), s'ha aconseguit dissenyar dietes compostes de proteïna exclusivament vegetal, amb valors nutricionals equiparables als de dietes a base de farina de peix (Lee et al., 2010; Salze et al., 2010).



Condiició	Model	r <sup>2</sup>	n
Estudis anteriors al 2003	$y = 100.0 - 0.050x - 0.003x^2$	0.51	39
Estudis del 2003 i posteriors	$y = 100.0 + 0.080x - 0.003x^2$	0.52	73

Figura 5. Relació entre graus de substitució de farina de peix i creixements normalitzats respecte a la dieta control 100% farina de peix. Els cercles plens (●) corresponen a resultats de treballs posteriors al 2003, els cercles buits (○) a treballs publicats el 2003 o amb anterioritat. La línia contínua representa el model quadràtic que ajusta els valors ●, la discontinua el corresponent als valors ○. Dades recollides de Carter et al. (2012); Chatzifotis et al. (2008); Dabrowska i Wojno (1977); De Francesco et al. (2007); Dias et al. (2009); Dimitroglou et al. (2010); Gómez-Requeni et al. (2005); Gómez-Requeni et al. (2004); Kissil et al. (2000); Kokou et al. (2012); Larsen et al. (2012); Martínez-Llorens et al. (2009); Martínez-Llorens et al. (2012); Nengas et al. (1996); Pereira i Oliva-Teles (2003); Pereira i Oliva-Teles (2004); Robaina et al. (1995); Robaina et al. (1997); Sánchez-Lozano et al. (2009); Sánchez-Lozano et al. (2011); Sánchez-Lozano et al. (2007); Santigosa et al. (2008); Vilhelmsson et al. (2004).

### 1.5.1. Avantatges dels ingredients vegetals

Al llarg de les dues darreres dècades, la producció pesquera mundial s'ha estabilitzat al voltant dels 90 milions de tones (Mt). Aproximadament un 30% d'aquestes captures és destinat a la producció de farina i oli de peix, la qual cosa resulta en unes produccions de 5 Mt de farina de peix i 1 Mt d'oli de peix (FAO, 2014). Paral·lelament, la producció agrícola de cereals i oleaginoses ha anat creixent a raó d'un 1,8 i un 4,9% anual, respectivament (Figura 6). D'aquesta manera, entre 1990 i 2013 la producció agrícola s'incrementà de 1.952 a 2.457 Mt en el cas dels cereals (un increment acumulat del 42%), i de 291 a 608 Mt en el cas de les oleaginoses (un increment acumulat del 108%).

Certament, un dels grans avantatges del sector agrícola és la seva capacitat d'augmentar la producció invertint més esforços i recursos, ja sigui sembrant més superfície de cultiu o millorant la productivitat dels cultius existents (Figura 6). Pel contrari, per més que hagi augmentat l'esforç pesquer des dels anys 70, les captures no s'han vist millorades, a conseqüència de la sobreexplotació i esgotament de les pesqueries (Anticamara et al., 2011).



Una altra avantatge de les farines derivades de cereals i oleaginoses és que tenen un preu baix en relació amb la farina de peix. Prenent com a exemple la farina de soja (Figura 7), el seu preu entre els anys 2004 i 2012 es va situar, de mitjana, en valors 3,7 vegades inferiors als de la farina de peix. En els períodes 2006-2007 i 2009-2010, però, el preu de la farina de peix s'alçà abruptament fins a superar en més de 5 vegades el preu de la farina de soja. Aquestes fluctuacions de preu més intenses foren causades per caigudes en la producció mundial de farina de peix, que coincidiren amb episodis de *El Niño* (Asche et al., 2013).

Els ingredients vegetals són, en general, relativament pobres en proteïna. Per això és freqüent trobar formulacions de dietes per a peixos amb glúten de cereals i concentrats proteics d'oleaginoses. El procés de refinament d'aquest ingredients, a més de concentrar la proteïna del vegetal, serveix també per a reduir el contingut de components poc o gens nutritius. Malauradament, també l'encareix i en redueix la seva competitivitat envers la farina de peix. Amb tot, la competència i la demanda mundial de farina de peix continuen creixent i, per tant, també n'augmenta el preu. Conseqüentment, els concentrats proteics i els glúten van guanyant rellevància com a fonts alternatives de proteïna.

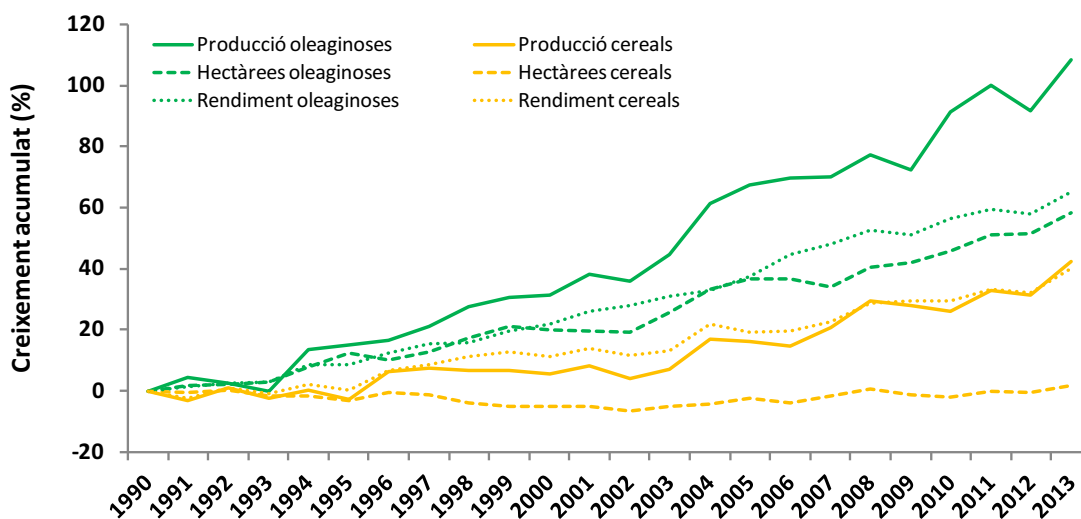


Figura 6. Creixement acumulat (%) de la producció mundial, la superfície cultivada i el rendiment dels cultius de cereals (en color taronja) i oleaginoses (en color verd). Dades recollides de la base de dades de la FAOSTAT (2014).

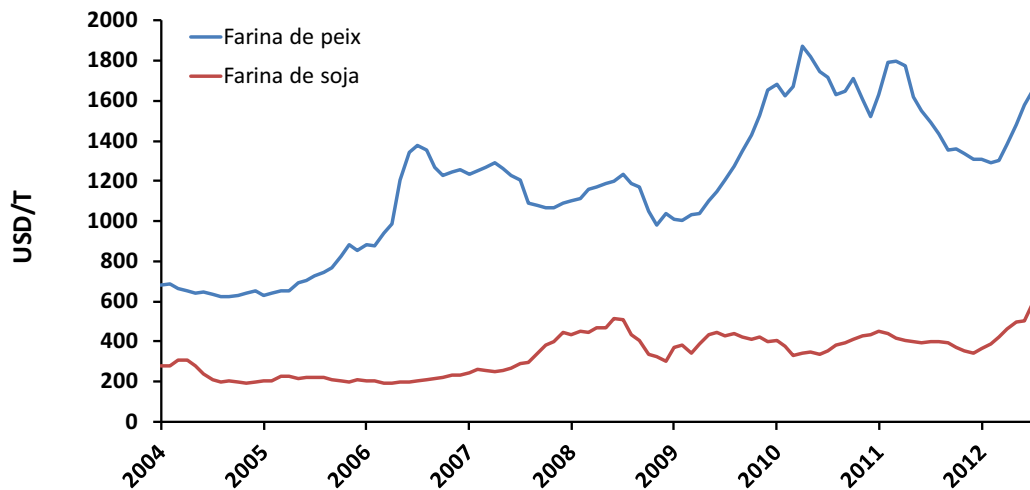


Figura 7. Seguiment dels preus de la farina de peix i de soja en el mercat mundial des de l'any 2004 fins l'any 2012. Dades extretes del lloc web de YCharts (2012).

### 1.5.2. Deficiències nutricionals dels ingredients vegetals

És ben sabut que el creixement i l'eficiència alimentària dels peixos es redueixen en alimentar-los amb elevades substitucions de farina de peix per ingredients vegetals. A excepció d'unes poques espècies de peixos herbívors (Tolentino-Pablico et al., 2008), els peixos no acostumen a incloure vegetals terrestres a la seva dieta natural. Sent així, sembla lògic que les característiques nutricionals dels ingredients vegetals no s'ajustin a les necessitats dels peixos. Les principals deficiències nutricionals dels ingredients vegetals són: els perfils inadequats d'aminoàcids essencials i la presència d'alts continguts en compostos amb poc o nul valor nutricional.

Com ja s'ha mencionat, els aminoàcids essencials són aquells aminoàcids que no poden ser sintetitzats *de novo* per l'organisme, per tant han de ser proveïts a través de la dieta. L'efecte més visible i recurrent de la deficiència d'un d'aquests aminoàcids a la dieta és la reducció del creixement. No obstant, depenent de l'aminoàcid en qüestió, la carència pot arribar a afectar altres processos fisiològics relacionats amb la resposta immunològica, la reproducció o el comportament (Li et al., 2009a). La farina de peix aporta quantitats i proporcions d'aminoàcids essencials ideals per a l'òptim creixement dels peixos. En canvi, les proteïnes vegetals acostumen a ser deficitàries en un o diversos aminoàcids essencials.

A la Taula 1 es presenta la composició d'aminoàcids essencials de diferents ingredients per a dietes i es contraposen als requeriments de l'orada. Tal com es pot observar, la farina de peix satisfà tots els requeriments nutricionals de l'orada. Per contra, els ingredients vegetals

presenten deficiències en el contingut de certs aminoàcids, especialment en lisina i metionina, a més de desequilibris pel que fa a llurs proporcions. L'exemple més clar d'un perfil d'aminoàcids desequilibrat el representa el gluten de blat de moro, amb només un 0.5 % d'arginina, la qual és present a la resta d'ingredients en proporcions superiors al 5%; i un 17.3% de leucina, la qual representa menys del 10% de la proteïna de la resta d'ingredients. Tot i que cadascun d'aquests perfils d'aminoàcids presenta certes singularitats, es poden distingir dues tendències: els ingredients procedents de cereals acostumen a ser rics en metionina però pobres en lisina, mentre que els ingredients derivats de lleguminoses són rics en lisina i pobres en metionina. Aquest és l'argument principal per a recomanar la combinació de proteïnes de cereals i lleguminoses per a substituir eficaçment la farina de peix (Sánchez-Lozano et al., 2009).

Taula 1. Composició en aminoàcids essencials de diferents ingredients i requeriments nutricionals de l'orada. Concentracions expressades en g/100 g de proteïna.

	Requeriments orada <sup>1</sup>	Farina de peix <sup>2</sup>	CPS <sup>3</sup>	CPP <sup>4</sup>	CPA <sup>5</sup>	Gluten blat de moro <sup>6</sup>
Arg	5.4	5.4	7.1	11.5	8.3	0.5
His	1.7	2.9	2.5	1.5	2.2	1.8
Lys	5.0	6.8	5.4	8.7	2.1	1.8
Thr	2.8	4.1	3.9	4.7	3.7	3.7
Ile	2.6	3.6	4.0	5.7	4	4.2
Leu	4.5	6.4	6.9	9.6	7.8	17.3
Val	3.0	4.2	4.2	6.1	6	4.5
Met	2.4	2.8	1.7	1.2	2.9	2.4
Phe + Tyr	2.9	7.3	9.2	9.6	8.2	7.4

CPS: concentrat proteic de soja; CPP: concentrat proteic de pèsol; CPA: concentrat proteic d'arròs.

<sup>1</sup> Extret de Kaushik (1998).

<sup>2</sup> A partir d'anàlisis pròpies, *Super-Prime fish meal* (Corpesca S.A, Chile).

<sup>3</sup> A partir d'anàlisis pròpies, *Soycomil-FG* (ADM Company, EUA).

<sup>4-5</sup> Extrets de Sánchez-Lozano et al. (2009).

<sup>6</sup> Extret de Pereira i Oliva-Teles (2003).

Afortunadament, el problema d'un perfil inadequat d'aminoàcids essencials pot ser resolt en complementar la dieta amb el o els aminoàcids deficitaris. Malgrat augmentar els costos de producció del pinso, aquests suplementes restauren el creixement i l'eficiència alimentària de peixos alimentats amb proporcions relativament elevades (50-75%) de proteïna vegetal (Fournier et al., 2004; Gómez-Requeni et al., 2004). No obstant, altres característiques

de la composició química dels vegetals continuen impeding la substitució total i efectiva de la farina de peix a les dietes aquícoles.

Els ingredients vegetals contenen, en menor o major mesura, una fracció de compostos poc o gens digeribles sense la intervenció d'una microflora intestinal especialitzada, com succeeix en mamífers herbívors com els remugants. Els peixos generalment no presenten aquest tipus d'organismes simbiotes, tot i així, hi ha evidències d'un cert grau de fermentació bacteriana a l'intestí de diversos peixos herbívors (Clements et al., 2009). Entre aquests compostos no nutritius trobem polímers com la lignina i les pectines, polisacàrids indigeribles com la cel·lulosa i els arabinòxilans, oligosacàrids com la sucrosa i la rafinosa, i àcid fític (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007; Knudsen, 1997). L'àcid fític representa la major reserva de fòsfor en els ingredients vegetals. Malauradament, és poc o gens hidrolitzable al tracte digestiu dels peixos (Gatlin et al., 2007). Amb excepció de l'àcid fític, la resta de compostos formen part de la coneguda fibra alimentària segons la definició de DeVries (2003).

Entre els inconvenients de la fibra alimentària i l'àcid fític, el més evident és que es desaprofita una fracció de la dieta que podria ser destinada a nutrients valuosos per al peix. Aquest fet és especialment greu amb les farines vegetals, la qual cosa ha fomentat l'ús d'ingredients vegetals amb una major densitat proteica, com és el cas dels glútenos de cereals i els concentrats proteics d'oleaginoses. Alhora, aquests compostos presenten altres propietats que afecten el procés digestiu dels peixos. Els polisacàrids no digeribles que componen la fibra alimentària (en anglès *Non-Starch Polysaccharides*, NSPs) i els oligosacàrids dificulten l'absorció dels nutrients de la dieta, així com del colesterol i els àcids biliars excretats per l'intestí durant la digestió (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007). Els oligosacàrids també s'associen al desenvolupament d'enteritis en peixos alimentats amb soja (Gatlin et al., 2007). Per la seva banda, l'àcid fític s'uneix a proteïnes i en dificulta la seva digestió (Francis et al., 2001). Diferents estudis han avaluat la possibilitat de tractar o complementar les dietes vegetals amb enzims capaços d'hidrolitzar aquests compostos. A Dalsgaard et al. (2012), la inclusió de diferents hidrolases (  $\alpha$ -glucanasa,  $\beta$ -xilanas i serina proteasa) va millorar la digestibilitat de les dietes amb farina vegetal ingerides per truites irisades. En el cas de l'àcid fític, la complementació o el pretractament amb fitasa ha demostrat millorar la digestibilitat del fòsfor i la proteïna en dietes vegetals per a diferents espècies de peix (Oliva-Teles et al., 1998; Sajjadi i Carter, 2004; Vielma et al., 2002; Wang et al., 2009). La digestibilitat de la dieta no només compromet el creixement de l'animal, sinó que també contribuiria a l'impacte de l'explotació piscícola sobre l'ecosistema que el circumda. Dietes vegetals amb una baixa

digestibilitat suposen una major descàrrega de nutrients al medi a través de les femtes. A causa dels impactes sobre la digestibilitat de la dieta, alguns components de la fibra alimentària també es classifiquen sovint com a factors antinutricionals.

### 1.5.3. Factors antinutricionals dels ingredients vegetals

Molts vegetals han desenvolupat la capacitat de sintetitzar metabòlits que afecten negativament la nutrició i la salut dels animals que proven d'ingerir-los (Makkar, 1993). Aquests compostos, denominats comunament com factors antinutricionals, han demostrat reduir el creixement i l'eficiència alimentària dels peixos (Costas et al., 2014; Francis et al., 2002; Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007; Krogdahl et al., 2010). D'acord amb Francis et al. (2001), els factors antinutricionals poden ser classificats en quatre grups segons el tipus d'activitat antinutricional, els quals es recullen a la Taula 2.

Taula 2. Exemples de factors antinutricionals classificats segons la seva acció.

Acció antinutricional	Principals representants <sup>1</sup>
Reducció digestibilitat i utilització de la proteïna de la dieta	Inhibidors de proteases, tanins i lectines
Reducció digestibilitat i utilització dels minerals de la dieta	Gosipol, oxalats, glucosinolats
Antivitamines	Contra vitamines A, B1, B6, B12, D i E
Activitats diverses: tòxics, al·lèrgics, hipocolesterolèmics, etc.	Micotoxines, cianògens, nitrats, alcaloides, inhibidors d'amilases, fitoestrògens i saponines.

<sup>1</sup> Classificació en base a Francis et al. (2001). Llistats d'antinutrients completats amb la informació disponible a de Silva i Anderson (1995).

Existeixen diferents estratègies per a disminuir les concentracions dels factors antinutricionals als ingredients vegetals. D'entre les estratègies de menor dificultat tècnica, el tractament amb calor i el rentat amb dissolvents (aigua i alcohol) són àmpliament emprats en l'elaboració de concentrats proteics vegetals. L'activitat d'alguns antinutrients de naturalesa proteica com els inhibidors de proteases o les lectines poden ser anul·lades mitjançant calor, en canvi, altres compostos més refractaris com les saponines o antígens proteics han de ser eliminats per altres mitjans (Francis et al., 2001). L'extracció amb alcohol és efectiva reduint les concentracions de saponines, oligosacàrids i fitoestrògens dels ingredients vegetals (Gatlin et

al., 2007; Krogdahl et al., 2010). Els alcaloides i altres compostos de naturalesa polar són preferiblement eliminats amb aigua (Krogdahl et al., 2010). Altres estratègies més innovadores contemplen la fermentació microbiana o l'enginyeria genètica (Francis et al., 2002). La fermentació bacteriana de la farina de soja ha demostrat restaurar la funció i la morfologia de l'intestí dels peixos, òrgan particularment sensible als factors antinutricionals (Matsunari et al., 2010; Nguyen et al., 2013). Pel que fa a la modificació genètica en vegetals per a consum humà i animal, aquesta ha estat dirigida cap a la millora del rendiment de la producció agrícola, no en la millora del valor nutricional. Tal i com indiquen els treballs publicats fins ara, els vegetals modificats genèticament per a resistir plagues i herbicides no beneficien ni perjudiquen el creixement del peixos (Sissener et al., 2011).

## 1.6. LA TAURINA: UN NUTRIENT ESSENCIAL EN LA DIETA DELS PEIXOS

### 1.6.1. Aspectes generals i funcions fisiològiques

La taurina és un àcid orgànic derivat de la cisteïna. El compost conserva el grup amino de la cisteïna, però presenta un grup sulfonat a la posició que correspondria al grup carboxil (Figura 8). Per tant, la taurina no és considerada com a aminoàcid *sensu stricto*. És més, l'absència de grup carboxil impedeix que pugui formar enllaços peptídics, per tant no pot formar part de cadenes peptídiques.

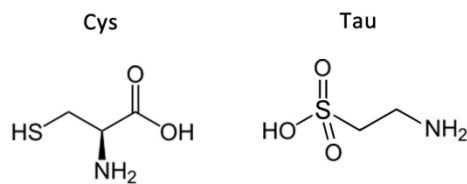


Figura 8. Fórmula química de la cisteïna (Cys) i la taurina (Tau).

En animals, la taurina és present en altes concentracions al plasma i a nombrosos teixits. Joga papers clau en una gran varietat de processos fisiològics com són el desenvolupament del sistema nerviós central i la retina, la regulació del volum cel·lular i la concentració intracel·lular de calci, l'estabilització de membranes, el metabolisme dels lípids i els carbohidrats, la reproducció i la resposta immune (De la Puerta et al., 2010; Huxtable, 1992; Ripps i Shen, 2012; Schuller-Levis i Park, 2003).

Les cèl·lules animals difereixen de les vegetals en l'absència de paret cel·lular. Aquest fet fa necessària una regulació més estreta de la pressió osmòtica i el volum cel·lular. L'equilibri osmòtic és controlat mitjançant l'intercanvi d'osmòlits entre el citosol i l'exterior de la cèl·lula. Formant part d'aquest osmòlits tenim ions inorgànics, com el sodi i el clor, i molècules orgàniques de baix pes molecular, com la urea, els aminoàcids o la taurina. A diferència dels mamífers, la taurina és clau en els processos d'osmoregulació en peixos i invertebrats marins (Huxtable, 1992; Ripps i Shen, 2012). Durant el procés, però, altres osmòlits intervenen en el transport de la taurina a través de la membrana. En aquest sentit, el transport de taurina ha estat relacionat amb l'estrès osmòtic derivat de la diabetis (De la Puerta et al., 2010). Concretament, les elevades concentracions de glucosa extracel·lular promourien l'alliberament de taurina, a mode de compensació per l'acumulació de sorbitol a dins de la cèl·lula (Franconi

et al., 2004). L'esgotament del reservori intracel·lular de taurina sembla ser la causa de certes patologies associades a la diabetis en humans (De la Puerta et al., 2010).

La taurina s'uneix a d'altres metabòlits al fetge i n'augmenta la seva polaritat. D'una banda, la taurina reacciona amb el grup carboxil dels àcids biliars i els confereix la naturalesa amfipàtica que els permet formar micel·les a la llum intestinal. D'aquesta manera, la taurina participa activament en l'absorció dels greixos i les vitamines liposolubles de la dieta (Chiang, 2009; Hofmann i Hagey, 2008). D'una altra banda, la taurina també reacciona amb els dos grups carboxils de la bilirubina i, en augmentar la seva solubilitat en aigua, facilita la seva excreció des del fetge cap a la bilis (Goto et al., 2001b). Així com en mamífers la bilirubina es conjuga principalment amb l'àcid glucurònic, en peixos aquest paper l'interpreta la taurina (Goto et al., 2001b; Takagi et al., 2008; Takagi et al., 2011; Takagi et al., 2006b).

A l'interior de les cèl·lules es generen de forma natural compostos amb activitat citotòxica. Es tracta de compostos altament reactius produïts durant la reducció de l'oxigen en aigua per part de la citocrom c oxidasa. L'activitat antioxidant de la taurina és ben coneguda i es desenvolupa a diferents nivells. La taurina mateixa ha estat identificada com a neutralitzadora directa de l'àcid hipoclorós (Salze i Davis, 2015). També evidencia certa capacitat per a neutralitzar espècies reactives d'oxigen (en anglès *Reactive Oxygen Species*, ROS). D'altra banda, la taurina també pot actuar per vies indirectes en el manteniment de l'estatus antioxidant de la cèl·lula. La taurina contribueix al manteniment dels nivells de cisteïna, aminoàcid precursor d'un important antioxidant intracel·lular com és el glutatió (Roy i Sil, 2012; Timbrell et al., 1995). Alhora, com a estabilitzadora de membranes evita possibles canvis en la permeabilitat de la membrana ocasionats per estrès oxidatiu (Roy i Sil, 2012). La diabetis freqüentment deriva en estrès oxidatiu a causa de la reducció de la concentració d'antioxidants, la qual cosa fa necessari el subministrament d'antioxidants exògens (De la Puerta et al., 2010).

### **1.6.2. La taurina com a additiu alimentari en dietes vegetals**

A excepció de gats i primats, els mamífers són capaços de sintetitzar taurina endògena en quantitats suficients per a satisfer les seves necessitats fisiològiques (Schuller-Levis i Park, 2003). La taurina se sintetitza a partir de la cisteïna, un aminoàcid procedent de la degradació de la metionina. La biosíntesi de taurina es produeix principalment al fetge (Stipanuk, 2004). En el procés, la cisteïna pot ser oxidada a sulfinat de cisteïna (CSA) per la cisteïna dioxigenasa (CDO, EC 1.13.11.20). La descarboxilació de la CSA a través de la CSA-descarboxilasa (CSD, EC



4.1.1.29) produeix hipotaurina, la qual és posteriorment oxidada a taurina (Figura 9). El ritme de síntesi de la taurina ve donada per l'activitat de la CSD. L'activitat de la CDO i la CSD ha estat detectada a diferents espècies de teleostis (Goto et al., 2001a; Goto et al., 2001c; Wang et al., 2014; Watson et al., 2014; Yokoyama et al., 2001). Les activitats de tots dos enzims varien segons l'espècie estudiada, la qual cosa sembla estar inversament relacionada amb els requeriments de proteïna del peix. A Yokoyama et al. (2001), l'activitat CSD a la truita irisada va superar a la de *Paralichthys olivaceus* i *Pagrus major*, mentre que a *Seriola quinqueradiata* i bonítol llistat no se'n va detectar activitat. La mateixa tendència va ser observada per Goto et al. (2001c) amb algunes d'aquestes espècies, a més d'algunes altres. No obstant, la taxa de síntesi de taurina dels peixos podria no ser suficient per a satisfer les seves necessitats fisiològiques. En ser comparades amb l'activitat CSD en rata i ratolí, les activitats observades en peixos resulten ser d'11 a més de 100 vegades inferiors, en funció de l'espècie (Yokoyama et al., 2001).

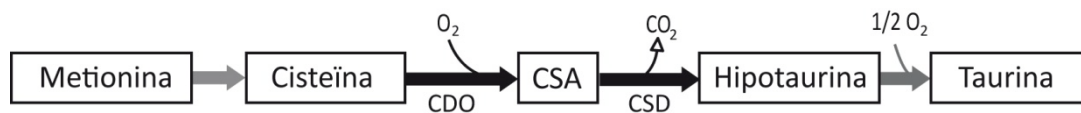


Figura 9. Mapa conceptual de la síntesi de taurina. Es representen amb fletxes negres les reaccions catalitzades per la cisteïna dioxigenasa (CDO) i la sulfinat de cisteïna descarboxilasa (CSD). CSA és l'abreviació de sulfinat de cisteïna.

La taurina és un nutrient abundant a la farina de peix, però pràcticament absent als ingredients vegetals (Spitze et al., 2003). La manca de taurina a la dieta, juntament a la limitada capacitat dels peixos per a sintetitzar taurina, han estat proposades com a causes del baix rendiment nutricional dels ingredients vegetals. Al llarg de la darrera dècada, nombrosos estudis han demostrat que la inclusió de taurina en dietes a base de proteïna vegetal millora notablement el creixement dels peixos (Brotons Martinez et al., 2004; Chatzifotis et al., 2008; Gibson Gaylord et al., 2007; Jirsa et al., 2014; Kim et al., 2014; Kim et al., 2008a; Kim et al., 2005a; Kim et al., 2003; Kim et al., 2005b; Lim et al., 2013; Lunger et al., 2007; Nguyen et al., 2013; Takagi et al., 2008). En canvi, en dietes de farina de peix, aquesta tendència no és tan clara (Gaylord et al., 2006; Kato et al., 2014; Watson et al., 2014), probablement perquè la farina de peix ja proveeix quantitats suficients de taurina. A *Seriola quinqueradiata*, la inclusió de taurina va permetre substituir completament la farina de peix per concentrat proteic de soja, sense que això afectés significativament el creixement i l'eficiència alimentària de l'animal (Takagi et al., 2008). Pel que fa a altres alteracions fisiològiques recurrents en peixos, la taurina ha demostrat alleugerar l'acumulació de pigments biliars al fetge en *Seriola*

*quinqeradiata* i *Pagrus major* (Goto et al., 2001b; Takagi et al., 2011; Takagi et al., 2006a; Takagi et al., 2006b). D'altra banda, la taurina milloraria l'estatus redox i la resposta antioxidant dels peixos contra l'estrès oxidatiu (Bañuelos-Vargas et al., 2014; Espe i Holen, 2013; Feidantsis et al., 2014b), tal com succeeix en mamífers (Obrosova i Stevens, 1999; Rashid et al., 2013; Ripps i Shen, 2012). Tots aquests estudis indiquen que la taurina podria ser un nutrient essencial en peixos alimentats amb proteïna vegetal.



## **2. INTERÈS I OBJECTIUS**

---



## 2. INTERÈS I OBJECTIUS

L'orada (*Sparus aurata*) és el peix més produït pel sector aquícol a la regió mediterrània. Concretament, a l'any 2013, la producció total d'aquesta espècie al Mediterrani va ser quantificada en 152 mil tones, la qual cosa va representar el 54% del la producció de peixos marins a la zona (FEAP, 2014a, b). Com a espècie carnívora, l'orada té uns elevats requeriments de proteïna a la dieta. Segons les estimacions realitzades per Sabaut i Luquet (1973), les orades requereixen una proporció de proteïna a la dieta del 40%. No obstant, la satisfacció dels requeriments nutricionals de proteïna depèn de la quantitat de pinso ingerit, el qual ve determinat en gran mesura pel contingut energètic de la dieta (Lupatsch et al., 2001). Així doncs, la proporció de proteïna amb què s'ha de formular la dieta variarà segons el seu contingut en greixos i carbohidrats i segons el règim d'alimentació: *ad libitum* o racions fixes proporcionals al pes. És per això que, per tal de garantir unes taxes de creixement màximes, els pinsos per a juvenils d'orada solen contenir proporcions de proteïna superiors al 45% (Figura 10). No obstant, ingestes de proteïna superiors a les requerides per al creixement de l'orada podrien derivar en majors taxes de desaminació d'aminoàcids i, per tant, en una major excreció d'amoni al medi (McGoogan i Gatlin III, 1999).

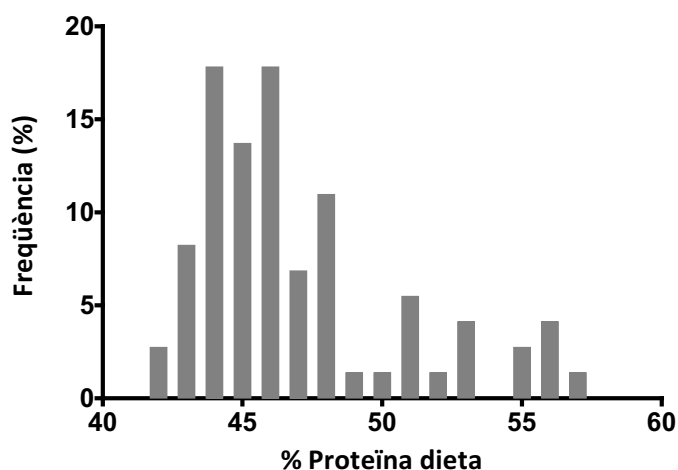


Figura 10. Histograma de freqüències i estadístics descriptius de proporcions de proteïna en dietes experimentals per a orada. Dades extretes d'un recull de 14 estudis (De Francesco et al., 2007; Dias et al., 2009; Dimitroglou et al., 2010; Gómez-Requeni et al., 2004; Gómez-Requeni et al., 2003; Kokou et al., 2012; Martínez-Llorens et al., 2012; Nengas et al., 1996; Pereira i Oliva-Teles, 2002; Pereira i Oliva-Teles, 2003; Pereira i Oliva-Teles, 2004; Robaina et al., 1995; Robaina et al., 1997; Sánchez-Lozano et al., 2009)

Mitjana	Desviació estàndar	Interval de confiança al 95%	
		Inferior	Superior
46.91	3.79	46.02	47.80

Deguda a la seva elevada digestibilitat i al seu perfil d'aminoàcids essencials, la farina de peix és l'ingredient ideal per a suplir les elevades demandes de proteïna dels peixos carnívors. Tot i que el seu ús ha anat reduint-se a favor d'alternatives vegetals, l'any 2010 les

formulacions per a peixos marins encara contenien un 26% de farina de peix (Olsen i Hasan, 2012). Tal i com ha estat exposat a la Introducció, l'utilització de farina de peix té un elevat cost ecològic, atès que contribueix a la sobreexplotació dels recursos pesquers, i econòmic, degut a la pujada sostinguda del preu. La reducció de la proporció de farina de peix a les dietes és, per tant, un objectiu inajornable per a garantir la sostenibilitat econòmica i ecològica del cultiu d'orada. Dias et al. (2009) i Sánchez-Lozano et al. (2009) aconseguiren reduir un 60% de la farina de peix a la dieta sense que això afectés negativament al creixement de les orades. No obstant això, substitucions més ambicioses han demostrat disminuir sensiblement el creixement de les orades.

**L'objectiu principal** d'aquesta tesi és contribuir a la recerca de noves estratègies per a reduir gran part o la totalitat de la farina de peix en pinsos per a orada i, possiblement, per a altres peixos carnívors. Per a aconseguir aquest objectiu es varen utilitzar tres suplementos alimentaris, els quals encara no havien estat provats en orada, però que havien demostrat ser eficaços en la millora del creixement i l'eficiència alimentària d'altres peixos i animals. Aquests tres suplementos varen ser el glutamat, la glutamina i la taurina.

Partint de les propietats nutricionals d'aquests compostos (veure Introducció), es va abordar l'objectiu principal a través de dues estratègies diferents:

1. Optimitzar l'ús de la proteïna de la dieta per a creixement mitjançant la inclusió d'un suplement glutamina i glutamat en dietes a base de farina de peix o de proteïna vegetal.

D'aquesta primera estratègia se'n derivaren els següents **objectius específics**:

- Avaluar els efectes del glutamat i la glutamina en el creixement i l'eficiència alimentària de les orades.
  - Estudiar possibles canvis en la composició corporal de les orades arran de la suplementació amb glutamat i glutamina.
  - Caracteritzar els possibles efectes del glutamat i la glutamina en el metabolisme intermediari de les orades.
2. Incrementar el valor nutricional de dietes formulades majoritàriament o exclusivament amb proteïna vegetal mitjançant la inclusió de taurina.

A partir d'aquesta segona estratègia es plantejaren una sèrie d'**objectius específics**:

- Comprovar els possibles beneficis de la taurina en la ingesta, el creixement i l'eficiència alimentària de les orades.
- Estudiar els possibles canvis en la composició corporal de les orades alimentades amb un suplement de taurina.
- Estudiar els efectes de la taurina sobre la digestibilitat de la dieta.
- Estudiar els possibles efectes de la taurina en el metabolisme intermediari de les orades.





### **3. MATERIALS I MÈTODES**

---



### 3. MATERIALS I MÈTODES

#### 3.1. CONDICIONS DE MANTENIMENT DELS PEIXOS

Els peixos es varen mantenir en aquaris amb aproximadament 210 litres d'aigua de mar a 35‰ de salinitat, ubicats en cambres climatitzades a 19°C, procurant-los d'aquesta manera una estabilitat en la temperatura de l'aigua d'uns  $21\pm 0,4^{\circ}\text{C}$ . A més a més, els aquaris comptaven amb un subministrament constant d'aire mitjançant compressors (400L/h), amb l'objectiu de garantir-ne uns nivells òptims d'oxigen dissolt. La il·luminació de les cambres es va programar per a un fotoperíode de 12 hores de llum/foscor.

Els residus procedents de les excrecions dels peixos o de la degradació del pinso no ingerit eren eliminats o oxidats biològicament a formes menys tòxiques bombejant l'aigua (a uns 1800L/h) a través d'un filtre extern del tipus Eheim (Figura 11). Aquests filtres constaven de 3 seccions: una primera formada per material ceràmic porós, una segona secció amb sorra calcària i una darrera formada per carbó actiu. D'aquesta manera l'aigua es filtrava mecànicament però també químicament (carbó actiu) i biològicament (bactèries nitrificants), alhora que es tamponava el seu pH (sorra calcària). Per tal de controlar la càrrega microbiana de l'aigua, aquesta era esterilitzada mitjançant una làmpada de llum ultraviolada situada a la sortida del filtre, just abans de retornar a l'aquari.

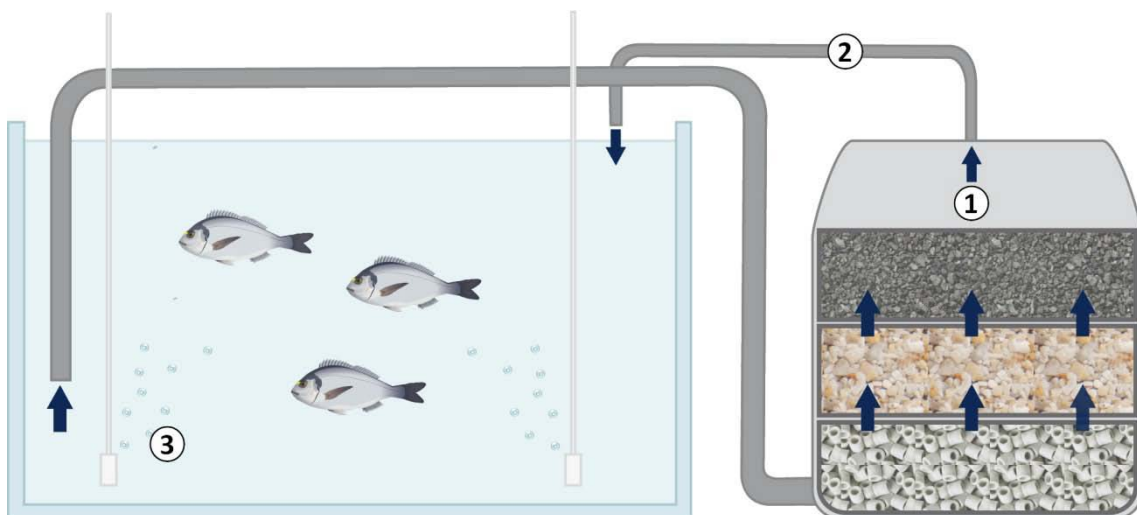


Figura 11. Representació del sistema de recirculació i filtració de l'aigua en els aquaris. Tal i com indiquen les fletxes blaves, l'aigua era impulsada per una bomba (1) a través del filtre, de baix a dalt. Abans de retornar a l'aquari, l'aigua filtrada era esterilitzada amb una llum ultraviolada (2) connectada al circuit. L'aire se subministrava mitjançant difusors ceràmics (3) connectats a compressors d'aire.

Adicionalment, cada 7-10 dies es reemplaçava parcialment l'aigua dels aquaris i es comprovaven aquells factors abiòtics que més influència tenien en la fisiologia dels peixos, procurant en tot moment l'homogeneïtat entre aquaris per tal de minimitzar variabilitats entre peixos alienes al tractament o a la dieta experimental. A la Taula 3 es mostren els paràmetres analitzats i les actuacions corresponents en cas de divergència respecte a uns rangs òptims.

Taula 3. Llistat de paràmetres fisicoquímics de l'aigua de mar dels aquaris, les incidències més freqüents i les mesures de correcció corresponents.

Paràmetre	Rang	Medició	Incidències més freqüents	Possibles causes	Mesures de correcció
Temperatura	20.5 - 21.5 °C	Termòmetre de mercuri	Massa baixa	Falla llum UV	(1) Comprovar UV, substituir si és necessari.
Salinitat	34 - 36 ‰	Refractòmetre	Massa alta	Evaporació	(2) Durant el canvi parcial d'aigua, ajustar amb aigua destil·lada.
				Falla llum UV (activitat bacteriana)	(1)
pH	7.5 - 8.0	SERA pH test (SERA GmbH, Alemanya)	Massa baix	Baix cabal d'aigua	(3) Comprovar circuit d'aigua en busca d'obturacions. Obrir filtre i netejar material filtrant amb aigua de mar.
				Bomba parada	(4) Revisar bomba i purgar d'aire el circuit. Substituir si és necessari.
		SERA NH <sub>4</sub> /NH <sub>3</sub> test (SERA GmbH, Alemanya)		Baix cabal d'aigua	(3)
Amoni	0 - 0.5 mg/L		Massa alt	Bomba parada	(4)

### **3.2. PREPARACIÓ DE LES DIETES EXPERIMENTALS**

Per a la preparació de les dietes experimentals, en primer lloc es barrejaven en sec tots els ingredients durant 5 minuts, a excepció del clorur de colina, l'oli de peix o el tocoferol. A continuació, i sense deixar de remenar, s'hidratava la barreja amb una quantitat equivalent d'aigua destil·lada on prèviament s'havia dissolt el clorur de colina. Després de 5 minuts s'afegia l'oli i el tocoferol. Se seguia remenant entre 5 i 10 minuts més, en funció de la viscositat de la barreja obtinguda, per tal de garantir una massa de composició homogènia.

Per a l'elaboració del pinso en grànuls, la massa era processada amb un aparell Simac Pastamatic 700, mitjançant el qual s'obtenien, per pressió, uns filaments de 2.5 mm de diàmetre. Aquests filaments eren assecats a 70°C durant 24 hores, per a ésser posteriorment fragmentats manualment fins a aconseguir grànuls de 3 a 5 mm de llarg i 2 mm de diàmetre.

### 3.3. ESQUEMA EXPERIMENTAL

Per a estudiar els efectes dels diferents suplementos alimentaris sobre el creixement, la nutrició i el metabolisme dels juvenils d'orada, es dissenyaren experiments en els quals s'alimentaven les orades amb les dietes experimentals durant un període que, depenent dels objectius fixats, podia ser de 20 a 54 dies. Tal i com es representa a la Figura 12, al llarg de l'experiment s'obtenien diferents dades i mostres biològiques amb les quals analitzar els diferents paràmetres morfològics, nutricionals, bioquímics i moleculars d'interès.

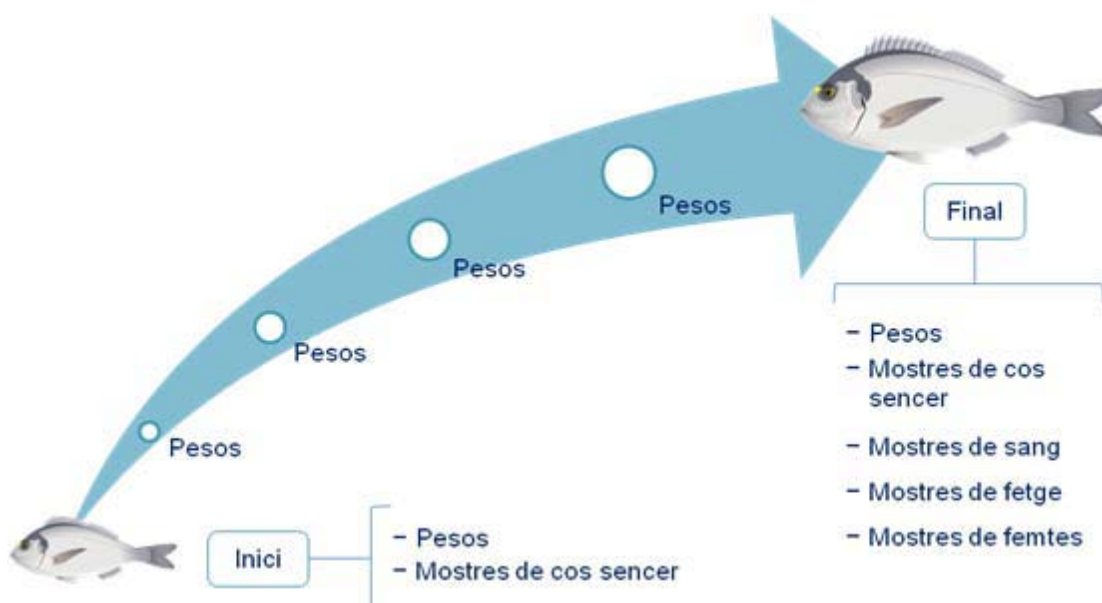


Figura 12. Esquema experimental per a l'estudi del creixement, la nutrició i el metabolisme dels juvenils d'orada.

En cadascun dels experiments:

1. Cada 7-10 dies, es pesaven les orades individualment i es calculava el pes mitjà per a cada aquari. Diàriament es quantificava (Apartat 3.4) i s'anotava la quantitat de dieta ingerida. Els valors de pes i ingesta s'utilitzaren posteriorment per a calcular:
  - La taxa de creixement de les orades (Apartat 3.4)
  - La ingesta diària de pinso (Apartat 3.4)
  - La taxa de conversió de l'aliment en biomassa animal (Apartat 3.7)
2. Per a analitzar la composició corporal inicial i final de les orades (Apartat 3.6), se sacrificaven 10-12 peixos a l'inici i 5 peixos per aquari al final de cada experiment. Un cop analitzada la composició química de les orades, es calculava:
  - Retenció de la proteïna de la dieta (Apartat 3.7)

- Retenció del greix de la dieta (Apartat 3.7)
3. Al final de l'experiment, se sacrificaven 8-12 peixos per aquari i s'obtenien diferents mostres biològiques:
- Mostres de sèrum, on s'analitzaren glucosa i triglicèrids (Apartat 3.8.1)
  - Mostres de fetge, per a determinar:
    - Índex hepatosomàtic (Apartat 3.7)
    - Glucogen i triglicèrids (Apartat 3.8.2)
    - Glutamat i glutamina (Apartat 3.8.3)
    - Activitat d'enzims clau del metabolisme intermediari (Apartat 3.9)
    - Nivells d'expressió gènica d'enzims clau del metabolisme intermediari (Apartat 3.10)
  - Mostres de femtes, amb les quals analitzar:
    - Digestibilitat de la dieta i de diferents nutrients (Apartat 3.11)
    - Ingesta diària digerible (Apartat 3.11)
    - Pèrdues fecals (Apartat 3.11)



### 3.4. SEGUIMENT DEL CREIXEMENT I LA INGESTA DE LES ORADES

Els juvenils emprats als experiments arribaven a les nostres instal·lacions amb un pes inicial de 2 a 5 g, procedents de l'empresa de cria (*hatchery*) Piscimar (Andromeda Group, Burriana, Castelló). A la seva arribada els peixos eren pesats i distribuïts aleatòriament en els diferents aquaris, en grups de 15-25 peixos per aquari. Durant les dues setmanes següents es permetia que els peixos s'acimatessin a les noves condicions d'establació, alimentant-los un cop al dia, a raó d'un 2% del seu pes corporal, amb una dieta comercial Microbaq 15 (Dibaq-Diproteg).

Un cop finalitzat el període d'acimatació, s'iniciava l'experiment amb una nova pesada, per tal d'establir el pes inicial dels peixos, i l'assignació aleatòria d'una dieta a cadascun dels aquaris. Al llarg d'un experiment els peixos eren pesats un cop cada 7-10 dies a fi de seguir el seu creixement i, en cas que fossin alimentats en funció d'un percentatge del seu pes, ajustar les racions de pinso a subministrar diàriament. Sota el supòsit que els peixos creixessin seguint el model exponencial, s'optà per calcular la seva taxa de creixement específic o SGR (*specific growth rate*), mitjançant la següent fórmula:

$$SGR = \frac{\ln(P_2/P_1)}{t}$$

on

t: temps transcorregut entre ambdues pesades (en dies)

P<sub>1</sub>: Pes mitjà dels peixos a l'inici del període

P<sub>2</sub>: Pes mitjà dels peixos al final del període

Per a expressar la SGR com a percentatge d'increment del pes per dia:

$$\%/dia = (e^{SGR} - 1) \times 100$$

El seguiment dels valors de SGR durant l'experiment resultaren útils per avaluar la variància entre grups de peixos alimentats amb la mateixa dieta. Generalment aquesta variància era deguda a divergències en els paràmetres fisicoquímics de l'aigua, per tant, controlable. D'altra banda, les diferències acumulades en el creixement degudes a la dieta subministrada s'avaluaren a partir del valor SGR total, és a dir, el que abasta tot el període experimental.

Els peixos eren pesats individualment mitjançant un granetari (Sartorius) amb una precisió de 0.01 g. Tant si eren pesats com si eren sacrificats, per a facilitar la manipulació i minimitzar l'estrès produït als animals, els peixos eren prèviament anestesiats via immersió en un aquari auxiliar de 5L amb aigua de mar amb una concentració de 70 mg/L d'MS-222 (metasulfonat de tricaina). Seguidament eren pesats en tandes de 5 a 10 peixos, de tal manera que cap exemplar romangués més de 10 minuts sota l'exposició de l'anestèsic. Finalitzada l'operació, es deixava que els peixos es recuperessin de l'anestèsia en un altre aquari amb aigua de mar sense anestèsic abans de retornar al seu aquari d'origen.

Segons l'experiment, les orades podien ser alimentades amb una ració fixada segons el pes total dels exemplars de l'aquari, o fins a sacietat. En el primer cas, s'oferia una ració diària de pinso corresponent al 4% de la massa total d'orades en l'aquari. Aquesta ració era subministrada de dilluns a divendres en dues porcions iguals (del 2% cadascuna), una al matí (a les 9:30) i una a la tarda (a les 15:30). Els caps de setmana es va oferir una única ració del 2%. En aquestes condicions, les orades consumien tot el pinso en menys de 15 minuts, per tant, no calien correccions en l'anotació de la quantitat de pinso ingerida a cada aquari.

En cas que les orades fossin alimentades a sacietat, el pinso se subministrava a intervals de 5-10 minuts i s'observava el comportament dels peixos. En detectar la pèrdua d'interès de les orades cap el pinso i l'acumulació d'aquest en el fons, es deixava d'oferir més aliment. Transcorreguts uns altres 5-10 minuts, es recollia el pinso no ingerit del fons de l'aquari, i s'assecava a 70°C fins a pes constant. Un cop sec, el pes del pinso no ingerit era restat al pes del pinso ofert. D'aquesta manera, es va realitzar el seguiment de la ingesta diària de pinso a cada aquari. Igual que amb la ració fixa, se subministrava pinso dos cops al dia de dilluns a divendres, una vegada al matí i una altra a la tarda; i un cop al dia el cap de setmana.

Al final de cada experiment es va calcular la ingesta diària de pinso a cada aquari mitjançant la següent fórmula:

$$\text{Ingesta (g/Kg dia)} = \frac{\text{g de dieta ingerits (pes sec)}}{\text{Biomassa mitjana (Kg)} \times \text{durada experiment (dies)}}$$

on la biomassa mitjana representa la mitjana aritmètica entre la massa total d'orades a l'inici i al final de l'experiment, és a dir:

$$\text{Biomassa mitjana (Kg)} = \frac{\text{Biomassa orades final (Kg)} - \text{Biomassa orades inicial(Kg)}}{2}$$

### 3.5. SACRIFICI I PRESA DE MOSTRES

El protocol de sacrifici dels peixos variava segons el tipus de mostra que es volgués obtenir. Per a obtenir mostres de cos sencer per a l'anàlisi de la composició dels peixos, el sacrifici es realitzava 24 hores després de la darrera ingesta i per sobredosi d'anestèsic (immersió en aigua de mar amb 1 g/L de MS-222). A continuació, els cossos eren eixugats amb paper de filtre, agrupats per aquari i homogeneïtzats en fresc amb una picadora de carn. Per finalitzar, els homogenats s'assecaven a 70°C fins a pes constant i es conservaven a -30°C fins l'anàlisi.

Per a l'obtenció de mostres de sèrum i teixits, els peixos eren sacrificats sota anestèsia passades 24 hores des de la darrera ingesta amb un tall cervical. Una vegada realitzat el tall, es recollia la sang amb una pipeta Pasteur de vidre prèviament rentada amb solució de citrat sòdic al 3%. D'altra banda, es realitzava un tall ventral a l'animal, se n'extreia el fetge i es rentava submergint-lo en una solució de NaCl al 0,9%. Immediatament després de eixugar-lo amb paper de filtre, es congelava el fetge amb nitrogen líquid i es guardava a -80°C fins que era utilitzat. En finalitzar el mostreig, les mostres de sang (conservades fins aquell moment en gel) es centrifugaven a 4000 rpm durant 15 minuts a 4°C, se'n retirava el sèrum (sobrenedant) i es conservava a -30°C fins l'anàlisi.

Abans de realitzar les diferents anàlisis bioquímiques i moleculars en els fetges mostrejats, primerament aquests havien de ser polvoritzats amb un morter, mantenint en tot moment la temperatura mostra i el morter per sota dels -80°C amb nitrogen líquid.

### 3.6. ANÀLISI DE LA COMPOSICIÓ CORPORAL

#### 3.6.1. Humitat

Durant la preparació de les mostres per a les anàlisis de composició, aquestes eren assecades a 70°C fins a pes constant. La diferència entre el pes de la mostra a l'inici (pes fresc) i al final (pes sec) d'aquest procés correspondria al contingut d'aigua o humitat.

$$\% \text{ humitat} = \frac{\text{Pes fresc} - \text{Pes sec}}{\text{Pes fresc}} \times 100$$

#### 3.6.2. Proteïna crua

Per a quantificar el contingut proteic de les dietes i els peixos, en primer lloc era necessari determinar el seu contingut en nitrogen elemental a través d'un analitzador elemental Carlo-Erba NA 2100 (CE Instruments). Per a tal fi, es pesava 1 mg de mostra dins d'una càpsula d'estany de 4x6 mm, afegint-hi uns 3 mg de pentòxid de vanadi ( $V_2O_5$ ). Un cop dins de l'aparell la submostra era oxidada per combustió instantània en una atmosfera d'oxigen pur. Com a resultat de la combustió, el nitrogen i el carboni orgànic i inorgànic de la mostra passava a nitrogen molecular ( $N_2$ ) i diòxid de carboni ( $CO_2$ ). A continuació, aquests gasos eren arrossegats per un flux d'heli a través d'un forn de reducció, en el qual es reduïa qualsevol residu de  $NO_x$  a  $N_2$ . Finalment, després de passar per una columna cromatogràfica,  $N_2$  i  $CO_2$  arribaven separatament a un detector de conductivitat tèrmica el qual generava un senyal elèctric proporcional a la concentració d'aquests dos elements. La concentració de proteïna crua de la submostra s'estimava multiplicant la concentració de N obtinguda (en % de pes sec) per un factor de 6.25, atès que les proteïnes contenen comunament un 16% de N.

La preparació de la mostra i la quantificació del seu contingut de nitrogen foren realitzades a la Unitat de Tècniques Separatives del Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT UB).

#### 3.6.3. Contingut de greix

Els lípids de les dietes i les mostres homogeneïtzades de peix s'extreïen amb èter de petroli mitjançant un aparell Tecator Soxtec HT 1043 (Foss). Per a la preparació de la submostra a analitzar, es pesaven 2 g de la mostra original sobre paper de filtre i s'afegien una punta d'espàtula de sulfat de sodi ( $Na_2SO_4$ ) per a evitar que la mostra absorbís humitat ambiental. Tot seguit, s'empaquetava la submostra plegant el paper sobre el qual havia estat

pesada, es col·locava dins d'un cartutx de cel·lulosa i es tapava l'obertura del cartutx amb fibra de cotó. Un cop col·locat el cartutx dins de la columna d'extracció, s'iniciava el procés d'extracció dels lípids, el qual s'efectuava en tres etapes.

1. A la primera etapa, el cartutx amb la submostra era submergit durant 15 minuts en 50 mL d'èter de petroli en ebullició dins d'una càpsula d'alumini. Paral·lelament al bullit de la mostra, el vapor d'èter alliberat es condensava en arribar al circuit de refrigeració i tornava a la càpsula d'alumini, esbandint contínuament la mostra.
2. A la segona etapa s'aixecava el cartutx i es deixava suspès sobre el solvent en ebullició durant 40 minuts. Les successives esbandides durant aquesta etapa acabaven d'extreure el greix romanent a la mostra.
3. A la darrera etapa, de 15 minuts de durada, s'impedia el retorn de l'èter condensat mitjançant una vàlvula interna, concentrant l'extracte dins de la càpsula d'alumini. Per tal d'eliminar qualsevol residu de dissolvent o d'humitat, es deixaven les càpsules en estufa a 100°C durant 5 minuts.

Finalment, es deixaven refredar fins a temperatura ambient en un dessecador i es pesaven. El contingut de greixos de la mostra es calculava segons la següent fórmula:

$$\% \text{ Greix} = \frac{(\text{Pes final} - \text{Tara de la càpsula})}{\text{Pes mostra}} \times 100$$

De manera semblant a la mesura del pes final (càpsula més extracte), la tara de la càpsula es mesurava després d'haver-la escalfat prèviament a 100°C durant 30 minuts.

#### **3.6.4. Contingut de cendres**

Per a poder determinar el contingut de cendres de les dietes i les mostres de peix, es pesaven submostres de 200 mg en gresols de ceràmica refractària i es calcinaven en un forn mufla (Hobersal 12PR/300, Hobersal) a 450°C durant 12 hores. Per evitar una combustió violenta de la mostra, l'augment de la temperatura durant el procés de calcinació de la mostra havia de ser lent i gradual. Per aquest motiu es va configurar la següent rampa de temperatura:

1. Pujada de temperatura, a 1.5°C/min fins a 200°C (2 h).
2. Estabilització de la mostra a 200°C durant 2 h.
3. Pujada de temperatura, a 1.4°C/min fins a 450°C (3 h).

#### 4. Calcinació a 450°C durant 12 h.

En finalitzar la calcinació es deixava refredar la mostra fins a temperatura ambient en un dessecador i es pesava. El contingut de cendres es calculava mitjançant la següent fórmula:

$$\% \text{ Cendres} = \frac{(\text{Pes final} - \text{Tara del gresol})}{\text{Pes mostra}} \times 100$$

La tara del gresol es mesurava després de sotmetre'l a la temperatura de calcinació (450°C) durant 1 hora.

El laboratori on es realitzaren les calcinacions, així com el material i el forn mufla pertanyen als Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT UB).

#### 3.6.5. Anàlisi de la composició en aminoàcids de la dieta

Per a l'anàlisi de la composició d'aminoàcids de la dieta, primerament les mostres de pinso van ser hidrolitzades amb HCl 6M, en presència d'un 0.4% de fenol, a 105°C durant 24 hores en tubs segellats al buit. Com a patró intern de l'hidrolitzat es va afegir àcid -aminobutíric (AABA). Els aminoàcids lliures van ser derivatitzats amb 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamat (AQC) per ser detectats posteriorment a 254 nm. Els aminoàcids es van analitzar amb cromatografia líquida d'alta eficàcia (*high performance liquid chromatography* o HPLC) per l'equip de la Unitat de Tècniques Separatives dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiT UB).

Protocol:

1. En un tub de vidre es pesaven 15 mg de mostra i 15 mg de fenol. A continuació s'afegien 1600 µL d'una dissolució de AABA 2.5 mM i 1600 µL d'HCl 12 N.
2. S'eliminava l'oxigen del tub amb una bomba de buit i es segellava fonent l'extrem superior amb una flama.
3. S'hidrolitzava la mostra a 105°C durant 24 hores sota campana.
4. S'avocava l'hidrolitzat en un got de precipitats i es deixava evaporar a temperatura ambient, en un dessecador connectat a una bomba de buit.
5. Un cop evaporada l'aigua i l'HCl, es dissolia el precipitat amb 10 ml d'aigua destil·lada. A continuació, es diluïa 2.5 ml d'aquesta dissolució amb aigua destil·lada fins els 10 ml.

6. La derivatització dels aminoàcids es realitzava emprant els reactius i el protocol del AccQTag pre-column derivatization kit (Waters).

El sistema cromatogràfic emprat per l'equip de la Unitat de Tècniques Separatives del CCiT UB era el següent:

- Un aparell Waters 717plus Autosampler (Waters) que controlava la injecció de les mostres en l'aparell cromatogràfic.
- Un aparell Waters Delta 600 Chromatographic System (Waters) que separava els aminoàcids mitjançant una columna cromatogràfica Nova-Pak C18 4  $\mu\text{m}$ , 3.9 x 150 mm (Waters).
- Un aparell Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance Detector (Waters) que detectava els aminoàcids derivatitzats a 254 nm.

Donat que la hidròlisi àcida converteix la glutamina i l'asparagina en glutamat i aspartat, respectivament, la concentració d'aquests aminoàcids es va representar com a Glx i Asx. Així doncs, Glx correspondria a la suma de les concentracions de la glutamina i el glutamat, mentre que Asx resultaria de la suma de l'asparagina i l'aspartat.

### 3.7. CÀLCULS DE L'APROFITAMENT DE LA DIETA I L'ÍNDEX HEPATOSOMÀTIC

A partir dels valors de pes, ingesta i composició corporal de les orades es van calcular diferents taxes per avaluar les variacions en l'eficiència alimentària dels peixos segons la dieta subministrada.

Taxa de conversió de l'aliment en biomassa animal o FCR (*Feed Conversion Ratio*):

$$\text{FCR} = \frac{\text{g de dieta ingerits (pes sec)}}{\text{g de biomassa guanyats (pes fresc)}}$$

Retenció de la proteïna de la dieta:

$$\% \text{ Retenció proteïna} = \frac{\text{g de proteïna guanyats (pes sec)}}{\text{g de proteïna ingerits (pes sec)}} \times 100$$

Retenció del greix de la dieta:

$$\% \text{ Retenció greix} = \frac{\text{g de greix guanyats (pes sec)}}{\text{g de greix ingerits (pes sec)}} \times 100$$

Com a complement per a l'avaluació de l'estat nutricional de les orades es va calcular també l'índex hepatosomàtic o IHS:

$$\% \text{ IHS} = \frac{\text{g de fetge (pes fresc)}}{\text{g de pes corporal (pes fresc)}} \times 100$$

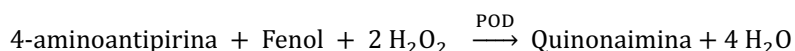
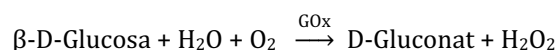


### 3.8. ANÀLISI DE METABÒLITS EN FETGE I SÈRUM

#### 3.8.1. Determinació de glucosa i triglicèrids en sèrum

Les concentracions de glucosa i triglicèrids es determinaven mitjançant els kits comercials Glucose MR i Triglycerides MR (Linear Chemicals). Tots dos mètodes es basen en reaccions enzimàtiques que, a partir del metabòlit d'interès, donen lloc a una quantitat proporcional d'un compost que absorbeix a una longitud d'ona de 500 nm. Els protocols descrits pel fabricant van ser adaptats per a ser executats en un autoanaltzador Cobas Mira S (Roche).

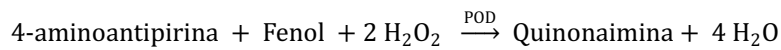
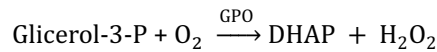
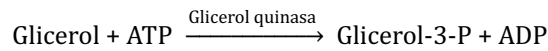
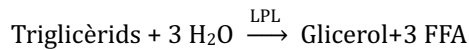
Per a la determinació de la concentració de glucosa, la glucosa present en el sèrum era primerament oxidada a D-gluconat per acció de la glucosa oxidasa (GOx, EC 1.1.3.4), formant peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En la reacció enzimàtica acoplada es produeix una quinona vermella a partir de la reacció del peròxid amb fenol i 4-aminoantipirina (reacció de Trinder) en presència de peroxidasa (POD).



Protocol:

Es mesclaven 2.5 µL de mostra amb 200 µL del monoreactiu subministrat amb el kit, que contenia els enzims i substrats necessaris per a la reacció. La reacció es deixava incubar a 30°C durant 12 minuts. La variació de l'absorbància a 500 nm era mesurada a punt final i la concentració de glucosa era estimada a partir d'una corba patró amb concentracions de glucosa compreses entre 6.25 i 200 mg/dL. En cas de ser necessari, les mostres de sèrum foren diluïdes amb aigua destil·lada.

Per a la determinació de la concentració de triglicèrids, en primer lloc aquests van haver de ser hidrolitzats a glicerol i àcids grassos lliures (FFA) per acció de la lipoprotein lipasa (LPL, EC 3.1.1.34). El glicerol alliberat era fosforilat per l'enzim glicerol quinasa (EC 2.7.1.30) a glicerol-3-fosfat. Seguidament, el glicerol-3-fosfat era oxidat per l'enzim glicerolfosfat oxidasa (GPO, EC 1.1.3.21), produint dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i peròxid d'hidrogen. Finalment, a través de la reacció de Trinder, el peròxid d'hidrogen produïa quinonaimina.



Protocol:

Es mesclaven 3 µL de mostra amb 200 µL del monoreactiu subministrat en el kit i que contenia tots els enzims i substrats necessaris per a la reacció. La reacció es deixava incubar a 30°C durant 4 minuts. La variació de l'absorbància a 500 nm era mesurada a punt final i la concentració de triglicèrids era estimada a partir d'una corba patró amb concentracions compreses entre 12.5 i 200 mg/dL.

### 3.8.2. Determinació de glucogen i triglicèrids en fetge

Per a l'anàlisi de la concentració de glucogen i triglicèrids en el fetge de les orades, en primer lloc, es van homogeneïtzar uns 50 mg de fetge en pols afegint HClO<sub>4</sub> 0.6 M en una relació 1:5 p/v (mg/ µL) i fent ús d'un PTA-7 Polytron. Amb aquest extracte es va determinar, per una banda, el contingut de glucogen segons el mètode descrit per Keppler i Decker (1974):

1. A 100 µl d'extracte se'ls hi afegia 100 µl d'aigua destil·lada i es neutralitzava amb 100 µl de KHCO<sub>3</sub> 1M.
2. S'afegien 2 mL d'una dissolució d'amiloglucosidasa 70 U/mL (Sigma) (EC 3.2.1.3) tamponada a pH 4.8 amb d'acetat sòdic 0.2 M. Es deixava incubar la mescla de reacció durant 2 hores a 40°C. L'amiloglucosidasa hidrolitza el glucogen i allibera la glucosa continguda.
3. Es parava la reacció afegint 1 mL d'HClO<sub>4</sub> 0.6 M. Es centrifugava la mescla a 4000 rpm durant 15 minuts.
4. S'obtenia el sobrenedant i s'assajava el concentració de glucosa seguint el mateix protocol descrit per a la glucosa sèrica (apartat 3.8.1).
5. El contingut de glucogen en fetge s'expressa com mg de glucosa per gram de fetge.

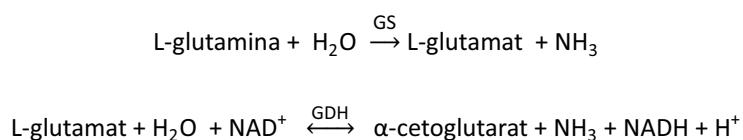
Per altra banda, es va determinar el contingut de triglicèrids en els fetges:

1. 50 µl d'extracte es neutralitzava amb 10 µl de KHCO<sub>3</sub> 1M i s'afegien 190 µl d'una dissolució amb NP-40 al 0.5%, tamponada a pH 7.5 amb Tris-HCl 50 mM.
2. Per a garantir l'extracció i solubilització dels triglicèrids, la mostra s'escalfava a 80°C durant 5 minuts. Aquesta operació es repetia dos cops, deixant refredar la mostra entre una vegada i l'altra.
3. Tot el material insoluble es retirava centrifugant la mostra a 13000 rpm durant 2 minuts i extraient el sobrenedant.
4. S'assajava la concentració de triglicèrids de la mostra seguint el mateix protocol descrit per als triglicèrids sèrics (apartat 3.8.1).
5. El contingut de triglicèrids en fetge s'expressa en mg de triglicèrids per gram de fetge.

### 3.8.3. Determinació de glutamat i glutamina en fetge

De manera semblant als triglicèrids i el glucogen, per quantificar els nivells de glutamat i glutamina lliures en el fetge de les orades, s'homogeneïtzaven uns 25 mg de fetge en pols afegint d'HClO<sub>4</sub> 1.5 M en una relació 1:10 p/v (mg/ µL) i fent ús d'un PTA-7 Polytron. A continuació s'eliminava la proteïna precipitada centrifugant la mostra a 10000 rpm durant 10 minuts i extraient només el sobrenedant.

La concentració de glutamat i glutamina en el sobrenedant es va analitzar mitjançant el kit comercial de Sigma GLN-1. El mètode d'anàlisi es basa en les reaccions catalitzades per els enzims glutaminasa (GLS, EC 3.5.1.2) i glutamat deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2).



En afegir aquests dos enzims, i proporcionant les condicions adequades de pH i de substrats, s'oxiden la glutamina i el glutamat presents en els extractes hepàtics. Com a resultat d'aquesta oxidació, es redueix una quantitat proporcional de cofactor NAD<sup>+</sup> a NADH, el qual absorbeix llum a 340 nm. D'igual manera que amb la resta de metabòlits, els protocols descrits pel fabricant van ser adaptats per un autoanalitzador Cobas Mira S (Roche).

Per a cada mostra, es prenen dues alíquotes. En una d'elles, es desaminava la glutamina a glutamat mitjançant glutaminasa i després es determinava la concentració total de glutamat (alíquota Gln+Glu), mentre que en l'altra, es determinava directament la concentració inicial

de glutamat de la mostra (alíquota Glu). En restar tots dos resultats s'obtenia, per tant, a la concentració de glutamina.

La mescla de reacció per a la conversió de la glutamina de la mostra en glutamat va ser la següent:

	<b>Reactius<sup>1</sup></b>	<b>Concentració inicial</b>	<b>Concentració final</b>	<b>Gln + Glu μL</b>	<b>Glu μL</b>
R	Tampó acetat, pH 5.0	0.5 mM	0.1 mM	40	40
	GS	10 U/mL	1 U/mL	20	-
	H <sub>2</sub> O destil·lada			90	110
S	Extracte de fetge			50	50
			<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>200</b>

<sup>1</sup> Tots els reactius emprats són originals del kit de Sigma GLN-1. Seguint les recomanacions del fabricant, els reactius es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

Per a la determinació del glutamat a la mostra:

	<b>Reactius<sup>1</sup></b>	<b>Concentració inicial</b>	<b>Concentració final</b>	<b>Gln + Glu μL</b>	<b>Glu μL</b>
R	Tris-HCl	0.1 M	50 mM	100	100
	Hidrazina	0.1 M	50 mM		
	NAD	30 mM	1.5 mM	10	10
	ADP	100 mM	0.5 mM	1	1
	H <sub>2</sub> O destil·lada			44	44
R1	GDH	1 U/mL	0.22 U/mL	20	20
	Extracte digerit amb GS			25	25
			<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>200</b>

<sup>1</sup> Tots els reactius emprats són originals del kit de Sigma GLN-1. Seguint les recomanacions del fabricant, els reactius es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

### 3.9. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT D'ENZIMS CLAU DEL METABOLISME HEPÀTIC

Al llarg de la present tesi, l'assaig de l'activitat enzimàtica en fetge va permetre analitzar com afecta la composició de la dieta al metabolisme intermediari de l'orada. A la Taula 4 s'indiquen els diferents enzims analitzats agrupats segons la via metabòlica a la que participen.

Taula 4. Selecció d'enzims per a l'estudi del metabolisme intermediari en el fetge de les orades.

Glucòlisi	Via de la pentosa fosfat
Glucquinasa	Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa
Fosfofructoquinasa-1	6-fosfogluconat deshidrogenasa
Piruvat quinasa	

Gluconeogènesi	Metabolisme dels aminoàcids
Fructosa 1,6-bifosfatasa	Alanina aminotransferasa
	Aspartat aminotransferasa
	Glutamat deshidrogenasa

#### 3.9.1. Preparació dels extractes de fetge

Per tal de determinar l'activitat dels enzims involucrats amb el metabolisme hepàtic, primerament s'havia d'homogeneïtzar la mostra de fetge en una dissolució tamponada a un pH òptim.

Protocol :

1. Es pesaven 50-60 mg de fetge en pols, als quals se'ls afegia un tampó d'homogeneïtzació, refredat en gel, en una relació 1:5 p/v (mg/ µL). D'aquí en endavant, la mostra va restar en gel en tot moment.
2. S'homogeneïtzava la mostra amb un PTA-7 Polytron (posició 3-4) durant 10 segons.
3. L'extracte es centrifugava a 13000 rpm durant 45 minuts a 4°C.
4. Es va recollir el sobrenedant i es van descartar la capa superior de greix així com els residus cel·lulars compactats al fons.
5. Addicionalment, els extractes per a l'assaig de l'activitat glucoquinasa es filtraven a través d'una columna Sephadex G-25 (Sigma), equilibrada amb tampó d'homogeneïtzació (sense sacarosa).

### Tampó d'homogeneïtzació

50 mM Tris-HCl pH 7.5

0.5 mM-PMSF

4 mM-EDTA

1 mM-DTT

50 mM-NaF

250 mM-sacarosa

100 mM-KCl\*

\*. Només present en extractes per a la determinació de l'activitat glucoquinasa i per a la columna de Sephadex G-25.

### **3.9.2. Determinació de l'activitat enzimàtica**

L'activitat enzimàtica en els extractes va ser assajada a 30°C, amb concentracions saturants de substrats i pH òptim perquè la velocitat de la reacció fos màxima. La velocitat de les reaccions en les quals participen els cofactors NADPH i NADH van ser monitoritzades seguint l'absorbància a 340 nm. Algunes de les reaccions enzimàtiques, però, no utilitzen cofactors NADPH o NADH, per tant, no es podien assajar directament. En aquest cas, a la reacció principal se li acoblava una segona reacció que tenia com a substrats el producte de la primera i un d'aquests cofactors.

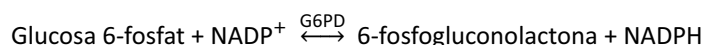
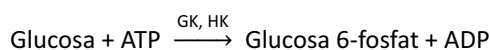
Els diferents mètodes de determinació de l'activitat enzimàtica foren prèviament adaptats i calibrats per a ser realitzats amb un autoanaltzador Cobas Mira S (Roche).

Les activitats enzimàtiques s'expressen en U per g de proteïna (U = 1 mmol de producte format/min). El contingut proteic dels extractes es va determinar a través del mètode de Bradford (1976), amb albúmina de sèrum boví com a estàndard.

#### **3.9.2.1. Determinació de l'activitat glucoquinasa**

La glucoquinasa (GK, EC 2.7.1.2) catalitza la fosforilació de la glucosa en presència d'ATP per a formar glucosa 6-fosfat i ADP. Per a mesurar l'activitat GK es va acoblar una segona reacció catalitzada per la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49), en la que la glucosa 6-fosfat s'oxida a 6-fosfogluconolactona amb la concomitant reducció de NADP<sup>+</sup> a NADPH. La formació de NADPH resulta en l'augment de l'absorbància a 340 nm de la mescla de reacció.

Part de l'activitat GK mesurada és atribuïble a l'activitat hexoquinasa (HK, EC 2.7.1.1). Aprofitant que la  $K_M$  de la HK és molt inferior al de l'GK (Wilson, 1994), es determinava l'activitat de totes dues emprant dos concentracions de glucosa diferents: 100 mM per a la GK i 0.5 mM per a l'HK.



El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Davidson i Arion (1987). La mescla de reacció per mesurar l'activitat GK i HK va ser la següent:

	Reactius	Concentració inicial	Concentració final	GK uL	HK uL
R	Tris-HCl, pH 7.75 <sup>1</sup>	250 mM	100 mM	80	80
	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1000 mM	7.5 mM	1.5	1.5
	KCl <sup>1</sup>	1000 mM	100 mM	20	20
	DTT <sup>1</sup>	100 mM	2.5 mM	5	5
	NADP <sup>2</sup>	20 mM	1 mM	10	10
	G6PD <sup>2</sup>	2.5 mU	1 mU/mL	2.5	2.5
R1 GK	ATP <sup>1</sup>	60 mM	6 mM	20	-
	Glucose <sup>1</sup>	1000 mM	100 mM	20	-
R1 HK	ATP <sup>1</sup>	60 mM	6 mM	-	20
	Glucose <sup>1</sup>	10 mM	0.5 mM	-	10
	H <sub>2</sub> O destil·lada			36	46
	Extracte de fetge			5	5
			Total	200	200

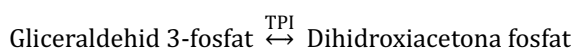
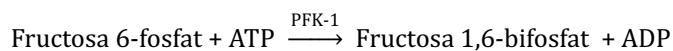
<sup>1</sup> Les dissolucions de Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, ATP (Sigma) i glucosa (Sigma) es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

<sup>2</sup> Les dissolucions de NADP (Sigma) i G6PD (Sigma) es preparaven just abans de cada assaig. El recipient que contenia la dissolució de NADP es cobria amb paper d'alumini per evitar-ne la degradació.

### 3.9.2.2. Determinació de l'activitat fosfofructoquinasa

La fosfofructoquinasa-1 (PFK-1, EC 2.7.1.11) catalitza la fosforilació de la fructosa 6-fosfat en presència d'ATP per formar fructosa 1,6-bifosfat i ADP. Per mesurar l'activitat PFK-1 es van acoblar tres reaccions més, catalitzades per tres enzims diferents. La primera d'aquestes reaccions la catalitza l'aldolasa A o fructosa bifosfat aldolasa (AldoA, 4.1.2.13), la qual trenca la fructosa 1,6-bifosfat formada per la PFK-1 en gliceraldehid 3-fosfat i dihidroxiacetona fosfat. A continuació, la triosa fosfat isomerasa (TPI, EC 5.3.1.1) transforma el gliceraldehid 3-fosfat en

dihidroxiacetona fosfat. Per últim, la dihidroxiacetona és reduïda a glicerol 3-fosfat per acció de la glicerol 3-fosfat deshidrogenasa (GPDH, EC 1.1.1.8). En aquesta reacció s'oxida NADPH a NADP<sup>+</sup>, així doncs, l'absorbància de la mescla de reacció a 340 nm disminueix proporcionalment a la conversió de fructosa 6-fosfat a fructosa 1,6-bifosfat.



El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Castano et al. (1979). La mescla de reacció per a mesurar l'activitat PFK-1 va ser la següent:

	Reactius	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R	Tris-HCl, pH 8,25 <sup>1</sup>	200 mM	105	105 mM
	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1 M	1	5 mM
	KCl <sup>1</sup>	1 M	10	0.05 M
	NADH <sup>2</sup>	10 mM	3	0.15 mM
	Sulfat amònic <sup>1</sup>	400 mM	2	4 mM
	β-mercapto-etanol <sup>1</sup>	200 mM	12	12 mM
	F6P <sup>1</sup>	100 mM	20	10 mM
	G6P <sup>1</sup>	300 mM	20	30 mM
	Aldolasa <sup>3</sup>	2.1 mU		0.7 U/mL
	TPI <sup>3</sup>	15 mU	3	5 U/mL
	GPDH <sup>3</sup>	6 mU		2 U/mL
	R1	ATP <sup>1</sup>	10 mM	20
	Extracte de fetge		4	
	Total		200	

<sup>1</sup> Les dissolucions de Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, sulfat amònic, fructosa 6-fosfat (Sigma), glucosa 6-fosfat (Sigma) i ATP (Sigma) es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi. Les alíquotes de β-mercapto-etanol (Sigma) es guardaven a 4°C.

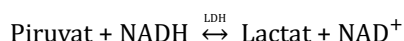
<sup>2</sup> La solució de NADH (Sigma) es preparava just abans de cada assaig i es cobria el recipient que la contenia amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

<sup>3</sup> Es preparava una única dissolució amb la AldoA (Sigma), la TPI (Sigma) i GPDH (Sigma), també just abans de cada assaig.



### 3.9.2.3. Determinació de l'activitat piruvat quinasa

La piruvat quinasa (PK, EC 2.7.1.40) catalitza la transferència d'un grup fosfat del fosfoenolpiruvat a una molècula d'ADP per formar piruvat i ATP. Per a mesurar l'activitat PK es va acoblar una segona reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), en la qual el piruvat es redueix a lactat amb la concomitant oxidació de NADH a NAD<sup>+</sup>. L'oxidació de NADH resulta en la reducció de l'absorbància a 340 nm de la mescla de reacció.



El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Staal et al. (1975). La mescla de reacció per mesurar l'activitat PK va ser la següent:

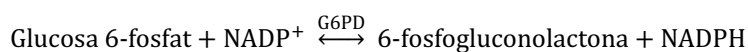
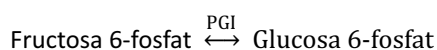
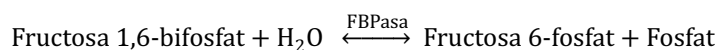
	Reactius	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R	Glicil-glicina, pH 7.4 <sup>1</sup>	100 mM	177.8	88.9 mM
	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1 M	2.5	0.0125 M
	KCl <sup>1</sup>	1 M	25	0.125 M
	NADH <sup>2</sup>	10 mM	3.75	0.1875 mM
	PEP <sup>1</sup>	50 mM	14	3.5 mM
	LDH <sup>2</sup>	78.8 mU	3.75	21 U/mL
R1	ADP <sup>1</sup>	30 mM	20.7	2.5 mM
	Extracte de fetge		4	
		Total	251.5	

<sup>1</sup> Les dissolucions de glicil-glicina, MgCl<sub>2</sub>, KCl, PEP (Sigma) i ADP (Sigma) es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

<sup>2</sup> Les dissolucions de NADH (Sigma) i LDH (Sigma) es preparaven just abans de cada assaig. El recipient que contenia la dissolució de NADH es cobria amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

### 3.9.2.4. Determinació de l'activitat fructosa 1,6-bifosfatasa

La fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11) catalitza la conversió de la fructosa 1,6-bifosfat a fructosa 6-fosfat. Per a mesurar l'activitat FBPasa es van acoblar dues reaccions més, catalitzades per dos enzims diferents. En la primera reacció, la glucosa 6-fosfate isomerasa (PGI, EC 5.3.1.9) transforma la fructosa 6-fosfat en glucosa 6-fosfat, que posteriorment és oxidada per la G6PD a 6-fosfogluconolactona. En aquesta darrera reacció es redueix NADP<sup>+</sup> a NADPH, per tant, augmenta l'absorbància de la mescla de reacció a 340 nm.



El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Ekdahl i Ekman (1985). La mescla de reacció per mesurar l'activitat FBPasa va ser la següent:

	Reactius	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R	Imidazol-HCl, pH 7,4 <sup>1</sup>	100 mM	170	85 mM
	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1 M	1	0.005 M
	NADP <sup>2</sup>	10 mM	10	0.5 M
	β-mercapto-etanol <sup>1</sup>	200 mM	12	12 mM
	Fructosa 1,6-bifosfat <sup>1</sup>	5 mM	2	0.05 mM
	PGI <sup>3</sup>	2.5 mU	1	2.5 U/mL
	G6PD <sup>3</sup>	0.48 mU		0.48 U/mL
	Extracte de fetge		4	
	Total		200	

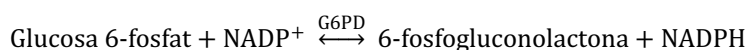
<sup>1</sup> Les dissolucions de imidazol-HCl, MgCl<sub>2</sub> i fructosa 1,6-bifosfat (Sigma) es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi. Les alíquotes de β-mercapto-etanol (Sigma) es guardaven a 4°C.

<sup>2</sup> La solució de NADP (Sigma) es preparava just abans de cada assaig i es cobria el recipient que la contenia amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

<sup>3</sup> Es preparava una única dissolució amb la PGI (Sigma) i la G6PD (Sigma), també just abans de cada assaig.

### 3.9.2.5. Determinació de l'activitat glucosa 6-fosfat deshidrogenasa

La glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) catalitza l'oxidació de la glucosa 6-fosfat en 6-fosfogluconolactona amb la concomitant reducció de NADP<sup>+</sup> a NADPH. La formació de NADPH resulta en l'augment de l'absorbància a 340 nm de la mescla de reacció.



El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Lee (1981). La mescla de reacció per mesurar l'activitat G6PD va ser la següent:

	Reactius	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R	Imidazole-HCl, pH 7.4 <sup>1</sup>	100 mM	155	77.5 mM
	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1 M	1	0.005 M
	Glucosa 6-fosfat <sup>1</sup>	10 mM	20	1 M
	NADP <sup>2</sup>	10 mM	20	1 mM
	Extracte de fetge		4	
	Total		200	

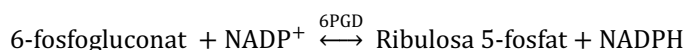
<sup>1</sup> Les dissolucions de imidazol-HCl, MgCl<sub>2</sub> i glucosa 6-fosfat (Sigma) es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

<sup>2</sup> La solució de NADP (Sigma) es preparava just abans de cada assaig i es cobria el recipient que la contenia amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

### 3.9.2.6. Determinació de l'activitat 6-fosfogluconat deshidrogenasa

La glucosa 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD, EC 1.1.1.43) catalitza l'oxidació del 6-fosfogluconat en ribulosa 5-fosfat amb la concomitant reducció de NADP<sup>+</sup> a NADPH. La formació de NADPH resulta en l'augment de l'absorbància a 340 nm de la mescla de reacció.

El protocol emprat es basa en el mètode descrit per Möellering i Bergmeyer (1984). La mescla de reacció per mesurar l'activitat 6PGD va ser la següent:



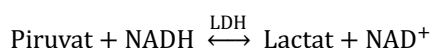
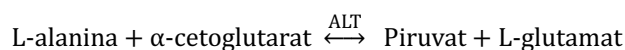
	Reactius	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R	Imidazole-HCl, pH 7.4 <sup>1</sup>	100 mM	165.4	82.7 mM
	MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	1 M	0.6	0.003 M
	6-fosfogluconat <sup>1</sup>	20 mM	20	2 M
	NADP <sup>2</sup>	10 mM	10	0.5 mM
	Extracte de fetge		4	
	Total		200	

<sup>1</sup> Les dissolucions de imidazol-HCl, MgCl<sub>2</sub> i 6-fosfogluconat (Sigma) es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

<sup>2</sup> La solució de NADP (Sigma) es preparava just abans de cada assaig i es cobria el recipient que la contenia amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

### 3.9.2.7. Determinació de l'activitat alanina aminotransferasa

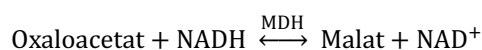
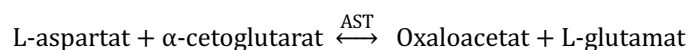
L'alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2) catalitza la transaminació de L-alanina a α-cetoglutarat per a formar piruvat i L-glutamat. Per tal de mesurar l'activitat ALT es va acoblar una segona reacció catalitzada per la lactat deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27), en la qual el piruvat es redueix a lactat amb la concomitant oxidació de NADH a NAD<sup>+</sup>.



L'activitat es va mesurar mitjançant els reactius i el protocol del kit comercial ALT-GPT BR (Linear Chemicals).

### 3.9.2.8. Determinació de l'activitat aspartat aminotransferasa

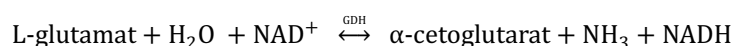
L'aspartat aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1) catalitza la transaminació de la L-aspartat a  $\alpha$ -cetoglutarat per formar oxaloacetat i L-glutamat. Per a mesurar l'activitat AST es va acoblar una segona reacció catalitzada per la malat deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), en la qual l'oxaloacetat es redueix a malat amb la concomitant oxidació de NADH a NAD<sup>+</sup>.



L'activitat es va mesurar mitjançant els reactius i el protocol del kit comercial AST-GOT BR (Linear Chemicals).

### 3.9.2.9. Determinació de l'activitat glutamat deshidrogenasa

La glutamat deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2) catalitza la desaminació del L-glutamat a  $\alpha$ -cetoglutarat, i viceversa, l'aminació de l' $\alpha$ -cetoglutarat a L-glutamat. En funció de la direcció de la reacció, l'enzim oxida o redueix els cofactors NADH i NAD<sup>+</sup>, respectivament.



El protocol emprat per a la determinació de l'activitat GDH en la direcció d'aminació de l' $\alpha$ -cetoglutarat es basa en el mètode descrit per Hochachka et al. (1978). La mescla de reacció va ser la següent:

	Reactiu	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R1	Imidazole-HCl, pH 7.0 <sup>1</sup>	500 mM	25	50 mM
	Acetat d'amoni <sup>1</sup>	2.5 M		250 mM
	α-cetoglutarat <sup>2</sup>	250 mM	5	5 mM
	NADH <sup>2</sup>	10 mM	2.5	0.1 mM
	ADP <sup>1</sup>	30 mM	8.3	1 mM
	H <sub>2</sub> O destil·lada		186.2	
	Extracte de fetge		23	
		Total	250	

<sup>1</sup> L'Imidazol-HCl (Sigma) i l'acetat d'amoni (Sigma) es van preparar en un sola solució. Juntament amb l'ADP (Sigma), aquests reactius es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

<sup>2</sup> Les solucions d'α-cetoglutarat (Sigma) i de NADH (Sigma) es preparaven just abans de cada assaig. En el cas de la solució de NADH, es cobria el recipient que la contenia amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

El protocol emprat per a la determinació de l'activitat GDH en la direcció de desaminació del L-glutamat va ser adaptat a partir del mètode descrit per Bernt i Bergmeyer (1974). La mescla de reacció va ser la següent:

	Reactiu	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
R1	Tris-HCl, pH 9,0 <sup>1</sup>	175 mM	176	154 mM
	L-glutamato <sup>1</sup>	22.7 mM		20 mM
	Hidrazina <sup>1</sup>	113.6 mM		100 mM
	ADP <sup>1</sup>	20 mM	10	1 mM
	NAD <sup>2</sup>	20 mM	10	1 mM
	Extracte de fetge		4	
		Total	200	

<sup>1</sup> El Tris-HCl, el L-glutamat (Sigma) i la hidrazina (Sigma) es van preparar en un sola solució. Juntament amb l'ADP (Sigma), aquests reactius es guardaven en alíquotes a -20°C fins anàlisi.

<sup>2</sup> La solució de NAD<sup>+</sup> (Sigma) es preparava abans de cada assaig i es cobria el recipient que la contenia amb paper d'alumini per retardar-ne la degradació.

### 3.10. EXPRESSIÓ GÈNICA DELS ENZIMS PER RT-QPCR

La tècnica qRT-PCR ens permet monitoritzar l'amplificació de l'ADN mitjançant un marcador fluorescent que s'uneix a les dobles cadenes formades durant la PCR (Lee, 2004; Livac i Schmittgen 2001). Aquesta tècnica va permetre la quantificació de l'ARN missatger (ARNm) dels diferents gens codificants dels enzims indicats prèviament (Apartat 3.9).

Constava de tres etapes:

1. L'aïllament de l'ARNm contingut en les mostres de fetge.
2. La transcripció inversa de l'ARN missatger a ADN complementari (ADNc).
3. La PCR quantitativa: amplificació de l'ADNc i quantificació del producte de la PCR.

#### 3.10.1. Aïllament de l'ARN missatger (ARNm)

Per a l'extracció i purificació de l'ARNm total de les mostres de fetge es va fer servir el kit comercial Speedtools Total RNA Extraction Kit (Biotools). Mentre se'n feia ús, l'extracte final d'ARN es mantenia en tot moment en gel. De no ser així, s'emmagatzemava a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La quantitat d'ARN es va determinar llegint l'absorbància de l'extracte a 260 nm mitjançant un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Una lectura d'absorbància de 1.0 a aquesta longitud d'ona equivalia a uns 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'ARN. D'altra banda, la relació d'absorbàncies 260/280 va servir per a avaluar una possible contaminació per proteïnes (Glasel, 1995). La puresa de la mostra es va considerar òptima amb valors 260/280 entre 1.8 i 2.

#### 3.10.2. Transcripció inversa

Les cadenes simples d'ADN complementari (ADNc) per a la PCR quantitativa (qPCR) van ser sintetitzades mitjançant la transcriptasa inversa (RT) utilitzant l'ARNm com a motlle. Per a la reacció de retrotranscripció, s'incubaren 2  $\mu\text{g}$  d'ARNm motlle amb MMLV-RT (*Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase*) (Promega), juntament amb desoxiribonucleòtids (dNTPs) (Promega) i hexàmers aleatoris (Invitrogen), a  $37^{\circ}\text{C}$  durant 60 minuts. Per prevenir la degradació de l'ARN, a la mescla de reacció es va incloure un inhibidor d'ARNases (RNasin, Promega).

Els volums i concentracions dels diferents reactius emprats en la transcripció inversa van ser els següents:

Reactiu	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
Mostra d'ARNm	182 ng/µL	11	100 ng/µL
First-Strand buffer <sup>1</sup>	5 X	4	1 X
dNTPs	10 mM	1	0.5 mM
Hexàmers aleatoris	62.5 ng/µL	2.5	7.8 ng/µL
RNAsin	80 U/µL	0.5	2 U/µL
MMLV-RT	200 U/µL	1	10 U/µL
Total		20	

<sup>1</sup> First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), Invitrogen.

### 3.10.3. PCR quantitativa (qPCR)

Per tal d'avaluar les variacions en l'expressió gènica dels diferents enzims seleccionats (Taula 5), es va amplificar l'ADNc amb oligonucleòtids específics de cada gen en presència d'un marcador fluorescent.

Taula 5. Llistat de oligonucleòtids emprats per a analitzar l'expressió gènica per qPCR dels enzims seleccionats.

Gen	Número accés GenBank		Seqüència (5' a 3')
18s	AM490061	Sentit	TTACGCCCATGTTGCTCCTGAG
		Antisentit	AGGATTCTGCATGATGGTCACC
GK	AF169368	Sentit	TGTGTCAGCTCTCAACTCGACC
		Antisentit	AGGATCTGCTCTACCATGTGGAT
PFK-1	KF857580	Sentit	TGCTGGGGACAAAACGAACTCTTCC
		Antisentit	AAACCCTCCGACTACAAGCAGAGCT
PK	KF857579	Sentit	CAAAGTGAAAGCCGGCAAGGG
		Antisentit	GTCGCCCTGGCAACCATAAC
FBPasa	AF427867 <sup>1</sup>	Sentit	CAGATGGTGAGCCGTGTGAGAAGGATG
		Antisentit	GCCGTACAGAGCGTAACCAGCTGCC
G6PD	JX073711	Sentit	TGATGATCCAACAGTTCCTA
		Antisentit	GCTCGTTCCTGACACACTGA
ACC1	JX073712	Sentit	CCCAACTTCTTCTACCACAG
		Antisentit	GAACTGGAACCTACTACAC
cALT1 <sup>2</sup>	AY206502	Sentit	GCGAGCCTAGTGAGCAACTGATATC
		Antisentit	CCGCTCGCTGGACTACGGGACCACGA
cAST <sup>3</sup>	KM014670	Sentit	TGGAAGGGTAACGTGAAGACC
		Antisentit	GGTCCCCGGGGTGCCAGACC
GDH	JX073708	Sentit	GGTATCCACGGTCGTATCTCAGCC
		Antisentit	GAGACCCACATTACCAAAGCCCTG

cALT1, ALT citosòlica isoforma 1; cAST, AST citosòlica.

<sup>1</sup> Extret de Panserat et al. (2002).

El marcador fluorescent, en aquest cas SYBR Green (Applied Biosystems), s'uneix a les cadenes dobles d'ADN (també a les simples, però amb menor rendiment). El complex resultant absorbeix llum a 497 nm i n'emet a 520 nm. Per tant, el senyal a 520 nm incrementa de manera proporcional a la quantitat de producte final de la PCR.

Els volums i concentracions dels diferents reactius emprats en la qPCR van ser:

Reactiu	Concentració inicial	Volum (µL)	Concentració final
Mostra d'ADNc <sup>1</sup>		3.2	
Oligonucleòtid sentit	10 µM	1.6	0.4 µM
Oligonucleòtid antisentit	11 µM	1.6	0.4 µM
Power SYBR Green Master Mix <sup>2</sup>	x2	20	x1
Aigua lliure d'ADNases		13.6	
Total		40	

<sup>1</sup> Mostra d'ADNc diluïda 10 vegades amb aigua lliure d'ADNases.

<sup>2</sup> El reactiu Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) és una dissolució tamponada que conté tant el marcador SYBR Green com l'ADN polimerasa, els dNTPs, la referència passiva (6-carboxi-X-rodamina) i el tamponant.

L'ADNc de cada mostra va ser amplificat per duplicat, dipositant 18 µL de cada mescla en dos tubs òptics diferents. Per a realitzar les diferents qPCRs es va utilitzar un aparell StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), i es varen fixar les següents condicions:

1. 50°C durant 2 minuts
2. 95°C durant 10 segons
3. 95°C durant 15 segons
4. 62°C durant 1 minut
5. 40 cicles (pas 3 a 4)

Al llarg dels diferents cicles de la PCR se seguia l'evolució de la fluorescència de la mostra, d'aquí que la tècnica sigui també coneguda com a PCR en temps real. La variable que ens indica el nivell d'ADNc original a la mostra és el cicle llindar o Ct (*cycle threshold*). Es tracta del cicle en el qual el senyal de fluorescència supera un cert valor arbitrari. Així doncs, a major quantitat de cDNA de partida, abans se supera aquest llindar i, per tant, menor és el valor Ct. La fluorescència al Ct es va normalitzar respecte la fluorescència d'una referència passiva (6-



carboxi-X-rodamina). D'aquesta manera es corregien possibles fluctuacions en la fluorescència deguts a canvis en la concentració i el volum de les reaccions.

L'expressió del gen es va realitzar segons el mètode  $\Delta\Delta Ct$ . En aquest mètode, l'expressió del gen diana es normalitza amb l'expressió d'un gen control (en anglès, *housekeeping gene*), en aquest cas el gen ribosòmic 18S. Un cop normalitzat, l'expressió del gen diana a cada mostra es compara amb l'expressió a una mostra de referència. Finalment, assumint que a cada cicle es dobla la quantitat d'ADN, l'expressió relativa de cada gen es calcula segons la fórmula:

$$2^{\Delta\Delta Ct} = \frac{2^{\Delta Ct(\text{mostra})}}{2^{\Delta Ct(\text{mostra de referència})}}$$

on

$$\Delta Ct(\text{mostra}) = Ct(\text{gen diana}) - Ct(18s)$$

### 3.11. ANÀLISI DE LA DIGESTIBILITAT I LA INGESTA DE NUTRIENTS DIGERIBLES

La digestibilitat de la dieta i de diferents nutrients de la dieta es va determinar mitjançant la inclusió d'un traçador inert a la dieta. El marcador escollit va ser l'òxid d'itri ( $Y_2O_3$ ), del qual s'inclouïa una proporció en dieta del 0.1%. Com que no és assimilable per l'aparell digestiu, durant la digestió l'òxid d'itri es concentra al contingut intestinal. Contràriament, la quantitat de nutrients assimilables es redueix durant la digestió. Conèixer la concentració d'itri a la dieta i a les mostres de femtes ens va permetre calcular el coeficient de digestibilitat aparent (CDA) de la dieta:

$$\text{CDA matèria seca (\%)} = \left( 1 - \frac{Y_2O_3 \text{ a la dieta}}{Y_2O_3 \text{ a les femtes}} \right) \times 100$$

D'altra banda, amb la concentració dels diferents nutrients d'interès a la dieta i a les femtes vam ser capaços d'estimar també els seus CDAs.

$$\text{CDA (\%)} = \left( 1 - \frac{Y_2O_3 \text{ a la dieta}}{Y_2O_3 \text{ a les femtes}} \times \frac{\text{proporció del nutrient a les femtes}}{\text{proporció del nutrient a la dieta}} \right) \times 100$$

Els nutrients seleccionats per a l'anàlisi van ser proteïna, carboni i fòsfor. L'escassa quantitat de femtes recollides va impedir quantificar el seu contingut en greixos. En el cas de les proteïnes i el carboni, les concentracions van ser assajades amb la mateixa tècnica i seguint el protocol descrit en l'Apartat 3.6.2.

Per a la determinació de la concentració de fòsfor i itri a les mostres de pinso i femtes:

1. Es pesaven 20-25 mg de mostra en un reactor de tefló.
2. S'afegien 2 i 3 mL d' $HNO_3$  70% als reactors amb les mostres de femtes i dieta, respectivament.
3. Es digerien les mostres durant 24 hores a 90°C.
4. Un cop refredat el reactor, es recollia l'hidrolitzat en un tub i s'esbandia l'interior del reactor amb 20 o 30 mL d'aigua MilliQ, depenent de si la mostra era de femtes o de pinso. El volum d'aigua esbandit es recollia també en el tub amb l'hidrolitzat.
5. Es determinava gravimètricament la densitat d'aquests hidrolitzats per a poder calcular acuradament el seu volum a partir del pes.

Les concentracions d'itri i fòsfor en els extractes finals foren analitzats amb espectroscopia de plasma d'inducció acoblat (ICP-OES) per l'equip de la Unitat d'Anàlisi de Metalls del CCiT UB.

Posteriorment, els CDAs es van fer servir per a estimar la quantitat de pinso i nutrients ingerits que finalment van ser assimilats per les orades. Aquests nous valors d'ingesta se'ls va denominar com a ingesta digerible, i es van calcular de la següent manera:

$$\text{Ingesta digerible}_{\text{nutrient}} \text{ (g/Kg dia)} = \frac{\text{Ingesta}_{\text{nutrient}} \text{ (g/Kg dia)} \times \text{CDA}_{\text{nutrient}}}{100}$$

Lògicament, en restar la ingesta bruta i la ingesta digerible es va obtenir una estimació de les pèrdues de cada nutrient a través de les femtes. Així doncs:

$$\text{Pèrdues fecals}_{\text{nutrient}} \text{ (g/Kg dia)} = \text{Ingesta}_{\text{nutrient}} \text{ (g/Kg dia)} - \text{Ingesta digerible}_{\text{nutrient}}$$

### 3.12. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Les dades varen ser analitzades estadísticament amb el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). El nivell de significació escollit per a les diferents anàlisis era  $P < 0.05$ .

Les diferències estadístiques entre dietes s'analitzaren mitjançant l'ANOVA d'una via. En cas que l'ANOVA indiqués diferències significatives entre dietes, aquestes s'identificaven amb el test *post-hoc* de Tukey.

Per a analitzar la dependència del valor d'una variable en funció del nivell d'una altra, s'ajustaren els valors d'ambdues variables per mínims quadrats al millor model predictiu possible. El millor model predictiu va ser escollit a través d'un test F, el qual contrastà la bondat d'ajust de dos models, un d'ells més simple que l'altre (menor nombre de paràmetres). Si el model més complicat no mostrava un ajust significativament millor, s'optava pel model més simple. En cas que el model escollit fos el lineal, es contrastava si la pendent era significativament distinta de 0 mitjançant un altre test F. Paral·lelament, es va avaluar la possible interacció d'un o més factors sobre la variable independent mitjançant l'anàlisi de la covariància (ANCOVA).

D'altra banda, també es dissenyaren experiments factorials per a estudiar els efectes de dos ingredients diferents. En aquests experiments els resultats varen ser analitzats amb ANOVA de dues vies. D'aquesta manera s'obtenia informació sobre els efectes individuals i combinats dels dos ingredients. Seguint les recomanacions de Wei et al. (2012), en cas d'interacció entre els efectes dels dos ingredients, les diferències entre les diferents dietes s'analitzava amb el test *post-hoc* de Tukey.



## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---



## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

### **4.1. EFECTES NUTRICIONALS DE LA SUPLEMENTACIÓ DE GLUTAMINA I GLUTAMAT EN DIETES A BASE DE FARINA DE PEIX**

#### **4.1.1. Disseny de l'experiment**

L'objectiu del present experiment era estudiar l'efecte de la suplementació amb glutamat o glutamina en el creixement i el paper que desenvolupen en l'expressió dels enzims clau en el metabolisme hepàtic de juvenils d'orada. Aquest coneixement podria resultar d'ajuda per tal d'avaluar el potencial d'ambdós aminoàcids com a promotors d'un ús més eficient de la proteïna de la dieta.

Per tal d'estudiar-ne els efectes nutricionals, es dissenyaren quatre dietes d'identica formulació, a excepció d'un 4% emprat per a complementar amb més midó (dieta CHO), glutamat (dieta GLU), glutamina (dieta GLN) o més proteïna (albúmina de sèrum boví, dieta BSA) (Taula 6). Totes quatre dietes eren isoenergètiques i, alhora, les dietes GLU, GLN i BSA eren isonitrogenades. Les dietes CHO i BSA van ser dissenyades com a controls per avaluar l'efecte de substituir proteïnes i carbohidrats per glutamat o glutamina. Les diferències en la composició d'aminoàcids a les dietes foren insignificants (Taula 7), a excepció de les dietes GLU i GLN, que presentaren majors nivells de Glx (suma de les concentracions de glutamat i glutamina).

En arribar al laboratori, els juvenils d'orada de  $3.7 \pm 0.5$  g varen ser distribuïts en 12 aquaris. Un cop aclimatats a les noves condicions d'estabulació, foren assignades cadascuna de les dietes experimentals a tres aquaris aleatoris. Durant els següents 52 dies els peixos varen ser alimentats diàriament amb una ració d'un 4% respecte el pes de l'animal. Per al seguiment del pes, el sacrifici i la presa de mostres s'empraren els protocols descrits a Materials i Mètodes (Apartat 3.4 i 3.5).



Taula 6. Formulació i composició de les quatre dietes experimentals.

	CHO	GLU	GLN	BSA
<i>Formulació (%)</i>				
Farina de peix <sup>1</sup>	70	70	70	70
Oli de peix <sup>2</sup>	12.7	12.7	12.7	12.7
Midó <sup>3</sup>	14.2	10.2	10.2	10.2
L-Glutamat <sup>4</sup>	-	4	-	-
L-Glutamina <sup>4</sup>	-	-	4	-
Albúmina <sup>4</sup>	-	-	-	4
Carragenina <sup>4</sup>	2	2	2	2
Mescla mineral <sup>5</sup>	0.9	0.9	0.9	0.9
Mescla de vitamines <sup>6</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2
<i>Anàlisi química (% pes sec)</i>				
Proteïna crua	51.9	55.6	56.1	55.9
Carbohidrats <sup>7</sup>	18.3	14.0	13.6	14.1
Greix	18.4	18.8	18.9	18.9
Cendres	11.3	11.6	11.4	11.1
Energia bruta <sup>8</sup>	22.8	23.0	23.1	23.2

<sup>1</sup> Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile).

<sup>2</sup> A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

<sup>3</sup> Midó pregelatinitzat de blat de moro adquirit a Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

<sup>4</sup> L-glutamat, L-glutamina, albúmina de sèrum boví i iota carragenina adquirits a Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

<sup>5</sup> Mescla mineral (mg/Kg): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60; ZnO, 30; MnO<sub>2</sub>, 15; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.7; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.5; KI, 1.5; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.3.

<sup>6</sup> Mescla de vitamines (mg/Kg): clorur de colina, 1200; mio-inositol, 400; àcid ascòrbic, 200; àcid nicotínic, 70; acetat d'alfa-tocoferol, 60; pantotenat de calci, 30; riboflavina, 15; piridoxin, 10; àcid fòlic, 10; menadion, 10; tiamina-HCl, 8; tot-trans retinol, 2; biotina, 0.7; colecalfiferol, 0.05; cianocobalamina, 0.05.

<sup>7</sup> Els carbohidrats foren calculats per diferència (100 - % proteïna crua - % greix - % cendres).

<sup>8</sup> Calculat a partir de la composició (proteïna: 24 kJ/g; greix: 39 kJ/g; carbohidrats 17kJ/g).

Taula 7. Composició en aminoàcids (g/ 100g de proteïna) de les dietes experimentals.

	<b>CHO</b>	<b>GLU</b>	<b>GLN</b>	<b>BSA</b>
ARG	6.2	5.4	5.4	5.8
HIS	3.8	3.2	3.2	3.4
LYS	7.8	6.6	6.6	7.3
THR	4.3	3.7	3.7	4.0
ILE	4.0	3.3	3.3	3.4
LEU	7.2	6.1	6.1	6.8
VAL	4.9	4.1	4.0	4.4
MET	2.9	2.4	2.5	2.5
PHE	3.7	3.0	3.3	3.6
Cys	0.4	0.4	0.4	0.6
Tyr	3.1	2.5	2.6	2.9
Asx <sup>1</sup>	8.9	7.5	7.7	8.2
Glx <sup>2</sup>	12.7	17.8	18.0	11.9
Ala	5.8	4.8	5.0	5.2
Gly	5.8	4.9	4.9	4.9
Ser	3.8	3.2	3.3	3.5
Pro	3.6	3.0	3.1	3.2

Els aminoàcids essencials s'indiquen en majúscules, els no essencials en minúscules.

<sup>1</sup> Asx representa la suma de concentracions d'Asn i Asp, atès que l'Asn és transformat a Asp durant la hidròlisi.

<sup>2</sup> Glx representa la suma de concentracions de Gln i Glu, atès que la Gln és transformada a Glu durant la hidròlisi.

#### 4.1.2. Resultats

##### Creixement i eficiència alimentària

Els juvenils d'orada alimentats amb les dietes GLU o GLN mostraren una millor FCR (*Feed Conversion Ratio*) que els alimentats amb les dietes CHO (Taula 8). Els que foren alimentats amb la dieta GLU, a més a més, presentaren una major retenció de proteïnes que els alimentats amb les dietes CHO i BSA. La dieta GLU va millorar significativament la retenció de greix comparada amb les dietes GLN i BSA. A banda, l'alimentació amb la dieta GLU va donar com a resultat un IHS (índex hepatosomàtic) més elevat. No obstant, no es van observar diferències significatives en la taxa de creixement específic (SGR), el pes final, la ingesta diària i supervivència (dades no mostrades) de les orades després de 52 dies d'alimentació amb les diferents dietes.

Taula 8. Rendiment del creixement, retenció de nutrients i composició corporal de les orades alimentades amb les quatre dietes experimentals.

	CHO	GLU	GLN	BSA	<i>p</i> <sup>1</sup>
Pes inicial (g)	6.34 ± 0.10	6.30 ± 0.13	6.40 ± 0.17	6.46 ± 0.08	0.8107
Pes final (g)	14.25 ± 0.22	15.48 ± 0.37	15.05 ± 0.24	14.64 ± 0.33	0.083
SGR (%/dia)	1.57 ± 0.04	1.74 ± 0.08	1.66 ± 0.02	1.59 ± 0.03	0.1023
Ingesta (g/peix dia)	13.86 ± 0.43	12.45 ± 0.56	13.35 ± 0.46	13.10 ± 0.42	0.273
Ingesta (g/Kg dia)	28.44 ± 0.55 <sup>a</sup>	24.87 ± 1.24 <sup>b</sup>	26.62 ± 0.18 <sup>ab</sup>	26.48 ± 0.12 <sup>ab</sup>	0.0391
FCR	1.91 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.013
Retenció proteica (%)	17.07 ± 0.46 <sup>b</sup>	22.65 ± 1.23 <sup>a</sup>	21.25 ± 0.53 <sup>a</sup>	19.58 ± 0.98 <sup>ab</sup>	0.009
Retenció greix (%)	30.81 ± 4.74 <sup>ab</sup>	42.72 ± 1.12 <sup>a</sup>	25.47 ± 1.91 <sup>b</sup>	25.29 ± 4.08 <sup>b</sup>	0.0207
IHS	1.12 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.03 <sup>b</sup>	<0.001
<i>Composició corporal (% pes en fresc. PF; % pes sec. PS)</i>					
Humitat (% PF)	68.63 ± 1.07	68.36 ± 0.62	70.24 ± 0.17	69.45 ± 0.31	0.235
Proteïna crua (% PS)	52.64 ± 0.62 <sup>c</sup>	55.08 ± 0.66 <sup>bc</sup>	59.80 ± 0.55 <sup>a</sup>	57.50 ± 0.37 <sup>ab</sup>	<0.001
Greix cru (% PS)	29.99 ± 1.40 <sup>ab</sup>	33.00 ± 0.65 <sup>a</sup>	26.44 ± 0.97 <sup>b</sup>	26.97 ± 1.44 <sup>b</sup>	0.014
Cendres (% PS)	11.88 ± 0.25	11.51 ± 0.03	12.48 ± 0.51	12.27 ± 0.42	0.121

Els valors s'expressen com a la mitjana ± l'error estàndard de la mitjana de tres aquaris. Les diferents lletres en superíndex indiquen diferències entre mitjanes. SGR: *specific growth rate*, taxa de creixement específic; FCR: *feed conversion ratio*, taxa de conversió d'aliment; IHS: índex hepatosomàtic.

<sup>1</sup> P-valors corresponents a l'ANOVA.

Les orades alimentades amb la dieta GLN van presentar una major proporció de proteïna corporal que les alimentades amb les dietes GLU i CHO, però similar a la dels peixos alimentats amb la dieta BSA (Taula 8). Les orades alimentades amb la dieta GLU van exhibir un

contingut en greix més alt que les que foren alimentades amb les dietes GLN i BSA, tot i que no s'observaren diferències significatives en comparació amb els valors obtinguts en les orades alimentades amb la dieta CHO. No s'observaren diferències d'humitat i contingut en cendres entre grups d'orades alimentades amb dietes diferents.

#### *Metabòlits en sèrum i fetge*

La glicèmia en les orades alimentades amb la dieta GLN fou similar a la de les alimentades amb la dieta BSA, però significativament superiors que les obtingudes en alimentar amb les dietes CHO i GLU (Taula 9). El contingut de glucogen i triglicèrids en fetge va ser significativament superior en els peixos alimentats amb dietes CHO i GLU que en aquells alimentats tant amb les dietes GLN i BSA. El fetge de les orades alimentades amb les dietes CHO, GLU i GLN mostraren concentracions similars de glutamat i glutamina lliures, les quals, al seu torn, foren superiors a les observades a les orades alimentades amb la dieta BSA.

Taula 9. Concentracions de metabòlits en sèrum i fetge d'orades alimentades amb les quatre dietes experimentals.

	CHO	GLU	GLN	BSA	P <sup>1</sup>
<i>Sèrum</i>					
Glucosa (mg/dL)	72.49 ± 5.57 <sup>b</sup>	80.01 ± 5.38 <sup>b</sup>	101.9 ± 6.34 <sup>a</sup>	89.85 ± 6.07 <sup>ab</sup>	0.008
Triglicèrids (mg/dL)	842.2 ± 49.51 <sup>a</sup>	698.5 ± 49.93 <sup>ab</sup>	434.4 ± 30.75 <sup>c</sup>	572.4 ± 39.96 <sup>bc</sup>	<0.001
<i>Fetge</i>					
Glucogen (mg/g)	89.89 ± 3.04 <sup>a</sup>	102.3 ± 6.42 <sup>a</sup>	67.60 ± 4.16 <sup>b</sup>	68.65 ± 3.87 <sup>b</sup>	<0.001
Triglicèrids (mg/g)	5.24 ± 0.35 <sup>a</sup>	4.81 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.49 <sup>b</sup>	2.99 ± 0.30 <sup>b</sup>	<0.001
Glutamat (µmol/g)	7.89 ± 0.64 <sup>a</sup>	9.44 ± 0.91 <sup>a</sup>	9.79 ± 0.83 <sup>a</sup>	3.39 ± 0.16 <sup>b</sup>	<0.001
Glutamina (µmol/g)	4.49 ± 0.67 <sup>a</sup>	4.58 ± 0.47 <sup>a</sup>	5.05 ± 0.49 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.17 <sup>b</sup>	<0.001

El contingut de glucogen s'expressa com a mg de glucosa per g de fetge fresc. Els valors s'expressen com a la mitjana ± l'error estàndard de la mitjana de 8-10 peixos. Les diferents lletres en superíndex indiquen diferències entre mitjanes (p<0.05).

<sup>1</sup> P-valors corresponents a l'ANOVA.

### Activitats i expressions dels enzims del metabolisme intermediari

Pel que fa als enzims implicats en la glucòlisi, la major activitat enzimàtica i expressió a nivell d'ARN missatger (ARNm) per a la GK es trobaren a les orades alimentades amb les dietes GLU i CHO (Figura 12). L'activitat enzimàtica i l'abundància d'ARNm de la PFK-1 varen ser significativament inferiors al fetge dels peixos alimentats amb la dieta GLN. De manera similar, els nivells d'activitat i expressió gènica de la PK foren inferiors en els peixos alimentats amb GLN que en els alimentats amb les altres dietes. D'altra banda, les orades alimentades amb dieta GLU o GLN mostraren nivells d'ARNm de FBPasa més baixos que aquelles alimentades amb dieta BSA, però alhora similars als observats en orades alimentades amb la dieta CHO. Tot i no ser estadísticament significativa, la mateixa tendència fou observada en l'activitat FBPasa.

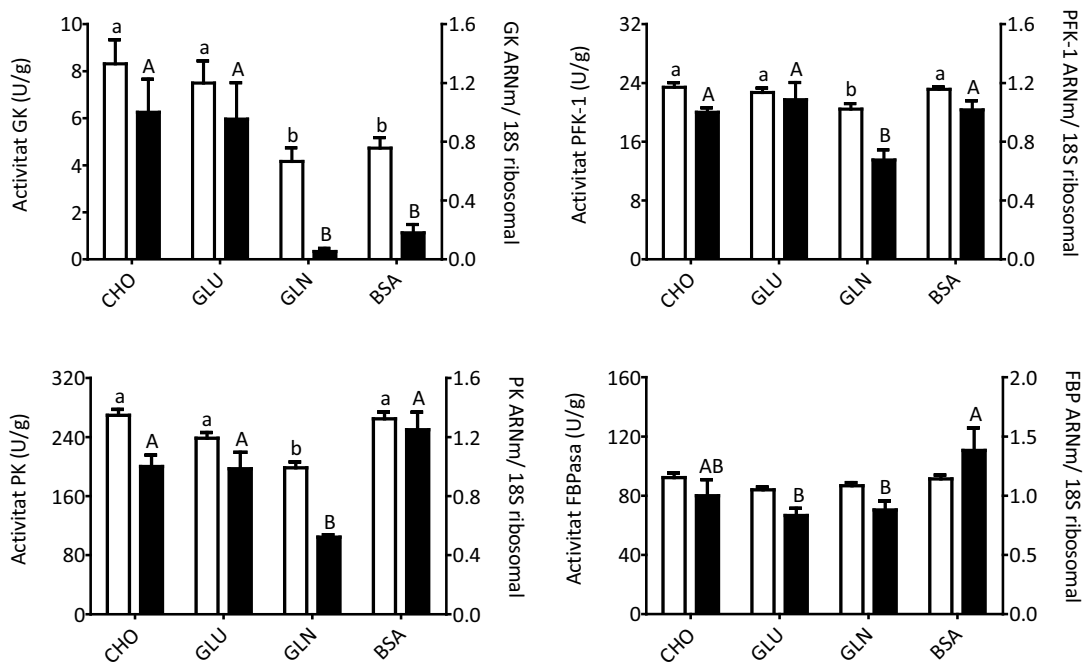


Figura 12. Efectes de les diferents dietes experimentals en l'activitat i els nivells d'ARNm de la GK, la PFK-1, la PK i la FBPasa en el fetge de les orades. Les columnes blanques i negres representen les mitjanes de l'activitat enzimàtica (n=12) i dels nivells d'ARNm (n=8), respectivament. Les barres d'error corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Diferents lletres en minúscula o majúscula indiquen diferències significatives (p<0.05) en activitat i nivells d'ARNm, respectivament.

La lipogènesi hepàtica va veure's afectada de manera significativa en funció de la composició de la dieta (Figura 13). Els juvenils d'orada alimentats amb les dietes GLN o BSA van mostrar activitats enzimàtiques i nivells d'ARNm de G6PD inferiors als d'aquells alimentats amb la dieta CHO. D'altra banda, l'activitat G6PD i els nivells d'ARNm observats en les orades alimentades amb la dieta GLU foren similars als obtinguts en alimentar amb la dieta CHO. En comparació amb els nivells d'ARNm observats als peixos alimentats amb les dietes CHO o BSA,

l'expressió gènica d'ACC1 va ser regulada a la baixa en alimentar amb la dieta GLN, i regulada a l'alça en alimentar amb la dieta GLU.

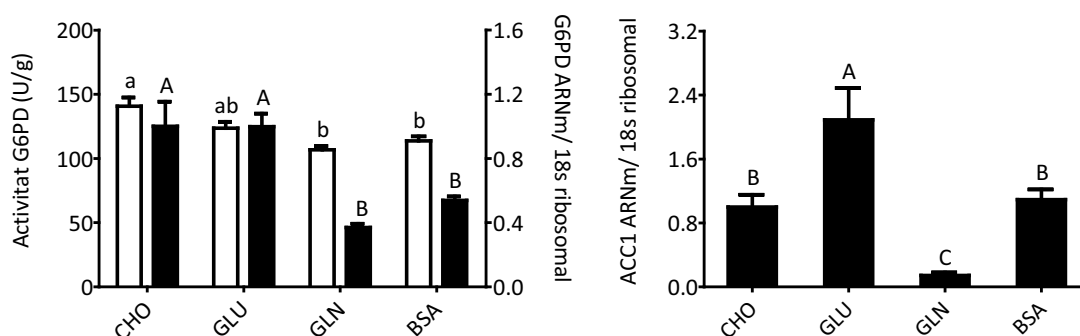


Figura 13. Efectes de les diferents dietes experimentals en l'activitat enzimàtica i els nivells d'ARNm de la G6PD i l'ACC1 en el fetge de les orades. Les columnes blanques i negres representen les mitjanes de l'activitat enzimàtica (n=12) i dels nivells d'ARNm (n=8), respectivament. Les barres d'error corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Diferents lletres en minúscula o majúscula indiquen diferències significatives (p<0.05) en activitat i nivells d'ARNm, respectivament.

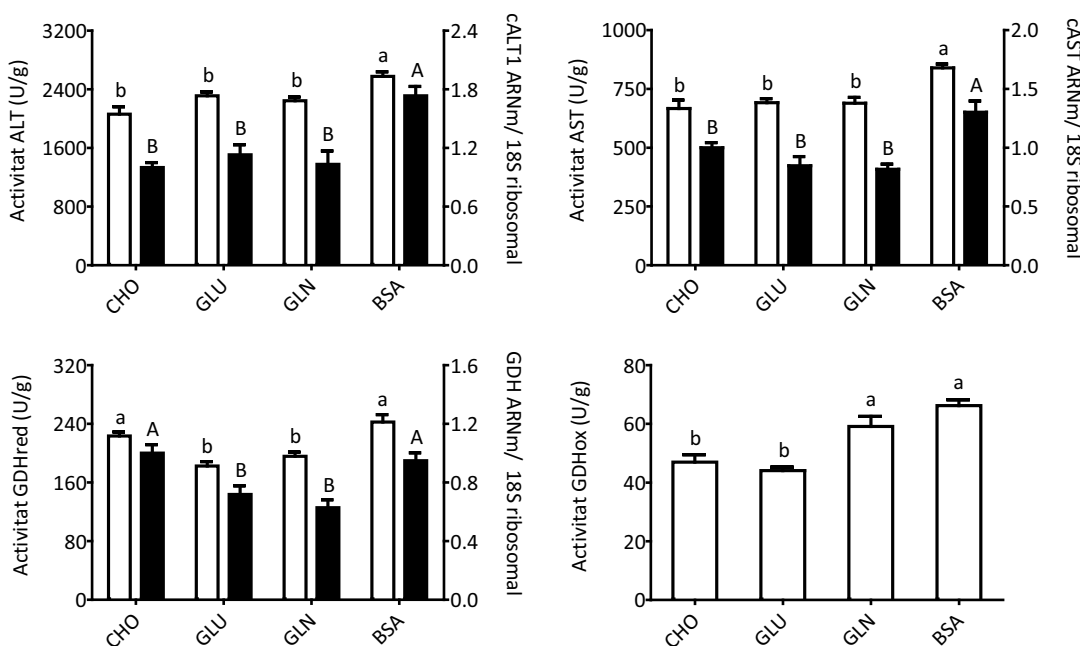


Figura 14. Efectes de les diferents dietes experimentals en l'activitat enzimàtica i els nivells d'ARNm de l'ALT, l'AST i la GDH en el fetge de les orades. Les columnes blanques i negres representen les mitjanes de l'activitat enzimàtica (n=12) i dels nivells d'ARNm (n=8), respectivament. Les barres d'error corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Diferents lletres en minúscula o majúscula indiquen diferències significatives (p<0.05) en activitat i nivells d'ARNm, respectivament.

L'activitat enzimàtica i els nivells d'ARNm de l'ALT i l'AST foren inferiors en els fetges de les orades alimentades amb les dietes CHO, GLU o GLN que en aquelles alimentades amb la dieta BSA (Figura 14). Els fetges de les orades alimentades amb les dietes GLU i GLN exhibiren

activitats GDH en la direcció de la formació del glutamat (GDHred) inferiors a les observades en alimentar amb dieta CHO o BSA. Els nivells més baixos d'ARNm de GDH correspongueren als fetges de les orades alimentades amb les dietes GLU o GLN. No obstant això, quan es determinà l'activitat GDH en la direcció d'oxidació del glutamat (GDHox), els peixos alimentats amb les dietes GLN o BSA mostraren valors d'activitat més elevats que aquells alimentats amb les dietes CHO o GLU.

#### 4.1.3. Discussió

Els juvenils d'orada alimentats amb les quatre dietes no presentaren diferències significatives ni en el pes final ni en la taxa de creixement específic (SGR). Aquests resultats són raonables tenint en compte la similitud entre dietes pel que fa al contingut energètic. Tot i les divergències entre dietes en el contingut de nitrogen i carbohidrats, s'ha demostrat amb anterioritat que les orades són capaces d'adaptar la seva maquinària enzimàtica en funció de la relació d'ambdós macronutrients, la qual cosa minimitzaria les diferències en la taxa de creixement (Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999). Una altra raó podria ser el règim d'alimentació al qual varen ser sotmesos els peixos i que podria haver-ne limitat el creixement. Les diferències en creixement es podrien haver accentuat si els peixos haguessin estat alimentats *ad libitum*, més encara si es considera que els aminoàcids lliures habitualment actuen com a estimulants de la ingesta en peixos (Li et al., 2009). No obstant això, les diferències en la ingesta haurien emmascarat els efectes específics del glutamat i la glutamina en el creixement i el metabolisme intermediari de l'orada, objectiu principal d'aquest estudi.

De tota manera, el pes final, SGR i ingesta no van ser idèntics en els quatre grups d'orades. Les diferències, minses i no significatives en creixement i ingesta, varen esdevenir significatives per a altres paràmetres del rendiment alimentari. En aquest sentit, quan es calcula com una funció del pes corporal del peix, la ingesta diària de les orades alimentades amb la dieta GLU resulta ser significativament inferior a la d'aquelles alimentades amb la dieta CHO. A més a més, la suplementació amb glutamat i glutamina va millorar la FCR dels juvenils d'orada en comparar amb l'obtinguda amb la dieta enriquida amb carbohidrats (dieta CHO). Són diversos els estudis que han demostrat que la suplementació amb glutamina i glutamat millora el creixement i l'eficiència alimentària en altres espècies de peixos (Cheng et al., 2012; Hughes, 1985; Oehme et al., 2010; Qiyu et al., 2011; Wang et al., 2011; Yan i Qiu-Zhou, 2006). Malgrat això, altres estudis publicats no sostindrien aquests efectes positius (Cheng et al., 2011; Figueiredo-Silva et al., 2010; Gómez-Requeni et al., 2003; Kirchner et al., 2003; Mambrini i Kaushik, 1994; Pohlenz et al., 2012). Aquestes discrepàncies entre estudis podrien tenir

explicació en diferències en el disseny dels experiments i de la formulació de les dietes. Així doncs, els pitjors rendiments alimentaris s'observaren quan, per tal de mantenir dietes isonitrogenades, la proteïna de la dieta era parcialment substituïda per glutamina o glutamat. Contràriament, s'observaren millores en el creixement en aquells experiments on el valor nutricional del glutamat i la glutamina eren contraposats als d'un altre NEAA, normalment la glicina.

En base als nostres resultats, la suplementació d'un 4% de glutamat o glutamina millorà la retenció proteica en juvenils d'orada en comparació amb una dieta control amb un 4% més de carbohidrats (dieta CHO). En el cas del glutamat, la retenció proteica s'incrementà per sobre de la dels peixos alimentats amb un 4% més de proteïna (dieta BSA). S'accepta de manera generalitzada que la retenció proteica en peixos disminueix en augmentar la proporció proteïna/carbohidrat de la dieta (Fernández et al., 2007; Sá et al., 2007), i també amb elevades proporcions d'aminoàcids no essencials/aminoàcids essencials (AANE/AAE) (Gómez-Requeni et al., 2003; Green et al., 2002; Peres i Oliva-Teles, 2005, 2006). No obstant, atès que els peixos han demostrat degradar preferentment els AANE, un augment moderat del contingut d'AANE a la dieta podria prevenir l'ús excessiu d'AAE com a substrats energètics (Abboudi et al., 2009; Conceição et al., 2002; Kim et al., 1992; Rønnestad et al., 2003). En aquest sentit, es va observar que la suplementació amb glutamat i glutamina millora l'absorció neta d'aminoàcids de cadena ramificada a l'intestí dels porcs (Burrin i Stoll, 2009), la qual cosa s'atribuï a una oxidació preferent de glutamat i glutamina pels enteròcits. En peixos, la suplementació en glutamina va augmentar l'absorció i utilització de nutrients a través de la millora de l'estructura i la funció intestinal (Cheng et al., 2011; Cheng et al., 2012; Pohlenz et al., 2012; Qiyou et al., 2011; Yan i Qiu-Zhou, 2006). En aquest experiment, la suplementació de glutamat i glutamina va derivar en canvis en el metabolisme intermediari de l'orada que podrien haver conduït a un millor ús de la proteïna de la dieta.

Els efectes de la suplementació amb glutamina i glutamat en el metabolisme hepàtic dels peixos no havien estat estudiats prèviament en un mateix experiment, probablement perquè tots dos aminoàcids intervenen en les mateixes vies metabòliques i comparteixen els mateixos rols (Newsholme et al., 2003). Els resultats aquí presentats mostren que el metabolisme de la glucosa i els lípids al fetge de les orades va modular-se de diferent forma segons l'aminoàcid suplementat, per molt que ambdues dietes continguessin la mateixa proporció de carbohidrats i greixos. Els peixos alimentats amb la dieta GLN exhibiren una regulació a la baixa de l'activitat i els nivells d'ARNm del conjunt d'enzims glucolítics estudiats.



Aquest efecte fou encara més pronunciat que l'observat en peixos alimentats amb la dieta BSA, on només l'activitat i l'expressió gènica de la GK van veure's reduïdes per la menor ingesta de carbohidrats. A més a més, la suplementació amb glutamina va resultar en els majors nivells de glucosa en sèrum, la qual cosa podria indicar una menor capacitat glucolítica. La fosforilació de la glucosa en glucosa 6-fosfat per la GK hepàtica és un pas clau per la síntesi del glucogen i la via de la pentosa fosfat. En aquesta línia, els fetges de les orades alimentades amb dieta GLN mostraren un menor contingut en glucogen, així com també una reducció del nivell d'ARNm i activitat G6PD en comparació amb les orades alimentades amb les dietes CHO o GLU. La fase oxidativa de la via de la pentosa fosfat és una de les fonts principals de NADPH per a la síntesi d'àcids grassos, així doncs, aquest ajust metabòlic podria coincidir amb els nivells més baixos d'expressió d'ACC1 observats en alimentar les orades amb la dieta GLN. Uns nivells baixos de triglicèrids en sèrum i en fetge, així com un baix contingut de greix corporal en els peixos alimentats amb la dieta GLN donarien suport a una regulació a la baixa de la lipogènesi. Contràriament, les orades alimentades amb la dieta GLU mostraren una expressió de la GK similar a la de les orades alimentades amb la dieta CHO, tot i haver ingerit una menor quantitat de carbohidrats. En concordança amb l'expressió de la GK, els fetges de les orades alimentades amb dieta GLU presentaren un alt contingut en glucogen i una regulació a l'alça de l'expressió de la G6PD. A més a més, la suplementació amb glutamat va promoure la síntesi i retenció de lípids tenint en compte l'augment dels nivells d'ARNm de la ACC1, l'elevada proporció de greix corporal i els alts nivells de triglicèrids en sèrum i fetge.

Fins on es té coneixement, aquest estudi presenta per primer cop un efecte significatiu de la suplementació amb glutamat en la via glucolítica dels peixos. En humans, ha estat provat que la suplementació amb glutamat podria millorar el metabolisme de la glucosa (Di Sebastiano et al., 2013). D'altra banda, anteriors estudis sobre l'efecte de la suplementació de glutamat a la lipogènesi hepàtica en peixos no han estat conclouents i els autors han suggerit que altres factors nutricionals relacionats amb la formulació de la dieta, com una elevada substitució de la proteïna de la dieta (Figueiredo-Silva et al., 2010) o la inclusió de fonts de proteïna vegetals (Gómez-Requeni et al., 2003), poden estar-hi involucrats. Pel que fa a la glutamina, de manera similar a com s'ha observat en orada en el present experiment, la seva suplementació reduí l'expressió de la PK hepàtica en garrins (Xiao et al., 2012).

El glutamat i la glutamina han estat proposats com a reguladors de la glucòlisis i la lipogènesi a través de la mediació de diferents vies de senyalització cel·lular (Meijer, 2003; Newsholme et al., 2003). La glutamina activa la via de senyalització mTOR (Durán i Hall, 2012;

Fumarola et al., 2005; Wu et al., 2013), la qual s'ha demostrat recentment que intercedeix en l'activació transcripcional de la GK i de l'àcid gras sintasa (FAS, EC .3.1.85) en truita irisada (Dai et al., 2013). En aquest estudi, els fetges dels peixos alimentats amb les dietes GLU i GLN presentaren concentracions similars de glutamina lliure. Malgrat això, les vies glucolítica i lipogènica foren promogudes només en les orades alimentades amb dieta GLU. Experiments *in vitro* amb hepatòcits de truita indiquen que la regulació a l'alça de la GK i la FAS a través de l'activació de la via mTOR depèn de la presència d'insulina (Lansard et al., 2010, 2011). Tot i que els nivells sèrics d'insulina no foren mesurats en el present estudi, l'augment de la glucòlisi, la glucogènesi i la lipogènesi en les orades alimentades amb la dieta GLU s'ajusta amb els efectes de la insulina descrits per a peixos (Caruso i Sheridan, 2010). No s'ha demostrat cap efecte del glutamat i la glutamina en els nivells sèrics d'insulina dels peixos, però altres aminoàcids com l'arginina, l'alanina i la metionina han mostrat una major activitat insulinoatròpica que la glucosa (Andoh, 2007). En mamífers, el glutamat i la glutamina potencien l'exocitosis d'insulina dependent del calci causada tant per la glucosa com per la leucina (Wiederkehr i Wollheim, 2012). D'altra banda, els efectes anàlegs a la insulina observats en els peixos alimentats amb la dieta GLU podrien derivar-se de l'augment del volum cel·lular a causa del glutamat, procés freqüentment associat a la promoció de la síntesi de glucogen i l'activitat ACC1 (Meijer, 2003). No obstant, els mecanismes moleculars que expliquen el rol del glutamat i la glutamina en el metabolisme de la glucosa no són encara clars (Wiederkehr i Wollheim, 2012). Tot i que calen més estudis, els resultats que aquí es presenten donen suport a la hipòtesi per la qual el glutamat participaria en la regulació del metabolisme de la glucosa en els peixos.

D'acord amb els resultats d'activitat i d'expressió gènica de la FBPasa, la gluconeogènesi al fetge de les orades no es va veure afectada per les diferències en el contingut de carbohidrats a la dieta. Aquests resultats concorden amb estudis previs en peixos, els quals mostraren una activitat gluconeogènica pobrament inhibida pels carbohidrats de la dieta (Caseras et al., 2002; Enes et al., 2009; Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999; Polakof et al., 2012). Al present estudi, l'expressió FBPasa al fetge dels juvenils d'orada no es va veure afectada per la suplementació amb glutamat i glutamina, malgrat que ambdós aminoàcids són substrats importants per a la gluconeogènesi hepàtica (Newsholme et al., 2003). Tot i així, d'acord amb l'expressió dels enzims que controlen el cicle de la fructosa 6-fosfat/fructosa 1,6-bifosfat, la PFK-1 i la FBPasa, la glucòlisi seria promoguda a les orades alimentades amb la dieta GLU i inhibida a les alimentades amb la dieta GLN. Els estudis anteriors sobre els efectes de la suplementació amb glutamat en la gluconeogènesi dels peixos no havien donat resultats

concloents. Kirchner et al. (2003) i Gómez-Requeni et al. (2003) no trobaren efectes de la suplementació de glutamat sobre l'activitat i l'expressió gènica de la FBPasa i la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa, EC 3.1.3.9) en truita irisada i orada. No obstant això, Kirchner et al. (2003) reportaren una reducció significativa de l'activitat fosfoenolpiruvat carboxiquinasa mitocondrial (PEPCK, EC 4.1.1.32). Contràriament, Figueiredo-Silva et al. (2010) trobaren que l'activitat PEPCK és regulada a l'alça en *Pagellus bogaraveo* alimentats amb una dieta suplementada amb glutamat i aspartat.

Segons els resultats del present estudi, el metabolisme dels aminoàcids és afectat de diferent manera segons la naturalesa del compost nitrogenat suplementat. Els nivells de l'expressió en fetge de l'ALT i l'AST indiquen que la inclusió de glutamat i glutamina no promou la transaminació en comparació amb la suplementació d'una proteïna purificada (dieta BSA). Anteriors estudis sobre la suplementació d'AANE en dietes per a peixos no mostraren cap efecte en l'activitat hepàtica d'ALT i AST (Figueiredo-Silva et al., 2010; Gómez-Requeni et al., 2003; Peres i Oliva-Teles, 2006). Aparentment, gran part del glutamat i la glutamina de la dieta és primerament metabolitzada a l'intestí dels peixos (Ando, 1988), com en el cas dels mamífers (Burrin i Stoll, 2009). Al nostre estudi, la suplementació amb glutamat i glutamina va regular a la baixa l'activitat GDHred (aminació d' $\alpha$ -cetoglutarat en glutamat) i els nivells d'ARNm de la GDH, la qual cosa suggereix que la demanda hepàtica de glutamat fou satisfeta en major mesura per la ingesta de la dieta que per la síntesi *de novo*, contràriament al que sembla succeir en els peixos alimentats amb les dietes CHO o BSA. D'altra banda, segons els valors de l'activitat GDHox (desaminació de glutamat en  $\alpha$ -cetoglutarat), la taxa d'oxidació de glutamat sembla haver estat superior en els peixos alimentats amb les dietes GLN o BSA que en els alimentats amb les dietes CHO o GLU. Així doncs, les activitats GDHred i GDHox es van veure diferentment afectades per la composició de la dieta. En aquest sentit, la relació entre les activitats GDHred/GDHox al fetge dels peixos pot canviar al llarg d'un període postprandial de 24 hores (Tng et al., 2008), així com en resposta a l'exposició a l'aire (Jow et al., 1999) i a nivells elevats d'amoni en el medi (Peng et al., 1998). Cal destacar, però, el fet que les orades alimentades amb les dietes GLU i GLN mostraren diferents activitats GDHox, tot i que tots dos aminoàcids són, en principi, fàcilment catabolitzats per aquest enzim. No obstant, la inclusió de glutamat a la dieta ja havia mostrat reduir l'activitat GDHox al fetge de *Pagellus bogaraveo* (Figueiredo-Silva et al. 2010), un altre representant de la família dels espàrids, com l'orada.

Les tendències en l'activitat GDHox entre els diferents grups d'orades és coherent amb la tendència inversa observada en l'activitat GK. En suma, les orades alimentades amb les

dietes GLN o BSA evidencien una major demanda de glutamat com a recurs energètic, mentre que la promoció de la glucòlisi en alimentar les orades amb les dietes CHO i GLU probablement reduï aquesta demanda. Una major activitat GDHox als peixos alimentats amb la dieta GLN no sembla haver estat suficient per a reduir la concentració hepàtica de glutamat i glutamina lliure, com sí succeeix en els peixos alimentats amb la dieta BSA. La ingesta de glutamina hauria excedit els requeriments d'energia del fetge, la qual cosa podria haver estalviat l'oxidació d'altres aminoàcids, i milloraria així la retenció proteica del peix.

Per concloure, la suplementació de la dieta amb glutamat i glutamina millorà l'ús de la proteïna ingerida per juvenils d'orada a través de diferents ajustos metabòlics. Mentre que en les orades alimentades amb un suplement de glutamina, el fetge catabolitzaria preferentment l'excés de glutamina enlloc d'altres aminoàcids procedents de la dieta, la suplementació amb glutamat va incrementar la retenció de proteïna a través de la millora de la resposta metabòlica a la ingesta de carbohidrats. Futurs experiments ajudaran a aclarir el paper del glutamat en l'estimulació de la glucòlisi aquí observada, i a avaluar si aquest efecte pot facilitar la substitució de proteïnes per carbohidrats en dietes per a peixos sense comprometre'n el creixement ni l'eficiència alimentària.

## 4.2. INCLUSIÓ DE TAURINA EN DIETA A BASE DE PROTEÏNA D'ORIGEN VEGETAL

Per tal d'estudiar els possibles beneficis de la taurina en la nutrició d'orades alimentades majoritàriament o exclusivament amb proteïna vegetal, es varen realitzar tres experiments consecutius:

- Experiment 1: efectes de la inclusió de diferents nivells de taurina en dieta amb un 90% de proteïna vegetal.
- Experiment 2: efectes de la inclusió de taurina en dietes amb un 90 o un 100% de proteïna vegetal.
- Experiment 3: efectes de la inclusió de taurina en combinació amb un hidrolitzat de proteïna de soja.

### 4.2.1. Experiment 1: efectes de la inclusió de diferents nivells de taurina en dieta amb un 90% de proteïna vegetal

#### 4.2.1.1. Disseny de l'experiment

El primer experiment, (en endavant referit com a Experiment 1) va ser plantejat per a verificar si l'addició de taurina millorava el rendiment nutricional de dietes a base de proteïna vegetal per a orada, i per a determinar el grau òptim d'inclusió en la dieta. Per aquest motiu es va formular una dieta base amb un 50% de proteïna, de la qual el 90% era d'origen vegetal i només un 10% procedia de la farina de peix (Taula 10). Les fonts de proteïna vegetal escollides foren el concentrat proteic de soja, el gluten de blat i el gluten de blat de moro. Les proporcions dels tres ingredients vegetals s'ajustaren segons la seva composició química, facilitada per l'empresa subministradora (SPAROS Lda., Portugal; veure Annex), i atenent als requeriments en aminoàcids essencials de l'orada descrits a Kaushik (1998). També s'afegiren a la formulació lisina, metionina i hidrofosfat de calci per a compensar les deficiències nutricionals intrínseques a aquests ingredients. A la Taula 11 es mostra el perfil d'aminoàcids d'aquesta dieta base. A partir d'aquesta dieta base es prepararen tres dietes més suplementades amb un 0.5, un 1 i un 2% de taurina, respectivament.

Cadascuna de les quatre dietes experimentals fou assignada aleatòriament a un aquari amb 15 orades de  $38.6 \pm 5.4$  g. Els peixos varen ser alimentats diàriament *ad libitum* durant 20

dies. Per al seguiment del pes, el sacrifici i la presa de mostres s'empraren els protocols descrits a Materials i Mètodes (Apartat 3.4 i 3.5).

A fi d'estudiar la possible relació entre els canvis a nivell somàtic amb la modulació del metabolisme intermediari, també s'estudiaren els efectes de la taurina sobre diferents metabòlits en sèrum i fetge, així com l'activitat d'enzims clau en el metabolisme hepàtic.

Taula 10. Formulació i composició química de les dietes emprades a l'Experiment 1.

	0% Tau	0.5% Tau	1% Tau	2% Tau
<i>Formulació (%)</i>				
Farina de peix <sup>1</sup>	6.9	6.9	6.8	6.7
Concentrat proteic de soja <sup>2</sup>	43.8	43.4	43.1	42.5
Gluten de blat <sup>2</sup>	7.6	7.6	7.5	7.4
Gluten de blat de moro <sup>2</sup>	11.5	11.4	11.3	11.2
Midó pregelatinitzat <sup>3</sup>	9.9	9.9	9.9	9.9
Oli de peix <sup>4</sup>	15.0	15.0	15.0	15.0
L-Lisina <sup>5</sup>	0.4	0.4	0.4	0.4
DL-Metionina <sup>2</sup>	0.6	0.6	0.6	0.6
Taurina <sup>5</sup>	0.0	0.5	1.0	2.0
CaHPO <sub>4</sub> <sup>5</sup>	2.2	2.2	2.2	2.2
Mescla mineral <sup>6</sup>	0.9	0.9	0.9	0.9
Mescla vitamínica <sup>7</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
Clorur de colina <sup>5</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1
Alginat <sup>2</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Anàlisi química (% pes sec)</i>				
Proteïna crua	50.2	49.9	49.9	50.0
Greix	14.5	14.5	14.5	14.5
Cendres	7.7	7.7	7.7	7.7
Fòsfor	1.0	1.0	1.0	1.0

<sup>1</sup> Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile).

<sup>2</sup> SPAROS Lda. (Olhão, Portugal).

<sup>3</sup> Midó pregelatinitzat de blat de moro adquirit a Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

<sup>4</sup> A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

<sup>5</sup> Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

<sup>6</sup> Mescla mineral (mg/Kg): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60; ZnO, 30; MnO<sub>2</sub>, 15; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.7; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.5; KI, 1.5; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.3.

<sup>7</sup> Mescla de vitamines (mg/Kg): mio-inositol, 400; àcid ascòrbic, 200; àcid nicotínic, 70; acetat d'alfa-tocoferol, 60; pantotenat de calci, 30; riboflavina, 15; piridoxin, 10; àcid fòlic, 10; menadion, 10; tiamina-HCl, 8; tot-trans retinol, 2; biotina, 0.7; colecalfiferol, 0.05; cianocobalamina, 0.05.

Taula 11. Perfil d'aminoàcids (g/100g proteïna) de la dieta base de l'Experiment 1.

AA	0% Tau	Requeriments orada <sup>1</sup>
ARG	6.0	5,4
HIS	2.4	1,7
LYS	5.3	5,0
THR	3.9	2,8
ILE	3.8	2,6
LEU	7.9	4,5
VAL	4.2	3,0
MET	2.5	2,4
PHE	5.2	2,9
Cys	0.6	-
Tyr	4.2	-
Asx <sup>2</sup>	8.6	-
Glx <sup>3</sup>	18.3	-
Ala	4.5	-
Gly	3.6	-
Ser	4.9	-
Pro	6.5	-
Tau	0.2	-

Els aminoàcids essencials s'indiquen en majúscules, els no essencials en minúscules.

<sup>1</sup>Concentracions de cada aminoàcid requerits per orada segons Kaushik (1998).

<sup>2</sup> Asx representa la suma de concentracions d'Asn i Asp, atès que l'Asn és transformat a Asp durant la hidròlisi.

<sup>3</sup> Glx representa la suma de concentracions de Gln i Glu, atès que la Gln és transformada a Glu durant la hidròlisi.

#### 4.2.1.2. Resultats

##### *Creixement i eficiència alimentària*

Després de 20 dies d'alimentació amb les diferents dietes experimentals, només les orades alimentades amb la dieta amb l'1% d'inclusió de taurina presentaren pesos significativament superiors als de les alimentades amb dieta sense suplement de taurina (Figura 15). No obstant, en calcular les taxes de creixement s'adverteix que la incorporació de taurina a la dieta va millorar el creixement de les orades entre un 35 i un 43%. Tal i com es mostra en la Figura 9, l'augment de la taxa de creixement no és progressiu sinó que s'estanca a

partir del 0.5% d'inclusió de taurina, ajustant-se en un 99.9% a una funció exponencial de tipus  $y=y_0+(y_{\max}-y_0)(1-e^{-\alpha x})$ , on

$y_0$  representa la taxa de creixement quan el nivell d'inclusió de taurina és 0,

$y_{\max}$  representa la màxima taxa de creixement possible,

$\alpha$  és una constant de proporcionalitat entre taxa de creixement i nivell d'inclusió de taurina.

A partir d'aquesta funció i d'acord a les indicacions de Shearer (2000), es calcula com a requeriment de taurina el rang que correspondria al 95-99% de la màxima taxa de creixement. Segons aquest criteri, els juvenils de taurina requeririen una inclusió de taurina d'entre el 0.52% i el 0.96%.

La ingesta d'aliment va augmentar linealment amb el nivell d'inclusió de taurina a la dieta. L'increment en el nivell de taurina va resultar inicialment en una disminució de la taxa de conversió de l'aliment (FCR, *feed conversion ratio*). En sobrepassar l'1% d'inclusió de taurina, els valors de FCR comencen a créixer atès que la ingesta d'aliment continua augmentant mentre que el creixement s'estabilitza. L'evolució dels valors de FCR s'ajusta en un 99.4% a una funció quadràtica. Segons aquesta funció, calculant el valor mínim o vèrtex de la paràbola, s'estima un nivell de requeriment de taurina exògena del 0.93%.



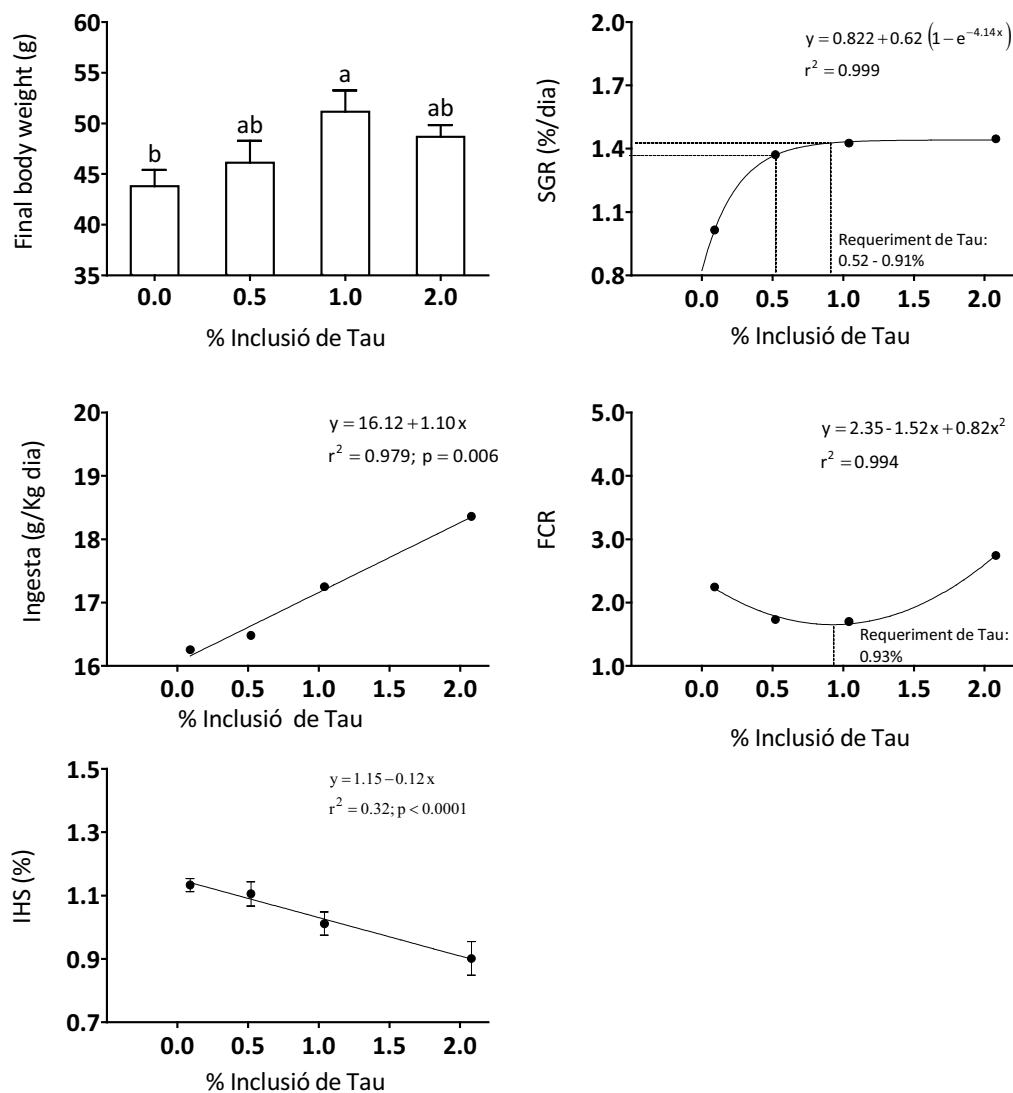


Figura 15. Resultats de creixement, ingesta diària i taxa de conversió de l'aliment (FCR, *feed conversion ratio*) i índex hepatosomàtic (IHS) en orades alimentades amb diferents nivells de taurina. Les barres blanques i les barres d'error representen el valor mitjà i l'error estàndard de la mitjana de cada aquari, respectivament. Els punts i les línies discontinues representen valors únics per a cada aquari i el model predictiu al qual s'ajusten. Lletres diferents sobre les barres indiquen diferències significatives entre mitjanes ( $p < 0.05$ ).

### Metabòlits en sèrum i fetge

El nivell d'inclusió de taurina en la dieta va afectar la concentració dels diferents metabòlits analitzats en sèrum i fetge (Figura 16). Per a tots els metabòlits analitzats, els valors de concentració s'ajusten significativament ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) a una funció quadràtica. Així doncs, les orades alimentades amb un suplement d'un 1% de taurina presentaren les valors més elevats de cada metabòlit, és a dir, les pròximes al vèrtex de la paràbola. En el cas dels nivells de glucosa i triglicèrids en sèrum, un 1% de taurina a la dieta va resultar en valors

estadísticament superiors als de les orades alimentades amb la dieta sense o amb un 2% de complement de taurina. En canvi, els nivells de glicogen en fetge de les orades alimentades amb el suplement de l'1% de taurina superaren significativament al d'aquelles alimentades amb el 2%. Pel que fa als nivells de triglicèrids en fetge, aquests van augmentar significativament amb la dieta amb un 1% de taurina en relació amb els valors obtinguts amb la complementació del 2%.

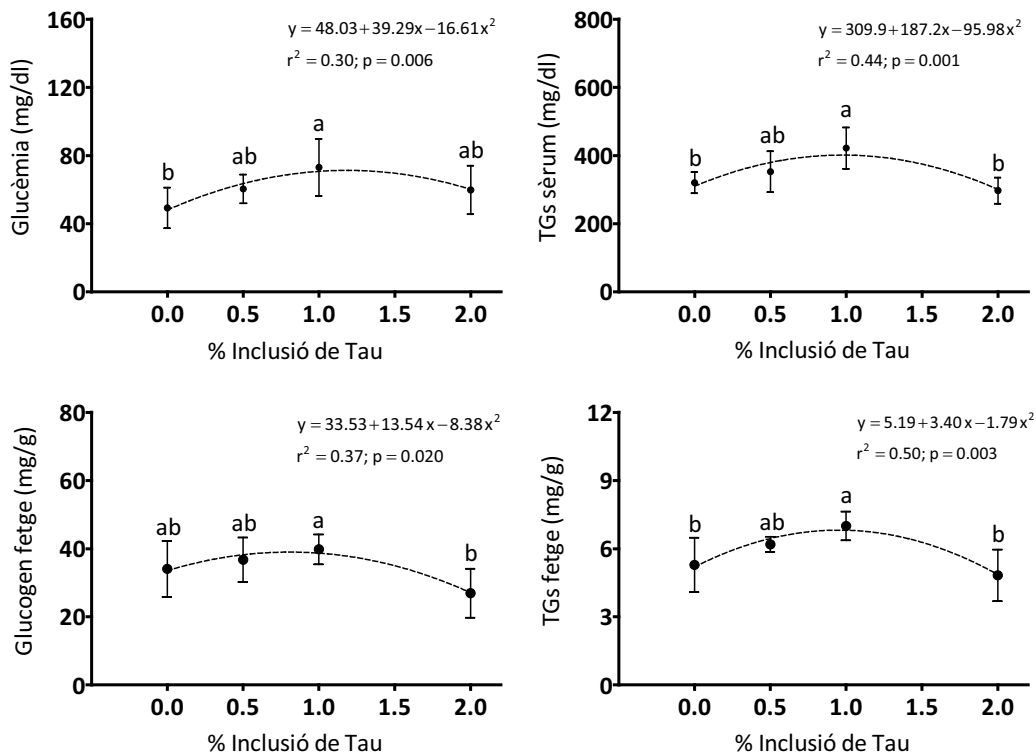


Figura 16. Concentracions de glucosa en sèrum, de triglicèrids (TG) en sèrum i fetge, i de glicogen en fetge d'orades alimentades amb diferents nivells de taurina. Els punts i les barres d'error representen el valor mitjà i l'error estàndard de la mitjana de cada aquari (7-8 mostres per aquari), respectivament. Les línies discontinues corresponen al model predictiu al qual s'ajusten. Lletres diferents sobre els punts indiquen diferències significatives entre mitjanes ( $p < 0.05$ ).

#### Activitats dels enzims del metabolisme intermediari

Les activitats dels enzims glucolítics GK i PFK-1, així com l'activitat FBPasa de la via gluconeogènica s'ajusta significativament al model lineal (Figura 17). Entre els enzims de la glucòlisi, l'activitat GK va augmentar progressivament amb el nivell de taurina en dieta, per contra, l'activitat PFK-1 va disminuir. En comparar l'activitat GK de cada grup d'orades, la tendència anterior es tradueix en diferències significatives entre els grups alimentats amb les dietes amb un 0 i un 2% de taurina. En el cas de la PFK-1, les orades alimentades amb les dietes

amb un 1 o un 2% de taurina van presentar activitats enzimàtiques menors que les alimentades amb les dietes amb un 0 o un 0.5%. Pel que fa a la gluconeogènesi, l'activitat FBP incrementà amb el nivell de taurina en dieta, derivant en diferències significatives entre els peixos alimentats amb les dietes 0 i 0.5% i els alimentats amb les dietes 1 i 2%.

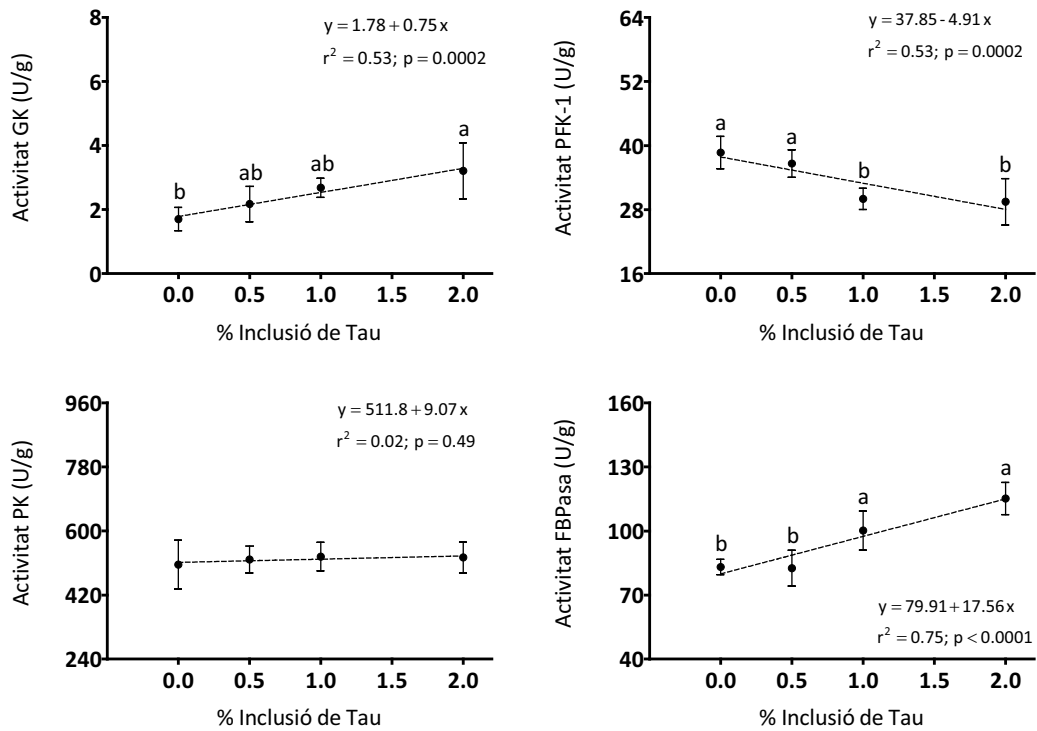


Figura 17. Activitat glucoquinasa (GK), fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), piruvat quinasa (PK) i fructosa bifosfatasa-1 (FBPasa) en fetge d'orades alimentades amb diferents nivells de taurina. Els punts i les barres d'error representen el valor mitjà i l'error estàndard de la mitjana de cada aquari (7-8 mostres per aquari), respectivament. Les línies discontinues corresponen al model predictiu al qual s'ajusten. Lletres diferents sobre els punts indiquen diferències significatives entre mitjanes ( $p < 0.05$ ).

L'activitat dels dos enzims representants de la via de les pentoses fosfat també es va veure afectada pel nivell de taurina en dieta (Figura 18). Tant l'activitat G6PD com la 6PGD s'ajusten significativament a un model lineal de pendent negativa. En conseqüència de la davallada d'activitat, les orades alimentades amb les dietes amb un 1 o un 2% de taurina presentaren valors significativament inferiors als de les alimentades amb les dietes amb un 0 o un 0.5%.

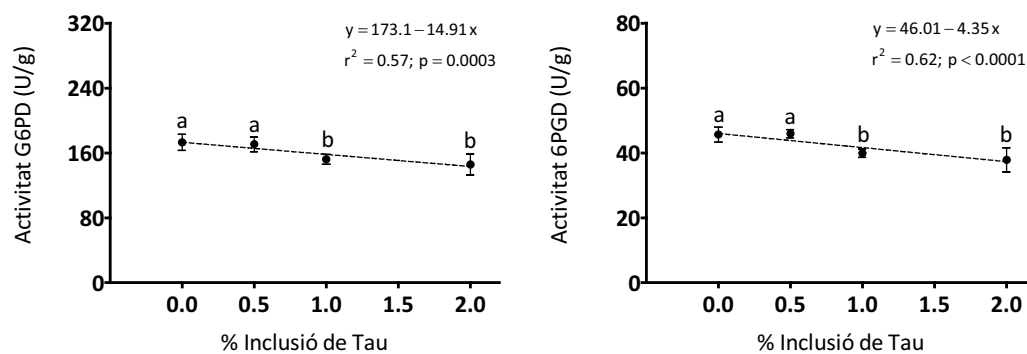


Figura 18. Activitat glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) i 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) en fetge d'orades alimentades amb diferents nivells de taurina. Els punts i les barres d'error representen el valor mitjà i l'error estàndard de la mitjana de cada aquari (7-8 mostres per aquari), respectivament. Les línies discontinues corresponen al model predictiu al qual s'ajusten. Lletres diferents sobre els punts indiquen diferències significatives entre mitjanes ( $p < 0.05$ ).

En relació al metabolisme hepàtic dels aminoàcids, l'activitat aminotransferasa i l'activitat GDH en la direcció de reducció (GDHred) van augmentar amb el nivell de taurina en dieta, ajustant-se significativament a una funció lineal (Figura 19). En comparar amb les activitats obtingudes sense suplement, l'anàlisi *post hoc* corrobora que la inclusió de taurina incrementà significativament l'activitat ALT i AST. En el cas de l'activitat GDHred, l'efecte de la taurina no és tan pronunciat i només s'evidencia a un nivell d'inclusió del 2%. L'activitat de la GDH en la direcció de oxidació (GDHox) també s'ajusta a un model lineal, però, en el seu cas, de pendent negativa. La inclusió d'un 1 o un 2% de taurina en la dieta va reduir significativament l'activitat GDHox respecte a la de les orades alimentades amb un 0 o un 0.5% de taurina.

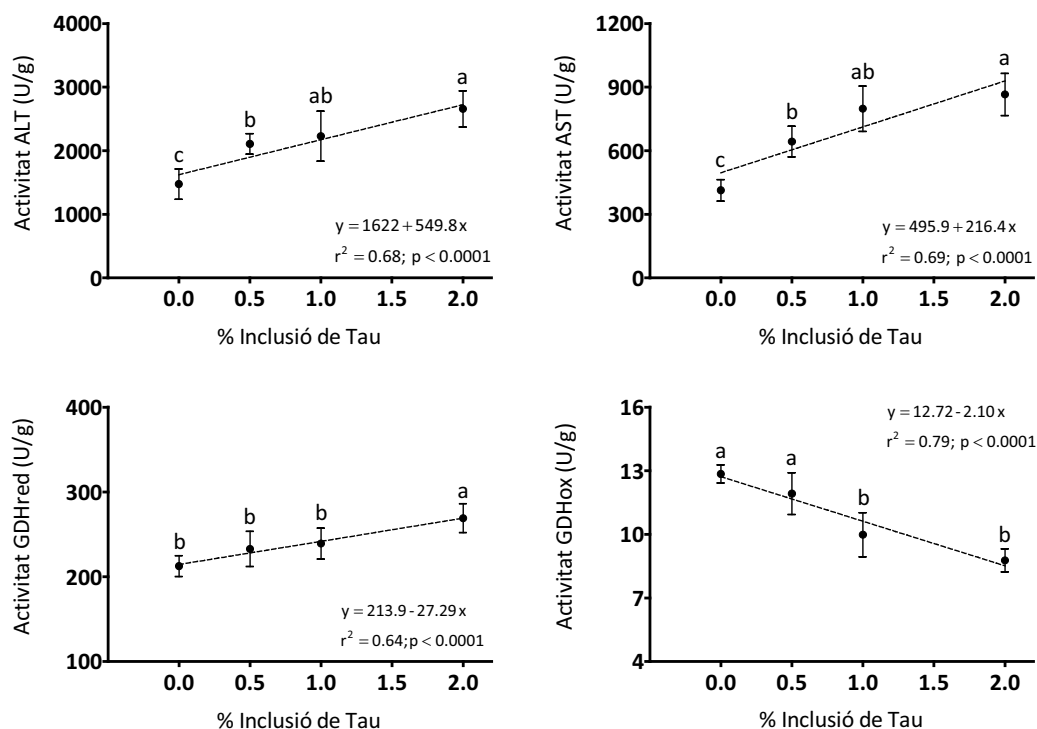


Figura 19. Activitat de l'alanina aminotransferasa (ALT), l'aspartat aminotransferasa (AST) i la glutamat deshidrogenasa en la direcció de reducció (GDHred) i oxidació (GDHox) en fetge d'orades alimentades amb diferents nivells de taurina. Els punts i les barres d'error representen el valor mitjà i l'error estàndard de la mitjana de cada aquari (7-8 mostres per aquari), respectivament. Les línies discontinues corresponen al model predictiu al qual s'ajusten. Lletres diferents sobre els punts indiquen diferències entre mitjanes ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.2. Experiment 2: efectes de la inclusió de taurina en dietes amb un 90 o un 100% de proteïna vegetal

##### 4.2.2.1. Disseny de l'experiment

A partir dels resultats obtinguts a l'Experiment 1, es va establir l'1% en dieta com el grau òptim d'inclusió de taurina. En un segon experiment (en endavant referit com a Experiment 2) s'estudiaren els efectes de la inclusió d'aquest 1% de taurina sobre el rendiment nutricional de dues dietes amb diferents nivells de proteïna vegetal: l'una amb un 90% i l'altra amb un 100%. Seguint un disseny factorial, es prepararen quatre dietes diferents: dues dietes amb un 90% de proteïna vegetal amb o sense complement de taurina (dietes 90T i 90, respectivament), i dues dietes amb un 100% de proteïna vegetal amb o sense complement de taurina (dietes 100T i 100). Tal i com es detalla a la Taula 12, les dietes continuaren sent formulades amb la mateixa proporció de proteïna i greixos, i els mateixos ingredients que a l'Experiment 1. Per tal d'avaluar l'eficàcia de la taurina restablint el creixement i l'eficiència alimentària de les orades a valors competitiu, es va preparar una dieta control a base de farina de peix (dieta FM).

A la taula 13 es mostren els perfils d'aminoàcids de les cinc dietes experimentals. Pel que fa als aminoàcids essencials, la dieta FM contenia majors concentracions de lisina, però menors de leucina i fenilalanina. Les dietes amb un 90 o un 100% de proteïna vegetal presentaren perfils d'aminoàcids similars. La inclusió de taurina elevà la concentració del compost fins a valors 10-20 vegades superiors als de les dietes vegetals no complementades, i dues vegades superiors als de la dieta FM.

Cadascuna de les cinc dietes experimentals varen ser assignades aleatòriament a tres aquaris amb 24-25 orades cadascun. A l'inici de l'experiment, el pes mitjà en tot el conjunt d'orades fou de  $5.9 \pm 1.1$  g, i no s'observaren diferències de pes entre els diferents aquaris i els diferents tractaments ( $p > 0.05$ ). Els peixos varen ser alimentats diàriament *ad libitum* durant 54 dies. Per al seguiment del pes, el sacrifici i la presa de mostres s'empraren els protocols descrits a Materials i Mètodes (Apartat 3.4 i 3.5).

A banda de l'anàlisi dels efectes de la taurina sobre el creixement, l'eficiència alimentària i el metabolisme intermediari de les orades, en aquest experiment s'obtingueren mostres de femtes per a analitzar possibles canvis en la digestibilitat de la dieta.

Taula 12. Formulació i composició química de les dietes emprades a l'Experiment 2.

	FM	90	90T	100	100T
<i>Formulació (%)</i>					
Farina de peix <sup>1</sup>	70.3	6.9	6.8	-	-
Concentrat proteic de soja <sup>2</sup>	-	43.7	43.1	48.6	47.9
Gluten de blat <sup>2</sup>	-	7.6	7.5	8.5	8.4
Gluten de blat de moro <sup>2</sup>	-	11.5	11.3	12.7	12.6
Midó pregelatinitzat <sup>3</sup>	19.4	9.9	9.9	9.1	9.1
Oli de peix <sup>4</sup>	8.1	15.0	15.0	15.7	15.7
L-Lisina <sup>5</sup>	-	0.4	0.4	0.4	0.4
DL-Metionina <sup>2</sup>	-	0.6	0.6	0.6	0.6
Taurina <sup>5</sup>	-	-	1.0	-	1.0
CaHPO <sub>4</sub> <sup>5</sup>	-	2.2	2.2	2.2	2.2
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>5</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mescla mineral <sup>6</sup>	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Mescla vitamínica <sup>7</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Clorur de colina <sup>5</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Alginat <sup>2</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<i>Anàlisi química (% pes sec)</i>					
Proteïna crua	51.0	50.2	50.0	50.0	50.5
Greix	14.1	14.5	14.4	14.3	14.5
Cendres	13.7	7.7	7.9	8.2	7.9
Fòsfor	1.9	1.0	1.0	1.0	1.0

<sup>1</sup> Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile).

<sup>2</sup> SPAROS Lda. (Olhão, Portugal).

<sup>3</sup> Midó pregelatinitzat de blat de moro adquirit a Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

<sup>4</sup> A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

<sup>5</sup> Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

<sup>6</sup> Mescla mineral (mg/Kg): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60; ZnO, 30; MnO<sub>2</sub>, 15; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.7; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.5; KI, 1.5; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.3.

<sup>7</sup> Mescla de vitamines (mg/Kg): mio-inositol, 400; àcid ascòrbic, 200; àcid nicotínic, 70; acetat d'alfa-tocoferol, 60; pantotemat de calci, 30; riboflavina, 15; piridoxin, 10; àcid fòlic, 10; menadion, 10; tiamina-HCl, 8; tot-trans retinol, 2; biotina, 0.7; colecalciferol, 0.05; cianocobalamina, 0.05.

Taula 13. Perfil d'aminoàcids (g/100g proteïna) de les dietes de l'Experiment 2.

AA	FM	90	90T	100	100T
ARG	5.4	6.0	5.7	5.9	5.7
HIS	2.9	2.4	2.4	2.4	2.2
LYS	6.7	5.3	5.3	5.0	5.0
THR	4.1	3.9	3.7	3.9	3.9
ILE	3.5	3.8	3.8	3.7	3.7
LEU	6.2	7.9	7.5	8.0	7.8
VAL	4.1	4.2	4.1	4.1	4.1
MET	2.8	2.5	2.5	2.4	2.4
PHE	3.8	5.2	5.2	5.6	5.4
Cys	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6
Tyr	3.4	4.2	3.8	4.3	4.2
Asx <sup>1</sup>	7.6	8.6	8.2	8.7	8.5
Glx <sup>2</sup>	11.2	18.3	17.2	18.8	18.1
Ala	5.0	4.5	4.3	4.4	4.4
Gly	4.3	3.6	3.5	3.5	3.4
Ser	3.5	4.9	4.6	5.0	4.9
Pro	3.4	6.5	6.1	6.7	6.7
Tau	1.0	0.2	2.0	0.1	1.9

<sup>1</sup> Asx representa la suma de concentracions d'Asn i Asp, atès que l'Asn és transformat a Asp durant la hidròlisi.

<sup>2</sup> Glx representa la suma de concentracions de Gln i Glu, atès que la Gln és transformada a Glu durant la hidròlisi.



#### 4.2.2.2. Resultats

##### *Creixement i eficiència alimentària*

Al final de l'experiment, les orades alimentades amb dieta FM van presentar valors de creixement (pes final i SGR), ingesta, FCR, retenció proteica (RP), retenció de greix (RG) i índex hepatosomàtic (IHS) significativament superiors ( $p < 0.05$ ) als d'aquelles alimentades amb les dietes 90 i 100 (Taula 14). La reduïda proporció de farina de peix en la dieta 90 va ser suficient per incrementar significativament la ingesta, el creixement, la RP i l'IHS de les orades respecte a les alimentades amb la dieta 100. En canvi, la FCR i la RG no va variar significativament entre els grups alimentats amb la dieta 90 o la 100.

La inclusió de taurina a la dieta va millorar significativament la ingesta i el creixement de les orades. No obstant, l'efecte de la taurina sobre el creixement va variar segons la proporció de proteïna vegetal. Així doncs, l'increment de la taxa de creixement va ser lleugerament superior en incloure la taurina en la dieta 90% proteïna vegetal que en la 100% (un increment del 42.9% enfront d'un del 38.0%, respectivament). Els valors de FCR també milloraren amb la taurina i, d'igual manera que el creixement, la millora fou superior amb un 90% de proteïna vegetal que amb un 100% de proteïna vegetal (un 59.5% enfront d'un del 17.1%, respectivament). D'altra banda, la conversió de proteïnes i greixos ingerits en proteïna (RP) i greix (RG) corporal van millorar únicament en alimentar les orades amb la dieta 90T. Malgrat la millora de creixement i eficiència alimentària, la inclusió de taurina en la dieta 90T només va ser capaç de restaurar la ingesta i la FCR fins valors similars als obtinguts amb la dieta FM.

Les orades alimentades amb les dietes 90 i 100 van presentar una proporció d'aigua, proteïna i cendres corporals significativament majors als del grup FM. La proporció de greix en les orades del grup FM va ser significativament superior a la dels grups 90 i 100T, però no a la dels grups 90T i 100.

Taula 14. Paràmetres de creixement, ingesta diària, eficiència alimentària i composició corporal d'orades alimentades amb les diferents dietes experimentals.

	FM	90	90T	100	100T	ANOVA de dues vies		
						Interacció	Tau	%PP
Pes inicial (g)	5.79 ± 0.17	5.71 ± 0.28	6.07 ± 0.10	5.80 ± 0.03	5.96 ± 0.20	NS	NS	NS
Pes final (g)	18.32 ± 0.64	10.91 ± 0.12 <sup>b</sup>	15.30 ± 0.63 <sup>a</sup>	9.11 ± 0.33 <sup>c</sup>	11.09 ± 0.26 <sup>b</sup>	***	+++	+++
SGR (%/dia)	2.13 ± 0.05	1.20 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.72 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.15 ± 0.05 <sup>b</sup>	**	†	+++
Ingesta (g/Kg dia)	22.41 ± 1.00	20.91 ± 0.25	22.83 ± 0.45	17.37 ± 0.66	20.28 ± 0.46	**	NS	+++
FCR	1.00 ± 0.06	2.01 ± 0.09 <sup>ab</sup>	1.26 ± 0.07 <sup>c</sup>	2.19 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.06 <sup>b</sup>	**	†	++
Retenció proteïna (%)	35.81 ± 2.55	12.90 ± 1.19 <sup>b</sup>	22.92 ± 1.36 <sup>a</sup>	9.06 ± 0.21 <sup>c</sup>	11.13 ± 0.34 <sup>bc</sup>	**	+++	+++
Retenció greixos (%)	43.55 ± 3.30	4.72 ± 1.54 <sup>b</sup>	24.66 ± 1.67 <sup>a</sup>	4.94 ± 1.33 <sup>b</sup>	4.89 ± 1.35 <sup>b</sup>	**	+++	+++
HSI	1.44 ± 0.18	1.20 ± 0.19	1.24 ± 0.14	1.13 ± 0.14	1.11 ± 0.07	**	NS	++
<i>Composició corporal (% pes en fresc. PF; % pes sec. PS)</i>								
Humitat (% PF)	70.30 ± 0.47	74.62 ± 0.41 <sup>b</sup>	72.62 ± 0.36 <sup>c</sup>	74.40 ± 0.47 <sup>b</sup>	75.79 ± 0.49 <sup>a</sup>	**	+++	NS
Proteïna crua (% PS)	16.00 ± 0.02	15.02 ± 0.07 <sup>b</sup>	15.82 ± 0.03 <sup>a</sup>	14.67 ± 0.03 <sup>c</sup>	13.93 ± 0.05 <sup>d</sup>	**	+++	NS
Greix cru (% PS)	6.88 ± 0.03	5.33 ± 0.05 <sup>b</sup>	6.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.89 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.20 ± 0.03 <sup>b</sup>	**	+++	NS
Cendres (% PS)	3.21 ± 0.10	4.12 ± 0.04 <sup>ab</sup>	3.58 ± 0.05 <sup>c</sup>	4.05 ± 0.03 <sup>bc</sup>	4.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	**	+++	+++

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ++, p<0.001; +++, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

La suplementació de taurina en dieta amb un 90% de proteïna vegetal va reduir la proporció d'aigua i cendres corporals de les orades (grup 90 > grup 90T). Contràriament, la proporció d'aigua i cendres augmentà en incloure la taurina en dieta amb un 100% de proteïna vegetal (grup 100T > grup 100). En absència de taurina, la proporció de proteïna vegetal en la dieta no va afectar significativament la proporció corporal d'aigua i cendres (grup 90= grup 100). En presència de taurina, però, la proporció d'aigua i cendres va augmentar en alimentar exclusivament amb proteïna vegetal (grup 100T > grup 90T). Els greixos corporals augmentaren amb la taurina quan la proteïna vegetal en la dieta era del 90%, i disminuïren quan era del 100%. Independentment de la taurina, el percentatge de proteïna corporal de les orades s'incrementà en reduir la proporció de proteïna vegetal (grup 90 > grup 100; grup 90T > grup 100T). Inclosa en dieta amb un 90% de proteïna vegetal, la taurina va augmentar la proporció de proteïna corporal. Per contra, en dieta amb un 100% de proteïna vegetal, la taurina va causar l'efecte contrari.

#### *Digestibilitat aparent de la dieta, ingesta digerible i pèrdues fecals*

Els coeficients de digestibilitat aparent (CDA) de la matèria seca, el carboni i el fòsfor en les orades alimentades amb la dieta FM van ser majors que els de les orades alimentades amb dieta vegetal (Taula 15). És especialment destacable la superioritat del CDA del fòsfor en la dieta FM, atès que supera en 1.6-2.6 vegades al de la resta de dietes. El CDA de la proteïna de la dieta FM va ser superior al de les dietes 90, 90T i 100T, però no al de la dieta 100, la qual mostrà valors similars. La dieta 100T va presentar CDAs de matèria seca i carboni per sobre de la resta de dietes vegetals. El CDA de la proteïna de la dieta 100 va ser superior al de la resta de dietes, incloent la dieta FM. El CDA del fòsfor van ser majors en les dietes amb 100% de substitució de farina de peix que en les del 90%. La inclusió de taurina en la dieta vegetal millorà el CDA del fòsfor.

Les orades alimentades amb dieta FM van ingerir 1.3-2.3 vegades més matèria seca, i 3.1-5.9 vegades més fòsfor digerible que les alimentades amb dieta vegetal. El grup FM també van ingerir més proteïna i carboni digeribles que els grups alimentats amb dieta vegetal, amb excepció del grup 90T en el cas de la proteïna. La taurina va incrementar la ingesta de matèria seca, proteïna, carboni i fòsfor digeribles. No obstant, aquest increment va ser més pronunciat en alimentar amb dieta 100% proteïna vegetal. En absència de taurina, la substitució total de la farina de peix va reduir la ingesta de matèria seca i carboni digeribles. En presència de taurina, la substitució total de la farina de peix va incrementar significativament la ingesta de fòsfor digerible, però no la de matèria seca i carboni. Independentment de la presència o no de

taurina a la dieta, la substitució total de la farina de peix va resultar en una major ingesta de proteïna digerible.

Les pèrdues de matèria seca a través de les femtes van ser majors en alimentar les orades amb dieta formulada majoritàriament o exclusivament amb proteïna vegetal. Només les orades alimentades amb la dieta 90T van excretar majors quantitats de proteïna que les orades del grup FM. En canvi, a excepció de les orades alimentades amb la dieta 100T, tots els grups alimentats amb dieta vegetal excretaren majors quantitats de carboni. La taurina va reduir les pèrdues fecals de matèria seca només en ser inclosa en dieta formulada exclusivament amb proteïna vegetal. Tanmateix, la taurina va incrementar les pèrdues fecals de proteïna, sense interacció amb el grau de substitució de farina de peix. Per la seva banda, la substitució total de farina de peix va reduir les pèrdues fecals de carboni i fòsfor.

#### *Metabòlits en sèrum i fetge*

24 hores després de la darrera ingesta, no s'observaren diferències significatives en la glucèmia de les orades alimentades amb les dietes 90 i 100 respecte de les alimentades amb la FM (Taula 16). La suplementació amb taurina va reduir significativament la glucèmia fins a valors inferiors als del grup FM. Els nivells de triglicèrids en sèrum i fetge, així com el glicogen hepàtic, foren 2-5.6 vegades superiors en les orades alimentades amb dieta FM que en les alimentades amb les dietes 90 i 100. En suplementar la taurina en la dieta amb 90% de proteïna vegetal, els nivells de triglicèrids en sèrum i de glicogen en fetge augmentaren significativament, però no els de triglicèrids en fetge, els quals no es van veure afectats. Contràriament, en incloure-la en dieta amb 100% proteïna vegetal, van disminuir tant els triglicèrids sèrics i hepàtics, com el glicogen hepàtic. Sense la suplementació de taurina, les orades alimentades amb la dieta 100 presentaren concentracions de triglicèrids en sèrum i de glicogen en fetge superiors als del grup alimentat amb la dieta 90. No s'observaren diferències significatives en els triglicèrids hepàtics dels grups 90 i 100.

Taula 15. Coeficients de digestibilitat aparent (CDA) i ingestes de matèria seca, proteïna, carboni i fòsfor digeribles en els diferents grups d'orades.

	FM	90	90T	100	100T	ANOVA de dues vies			
						Interacció	Tau	%PP	
<i>Coeficients de digestibilitat aparent (CDA. %)</i>									
Matèria seca	77.68 ± 0.48	49.76 ± 1.24 <sup>b</sup>	** * 50.37 ± 0.80 <sup>b</sup>	** * 48.70 ± 1.61 <sup>b</sup>	** * 64.16 ± 2.50 <sup>a</sup>	++	++	++	
Proteïna	82.13 ± 0.35	76.29 ± 0.75 <sup>b</sup>	* 75.83 ± 0.79 <sup>b</sup>	* 82.23 ± 1.55 <sup>a</sup>	* 76.77 ± 1.53 <sup>b</sup>	†	†	†	
Carboni	80.52 ± 0.42	64.53 ± 1.23 <sup>b</sup>	** * 65.86 ± 1.05 <sup>b</sup>	** * 67.04 ± 1.41 <sup>b</sup>	** * 74.09 ± 1.23 <sup>a</sup>	†	++	++	
Fòsfor	60.85 ± 3.79	23.38 ± 0.82	* 27.02 ± 1.03	* 28.98 ± 1.86	* 38.14 ± 1.64	NS	++	+++	
<i>Ingesta digerible (g/Kg peix dia)</i>									
Matèria seca	17.41 ± 0.77	10.34 ± 0.31 <sup>b</sup>	** * 11.79 ± 0.24 <sup>a</sup>	** * 8.48 ± 0.43 <sup>c</sup>	** * 12.99 ± 0.23 <sup>a</sup>	++	+++	NS	
Proteïna	9.64 ± 0.41	8.22 ± 0.15	* 9.02 ± 0.14	* 7.24 ± 0.17	* 8.09 ± 0.21	NS	++	+++	
Carboni	8.49 ± 0.34	6.70 ± 0.15 <sup>b</sup>	* 7.48 ± 0.08 <sup>a</sup>	* 5.85 ± 0.10 <sup>c</sup>	* 7.61 ± 0.27 <sup>a</sup>	†	+++	NS	
Fòsfor	0.136 ± 0.003	0.026 ± 0.001 <sup>c</sup>	* 0.033 ± 0.001 <sup>b</sup>	* 0.025 ± 0.002 <sup>c</sup>	* 0.041 ± 0.002 <sup>a</sup>	++	+++	++	
<i>Pèrdues fecals (g/Kg peix dia)</i>									
Matèria seca	5.00 ± 0.25	10.43 ± 0.25 <sup>a</sup>	** * 11.49 ± 0.29 <sup>a</sup>	** * 8.90 ± 0.26 <sup>b</sup>	** * 7.29 ± 0.44 <sup>c</sup>	++	NS	+++	
Proteïna	2.10 ± 0.41	2.54 ± 0.08	* 2.90 ± 0.15	* 1.58 ± 0.19	* 2.41 ± 0.15	NS	++	++	
Carboni	2.06 ± 0.14	3.65 ± 0.15	* 3.91 ± 0.15	* 2.89 ± 0.23	* 2.65 ± 0.17	NS	NS	+++	
Fòsfor	0.089 ± 0.013	0.083 ± 0.001	0.091 ± 0.003	0.065 ± 0.003	0.067 ± 0.003	NS	NS	+++	

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ++, p<0.001; +++, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

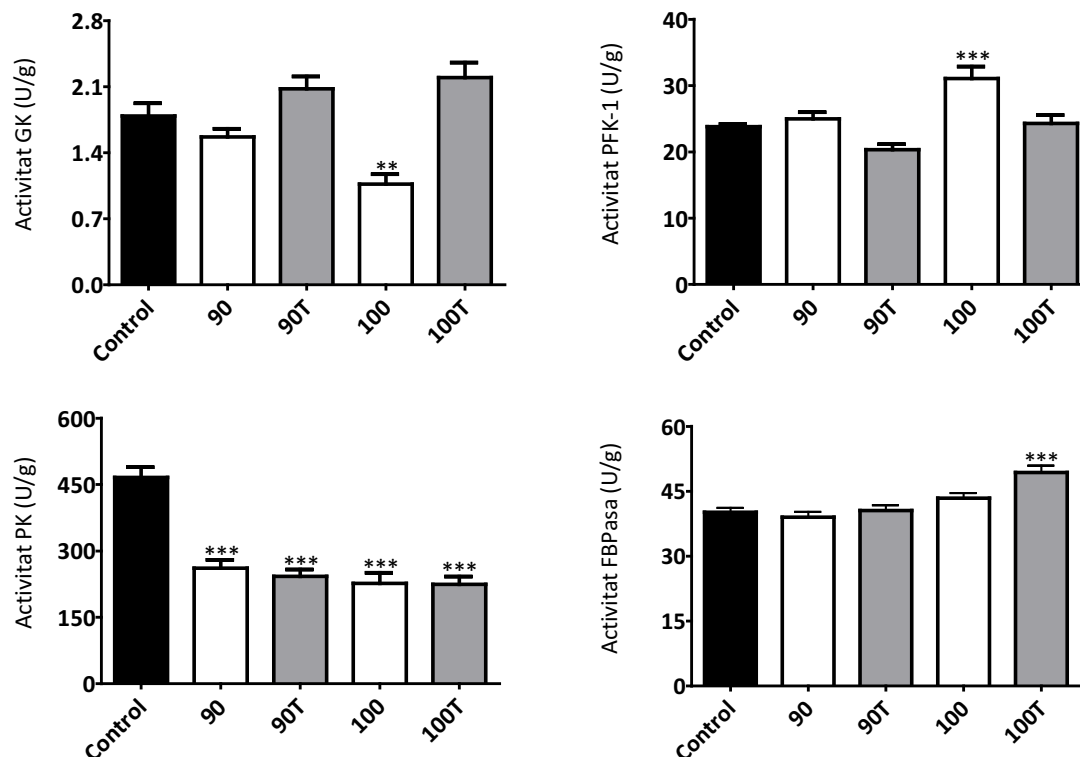
Taula 16. Concentracions de glucosa en sèrum, de triglicèrids (TG) en sèrum i fetge, i de glicogen en el fetge dels diferents grups experimentals.

	FM	90	90T	100	100T	ANOVA de dues vies		
						Interacció	Tau	%PP
<i>Sèrum (mg/dL)</i>								
Glucèmia	68.0 ± 9.44	69.91 ± 18.89	53.17 ± 7.26 *	72.59 ± 15.18	48.62 ± 13.51 *	NS	+++	NS
Triglicèrids	538.7 ± 132.6	106.0 ± 30.9 <sup>b</sup>	145.1 ± 35.8 <sup>a</sup> **	142.9 ± 34.2 <sup>a</sup> **	95.6 ± 20.3 <sup>b</sup> **	+++	NS	NS
<i>Fetge (mg/g)</i>								
Glucogen	123.2 ± 13.3	23.7 ± 3.21 <sup>b</sup>	41.05 ± 9.42 <sup>a</sup> **	42.26 ± 10.55 <sup>a</sup> **	25.7 ± 8.00 <sup>b</sup> **	+++	NS	NS
Triglicèrids	8.64 ± 1.34	4.47 ± 0.41 <sup>a</sup>	4.77 ± 0.71 <sup>a</sup> *	4.88 ± 0.66 <sup>a</sup> *	3.29 ± 0.39 <sup>b</sup> *	++	+	+

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=8). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (+, p<0.05; ++, p<0.001; +++, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

### *Activitats d'enzims del metabolisme intermediari*

En comparació amb la dieta FM, l'alimentació de les orades amb dieta 100 va resultar en la disminució de l'activitat GK i l'augment de l'activitat PFK-1 (Figura 19). Així mateix, en alimentar amb qualsevol de les dietes vegetals, l'activitat PK es va veure reduïda respecte l'activitat del grup FM. La inclusió de taurina en la dieta va incrementar significativament l'activitat GK al fetge de les orades, especialment en aquelles alimentades exclusivament amb proteïna vegetal. Alhora, l'activitat GK observada al grup 90 va ser significativament superior a l'observada al grup 100. Contràriament a l'activitat GK, l'activitat PFK-1 va ser reduïda tant per acció de la taurina com a conseqüència d'una menor proporció de proteïna vegetal a la dieta. En canvi, la taurina y la proporció de proteïna vegetal no afectaren significativament l'activitat PK. Pel que fa a l'activitat gluconeogènica, la inclusió de taurina i la substitució total de la farina de peix augmentaren significativament l'activitat FBPasa. La combinació d'ambdues condicions en la dieta 100T va derivar en valors d'activitat significativament superiors als trobats en les orades alimentades amb la dieta FM.

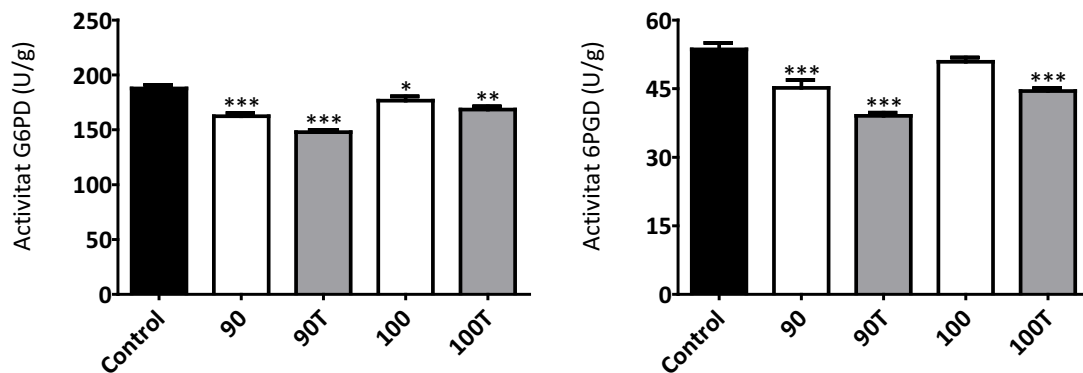


	ANOVA de dues vies			Test post-hoc			
	Interacció	Tau	% PV	90	90T	100	100T
GK	†	+++	NS	b	a	c	a
PFK-1	NS	+++	+++	-	-	-	-
PK	NS	NS	NS	-	-	-	-
FBPasa	NS	++	+++	-	-	-	-

Figura 19. Activitat de la glucoquinasa (GK), la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), la piruvat quinasa (PK) i la fructosa bifosfatasa-1 (FBPasa) en el fetge dels diferents grups experimentals. La barra negra representa el valor mitjà (n=8) del grup FM, les barres blanques el valor mitjà dels grups sense suplement de taurina i les grises el valor mitjà dels grups amb suplement de taurina. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Els asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ++, p<0.001; +++, p<0.0001; NS, no significatiu). PV: proteïna vegetal.

Les activitats G6PD i 6PGD en el fetge de les orades alimentades amb proteïna vegetal va ser significativament inferior a les de les alimentades amb la dieta FM, amb excepció de l'activitat 6PGD del grup amb dieta 100 (Figura 20). L'alimentació amb un 90% de proteïna vegetal en lloc d'un 100% va reduir significativament les activitats G6PD i 6PGD. Paral·lelament, la suplementació de taurina també va contribuir a disminuir l'activitat G6PD i 6PGD en el fetge de les orades.

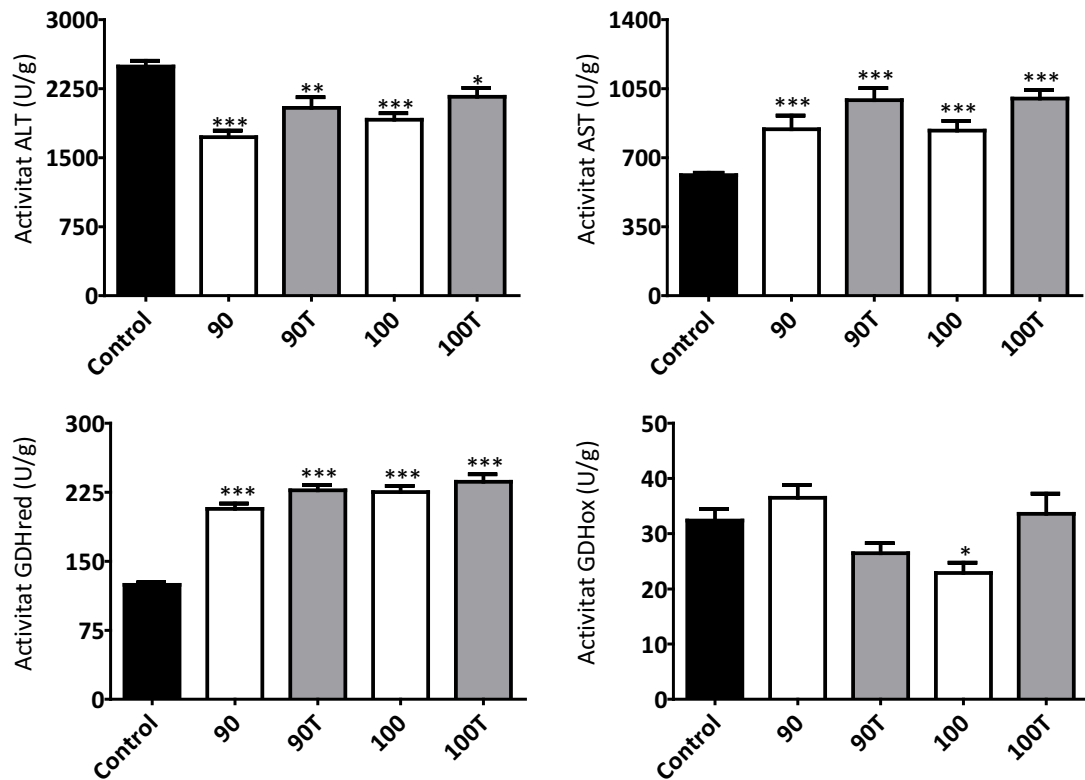




ANOVA de dues vies			
	Interacció	Tau	% PV
G6PDH	NS	††	†††
6PGDH	NS	†††	†††

Figura 20. Activitat de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) i la 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) en el fetge dels diferents grups experimentals. La barra negra representa el valor mitjà (n=8) del grup FM, les barres blanques el valor mitjà dels grups sense suplement de taurina i les grises el valor mitjà dels grups amb suplement de taurina. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†,  $p < 0.05$ ; ††,  $p < 0.001$ ; †††,  $p < 0.0001$ ; NS, no significatiu). PV: proteïna vegetal.

En comparació amb les orades alimentades amb la dieta FM, les orades alimentades amb les dietes formulades amb proteïna vegetal van presentar major activitat AST i GDHred, i menor activitat ALT (Figura 21). No s'observaren diferències significatives segons el grau de substitució de farina de peix, però sí amb la complementació amb taurina, que va resultar en una regulació a l'alça de l'activitat ALT, AST i GDHred. L'activitat GDHox en els grups alimentats amb les dietes 90 o 100T va ser significativament major que en els alimentats amb les dietes FM, 90T o 100.



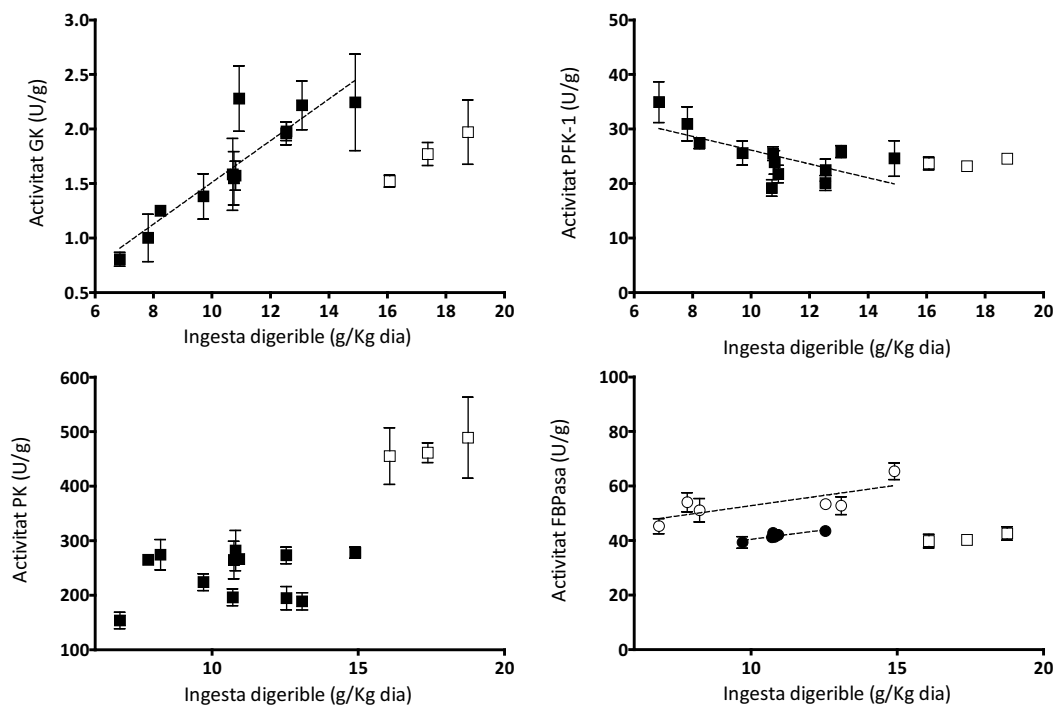
Enzyme	ANOVA de dues vies			Test post-hoc			
	Interacció	Tau	% PV	90	90T	100	100T
ALT	NS	††	NS	-	-	-	-
AST	NS	†	NS	-	-	-	-
GDHred	NS	†	NS	-	-	-	-
GDHox	†††	NS	NS	a	b	b	a

Figura 21. Activitat de l'alanina aminotransferasa (ALT), l'aspartat aminotransferasa (AST) i la glutamat deshidrogenasa en la direcció de reducció (GDHred) i oxidació (GDHox) en el fetge dels diferents grups experimentals. La barra negra representa el valor mitjà (n=8) del grup FM, les barres blanques el valor mitjà dels grups sense suplement de taurina i les grises el valor mitjà dels grups amb suplement de taurina. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ††, p<0.001; †††, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05). PV: proteïna vegetal.

### *Relació entre activitat enzimàtica i ingesta*

A fi d'avaluar la possible influència de la ingesta en la modulació del metabolisme hepàtic de les orades, les activitats enzimàtiques han estat contraposades als nivells d'ingesta de matèria seca digerible. L'activitat dels diferents enzims no mostraren relació amb la ingesta de matèria seca digerible en orades alimentades amb la dieta FM. No obstant, sí s'han trobat tendències significatives en les orades alimentades amb proteïna vegetal.

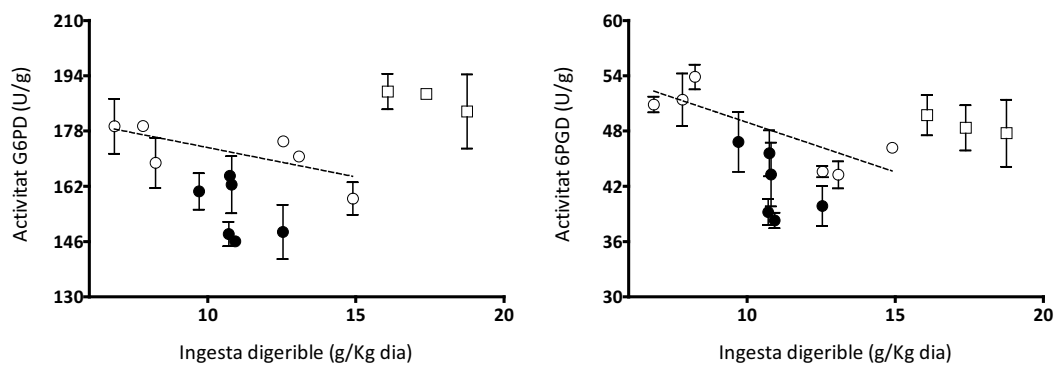
Tal i com es representa a la Figura 22, l'activitat GK en les orades alimentades amb proteïna vegetal s'incrementà proporcionalment a la ingesta de matèria seca digerible. Per contra, l'activitat PFK-1 en les orades alimentades amb proteïna vegetal disminuï proporcionalment a la ingesta de matèria seca digerible. L'activitat PK i la ingesta de matèria seca digerible no mostraren correlació. L'activitat FBPasa en les orades alimentades amb un 90% i un 100% augmentaren amb la ingesta de matèria seca. De les dues funcions paral·leles descrites pels dos grups d'orades, la corresponent a les orades alimentades amb un 90% de proteïna vegetal va presentar un valor d'intersecció major.



Enzim	% PV	Model	r <sup>2</sup>	p
GK	90 i 100	$y = -0.40 + 0.19 x$	0.67	<0.0001
PFK-1	100	$y = 39.7 - 1.14 x$	0.39	0.006
FBPasa	90	$y = 26.63 + 1.38 x$	0.26	0.03
	100	$y = 37.72 + 1.51 x$	0.38	0.007

Figura 22. Relació de l'activitat glucoquinasa (GK), fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), piruvat quinasa (PK) i fructosa bifosfatasa-1 (FBPasa) amb la ingesta de matèria seca digerible. Els quadres plens representen els valors d'activitat corresponents a les dietes vegetals, els quadres buits els corresponents a la dieta FM. En cas d'observar tendències diferents (ANCOVA de la pendent i la intercepció del model,  $p < 0.05$ ) segons nivell de proteïna vegetal (PV), els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a cada nivell s'anitzarien per separat. Els cercles plens representen els valors obtinguts amb un 90% PV, els cercles buits els obtinguts amb un 100% PV.

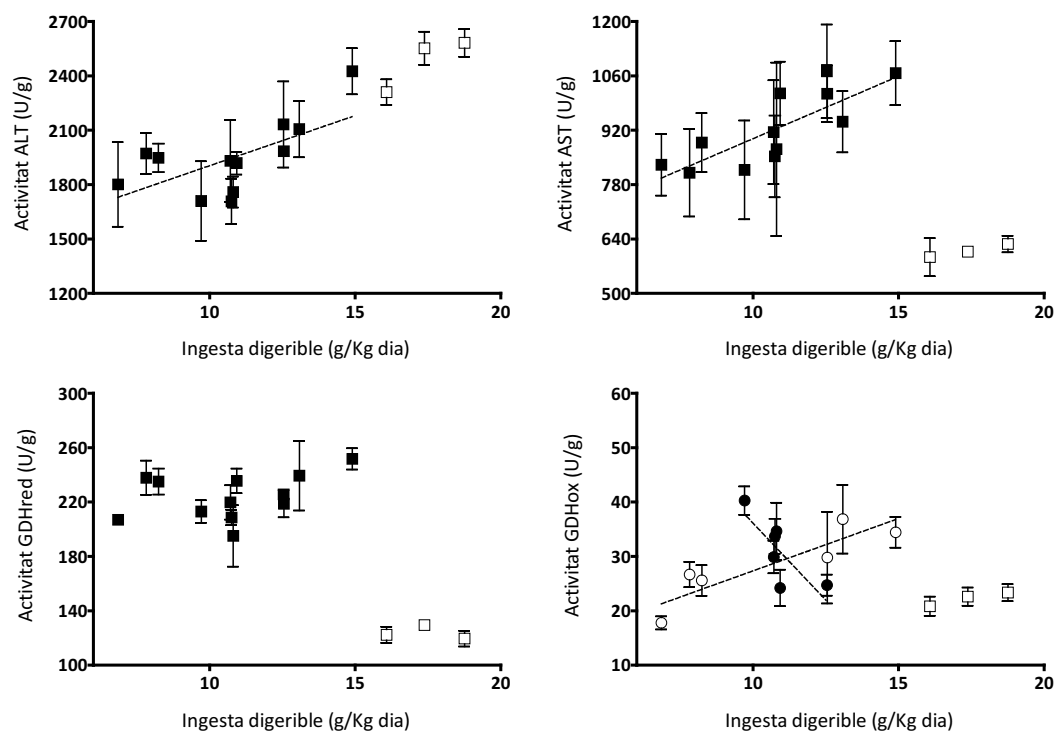
A la Figura 23 s'observa com l'activitat G6PD i 6PGD va disminuir amb la ingesta de matèria seca digerible en aquelles orades alimentades exclusivament amb proteïna vegetal. L'activitat G6PD i 6PGD a les orades alimentades amb un 90% de proteïna vegetal no s'ajustaren significativament a la ingesta de matèria seca digerible.



Enzim	% PV	Model	r <sup>2</sup>	p
G6PD	100	y = 190.2 - 1.70 x	0.31	0.0381
6PGD	100	y = 59.7 - 1.08 x	0.59	0.0005

Figura 23. Relació de l'activitat glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) i 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) amb la ingesta de matèria seca digerible. Els quadres plens representen els valors d'activitat corresponents a les dietes vegetals, els quadres buits els corresponents a la dieta FM. En cas d'observar tendències diferents (ANCOVA de la pendent i la intercepció del model,  $p < 0.05$ ) segons nivell de proteïna vegetal (% PV), els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a cada nivell s'analitzarien per separat. Els cercles plens representen els valors obtinguts amb un 90% PV, el cercles buits els obtinguts amb un 100% PV.

En els peixos alimentats amb dieta vegetal, l'activitat ALT i AST va augmentar proporcionalment a la ingesta de matèria seca digerible (Figura 24). Pel que fa a l'activitat GDHox, s'observaren tendències diferents segons el grau de substitució de farina de peix. Així doncs, en les orades alimentades exclusivament amb proteïna vegetal, mentre l'activitat GDHox augmentà proporcionalment amb la ingesta de matèria seca digerible, en les orades alimentades amb un 90% de proteïna vegetal la tendència observada fou la contrària. L'activitat GDHred no mostra tendència significativa envers la ingesta.



Enzim	% PV	Model	$r^2$	p
ALT	100	$y = 1351 + 55.3 x$	0.23	0.011
AST	100	$y = 576.5 + 32.2 x$	0.18	0.017
GDHox	90	$y = 92.63 - 5.65 x$	0.35	0.016
	100	$y = 8.10 + 1.93 x$	0.37	0.012

Figura 24. Relació de l'activitat alanina aminotransferasa (ALT), aspartat aminotransferasa (AST) i glutamat deshidrogenasa (GDHred i GDHox) amb la ingesta de matèria seca digerible. Els quadres plens representen els valors d'activitat corresponents a les dietes vegetals, els quadres buits els corresponents a la dieta FM. En cas d'observar tendències diferents (ANCOVA de la pendent i la intercepció del model,  $p < 0.05$ ) segons nivell de proteïna vegetal (% PV), els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a cada nivell s'analitzarien per separat. Els cercles plens representen els valors obtinguts amb un 90% PV, els cercles buits els obtinguts amb un 100% PV.

### **4.2.3. Experiment 3: efectes de la inclusió de taurina en combinació amb un hidrolitzat de proteïna de soja**

#### **4.2.3.1. Disseny de l'experiment**

Els dos experiments anteriors demostren que la inclusió de taurina millora el valor nutricional de dietes formulades amb una mescla de proteïnes vegetals. En el tercer experiment (en endavant referit com a Experiment 3) es va avaluar l'efectivitat de la taurina en ser inclosa en dieta formulada amb concentrat proteic de soja com a única font de proteïna. La soja és un producte comunament emprat en la formulació de dietes per a peixos, en tant que és àmpliament disponible en el mercat mundial i té un perfil d'aminoàcids força balancejat. Ahhora, també s'analitzaren els possibles beneficis de la inclusió d'un hidrolitzat proteic de soja. Així doncs, partint d'una dieta a base de concentrat proteic de soja (CPS), i seguint un disseny factorial, es dissenyaren quatre dietes diferents: dues dietes amb o sense un suplement d'un 1% de taurina (dietes CPS+Tau i CPS, respectivament), i dues dietes en les quals se substituï un 10% del concentrat proteic de soja per hidrolitzat de proteic de soja (HPS), complementada o no amb un 1% de taurina (dietes HPS+Tau i HPS, respectivament). Descomptant les fonts de proteïna vegetal, les dietes del present experiment (Taula 17) foren formulades amb els mateixos ingredients que les dels Experiments 1 i 2. D'igual manera que a l'Experiment 2, els efectes de la inclusió de taurina i hidrolitzat de proteïna de soja varen ser contraposats als resultats obtinguts amb una dieta control a base de farina de peix (dieta FM).

A la taula 18 es mostren els perfils d'aminoàcids de les cinc dietes experimentals. Pel que fa als aminoàcids essencials, la dieta FM contenia una majors concentracions de lisina, però menors d'arginina i fenilalanina. Aparentment, la inclusió de l'hidrolitzat de proteïna de soja no va alterar la composició en aminoàcids de les dietes. Les dietes vegetals sense suplement de taurina presentaven nivells molt baixos del compost, mentre que les suplementades contenien concentracions dos cops superiors als de la dieta FM.

Cadascuna de les cinc dietes experimentals varen ser assignades aleatòriament a tres aquaris amb 27-29 orades cadascun. A l'inici de l'experiment, el pes mitjà de tot el conjunt d'orades fou de  $12.2 \pm 2.1$  g, i no s'observaren diferències de pes entre els diferents aquaris i els diferents tractaments ( $p > 0.05$ ). Els peixos varen ser alimentats diàriament *ad libitum* durant 42 dies. Per al seguiment del pes, el sacrifici i la presa de mostres s'empraren els protocols descrits a Materials i Mètodes (Apartat 3.4 i 3.5).

A més a més de les anàlisis dels efectes de la taurina i l'hidrolitzat de proteïna de soja sobre el creixement, l'eficiència alimentària i el metabolisme intermediari de les orades, en aquest experiment s'obtingueren mostres de femtes per a analitzar possibles canvis en la digestibilitat de la dieta.

Taula 17. Formulació i composició química de les dietes emprades a l'Experiment 3.

	FM	CPS	CPS+Tau	HPS	HPS+Tau
<i>Formulació (%)</i>					
Farina de peix <sup>1</sup>	70.29	-	-	-	-
Concentrat de proteïna de soja <sup>2</sup>	-	69.43	68.45	62.49	61.61
Hidrolitzat de proteïna de soja <sup>3</sup>	-	-	-	6.56	6.47
Midó pregelatinitzat <sup>4</sup>	19.38	9.37	9.34	9.72	9.69
Oli de peix <sup>5</sup>	8.11	15.79	15.79	15.80	15.81
L-Lisina <sup>3</sup>	-	0.30	0.30	0.30	0.30
DL-Metionina <sup>2</sup>	-	0.70	0.70	0.70	0.70
Taurina <sup>3</sup>	-	-	1.00	-	1.00
CaHPO <sub>4</sub> <sup>3</sup>	-	2.20	2.20	2.20	2.20
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>3</sup>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mescla mineral <sup>6</sup>	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Mescla vitamínica <sup>7</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Clorur de colina <sup>3</sup>	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Alginat <sup>2</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Anàlisi proximal (% pes sec)</i>					
Proteïna crua	50.54	48.88	48.96	49.54	49.13
Greix cru	14.13	15.63	16.06	16.06	15.89
Cendres	13.71	7.66	7.85	8.17	7.89
Fòsfor	1.92	1.04	1.05	1.01	1.02

<sup>1</sup> Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile).

<sup>2</sup> SPAROS Lda. (Olhão, Portugal).

<sup>3</sup> Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

<sup>4</sup> Midó pregelatinitzat de blat de moro adquirit a Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

<sup>5</sup> A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

<sup>6</sup> Mescla mineral (mg/Kg): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60; ZnO, 30; MnO<sub>2</sub>, 15; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.7; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.5; KI, 1.5; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.3.

<sup>7</sup> Mescla de vitamines (mg/Kg): mio-inositol, 400; àcid ascòrbic, 200; àcid nicotínic, 70; acetat d'alfa-tocoferol, 60; pantotenat de calci, 30; riboflavina, 15; piridoxin, 10; àcid fòlic, 10; menadion, 10; tiamina-HCl, 8; tot-trans retinol, 2; biotina, 0.7; colecalciferol, 0.05; cianocobalamina, 0.05.



Taula 18. Perfil d'aminoàcids (g/100g proteïna) de les dietes de l'Experiment 3.

AA	FM	CPS	CPS+Tau	HPS	HPS+Tau
ARG	5.2	7.1	6.8	7.9	6.9
HIS	2.9	2.5	2.5	2.7	2.5
LYS	6.7	6.0	5.9	6.7	6.1
THR	4.1	3.9	3.7	4.3	4.0
ILE	3.5	4.0	3.9	4.4	4.0
LEU	6.2	6.9	6.7	7.3	6.7
VAL	4.1	4.2	4.0	4.6	4.1
MET	2.8	2.4	2.4	2.6	2.5
PHE	3.8	5.2	4.8	5.6	5.0
Cys	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5
Tyr	3.4	4.0	3.8	4.4	4.1
Asx <sup>1</sup>	7.6	9.9	9.6	10.6	9.8
Glx <sup>2</sup>	11.2	15.9	15.1	16.8	15.8
Ala	5.0	4.0	3.9	4.6	4.1
Gly	4.3	3.6	3.6	3.9	3.5
Ser	3.5	4.9	4.7	5.0	4.5
Pro	3.4	4.7	4.7	5.4	4.9
Tau	1.0	0.0	2.2	0.1	2.3

<sup>1</sup> Asx representa la suma de concentracions d'Asn i Asp, atès que l'Asn és transformat a Asp durant la hidròlisi.

<sup>2</sup> Glx representa la suma de concentracions de Gln i Glu, atès que la Gln és transformada a Glu durant la hidròlisi.

#### 4.2.3.2. Resultats

##### *Creixement i eficiència alimentària*

Les orades alimentades amb qualsevol de les dietes amb soja presentaren creixements (pes final i SGR), eficiències alimentàries (FCR, RP i RG) i IHS pitjors que els del grup alimentat amb la dieta amb farina de peix (dieta FM) (Taula 19). En comparació amb el grup FM, la ingesta diària va ser inferior en les orades alimentades amb les dietes CPS o HPS. La inclusió de taurina (dietes CPS+Tau i HPS+Tau) va millorar la ingesta fins a valors similars als de les orades alimentades amb la dieta FM. Malgrat que la ingesta de dieta HPS va ser superior a la de la dieta CPS, en el cas de la dieta HPS+Tau, la inclusió de l'hidrolitzat de soja no va augmentar la ingesta respecte la dieta CPS+Tau. Els valors de pes final i SGR també van augmentar en complementar les dietes de soja amb taurina o l'hidrolitzat de soja. A diferència de la ingesta, els beneficis individuals de la taurina i l'hidrolitzat de soja en el creixement sí es van sumar en incloure'ls conjuntament a la dieta HPS+Tau. Malgrat tot, cap d'aquests grups d'orades va presentar creixements equiparables als del grup FM. Pel que fa a l'eficiència alimentària, la complementació de la dieta amb taurina (dietes CPS+Tau i HPS+Tau) va millorar FCR i RP

significativament. En canvi, per a la RG, els valors foren significativament superiors en les orades alimentades amb les dietes CPS+Tau, HPS o HPS+Tau que en les alimentades amb la dieta CPS. És més, aquest darrer grup d'orades va presentar una RG negativa, és a dir, la seva proporció de greix corporal va disminuir al llarg de l'experiment. En cap dels grups alimentats amb dieta vegetal els valors de FCR, RP o RG es van equiparar als dels peixos alimentats amb la dieta FM.

El canvi de font de proteïna principal també va comportar canvis significatius en la composició química del cos de les orades. Les orades alimentades amb proteïna de soja van presentar cossos amb una major proporció d'aigua, proteïna i cendres, així com una menor proporció de greixos. La inclusió de taurina i l'hidrolitzat de soja també afectaren la proporció corporal d'aigua, proteïna i greix, tot i que els seus efectes interactuaren entre si. Així doncs, a les dietes vegetals sense hidrolitzat de soja (CPS i CPS+Tau), la inclusió de taurina no va tenir efectes sobre la proporció d'aigua, proteïna i greix de les orades. Les orades alimentades amb la dieta HPS mostraren una menor proporció de proteïna i aigua, i una major proporció de greix que la resta de grups alimentats amb dieta vegetal. Els valors més baixos de greix corporal van pertànyer a les orades alimentades amb la dieta HPS+Tau, els quals foren significativament inferiors als del grup alimentat amb la dieta CPS. Pel que fa a les cendres corporals, la seva proporció va ser significativament reduïda en suplementar la dieta amb taurina i/o amb hidrolitzat de soja.

Taula 19. Paràmetres de creixement, ingesta diària, eficiència alimentària i composició corporal d'orades alimentades amb les diferents dietes experimentals.

	FM	CPS	CPS+Tau	HPS	HPS+Tau	ANOVA de dues vies		
						Interacció	Tau	HPS
Pes inicial (g)	12.18 ± 0.56	12.36 ± 0.54	12.03 ± 0.17	12.03 ± 0.32	12.41 ± 0.44	NS	NS	NS
Pes final (g)	31.35 ± 2.36	19.05 ± 2.22	* ** * 21.94 ± 1.06	* ** * 20.44 ± 1.68	* ** * 24.71 ± 1.46	NS	††	†
SGR (% /dia)	2.25 ± 0.13	0.99 ± 0.19	* ** * 1.40 ± 0.11	* ** * 1.25 ± 0.15	* ** * 1.64 ± 0.14	NS	††	†
Ingesta (g/ Kg dia)	21.65 ± 0.06	19.43 ± 0.32 <sup>c</sup>	* ** * 22.17 ± 0.20 <sup>a</sup>	* ** * 20.78 ± 0.13 <sup>b</sup>	* ** * 21.39 ± 0.81 <sup>a</sup>	††	†††	†
FCR	1.04 ± 0.05	2.35 ± 0.16	* ** * 1.74 ± 0.04	* ** * 1.91 ± 0.08	* ** * 1.66 ± 0.11	NS	††	†
Retenció proteica (%)	32.62 ± 0.82	15.55 ± 1.53	* ** * 20.47 ± 0.79	* ** * 16.73 ± 1.38	* ** * 21.00 ± 1.88	NS	†	NS
Retenció de greix (%)	52.59 ± 2.55	-2.47 ± 1.15 <sup>c</sup>	* ** * 4.16 ± 0.58 <sup>b</sup>	* ** * 11.00 ± 1.05 <sup>a</sup>	* ** * 5.92 ± 1.26 <sup>b</sup>	††	NS	†††
IHS	1.40 ± 0.04	0.96 ± 0.03	* ** * 1.13 ± 0.04	* ** * 0.91 ± 0.02	* ** * 1.13 ± 0.04	NS	†††	NS
<i>Composició corporal (% pes en fresc. PF; % pes sec. PS)</i>								
Humitat (% PF)	69.81 ± 0.21	72.78 ± 0.19	* ** * 73.25 ± 0.11	* ** * 72.38 ± 0.24	* ** * 73.58 ± 0.15	NS	††	NS
Proteïna crua (% PS)	17.51 ± 0.10	18.11 ± 0.13	* 17.83 ± 0.13	17.46 ± 0.19	17.52 ± 0.23	NS	NS	†
Greix cru (% PS)	7.70 ± 0.05	5.11 ± 0.03 <sup>b</sup>	* ** * 4.98 ± 0.03 <sup>c</sup>	* ** * 5.87 ± 0.04 <sup>a</sup>	* ** * 4.70 ± 0.03 <sup>d</sup>	†††	†††	†††
Cendres (% PS)	3.53 ± 0.07	4.21 ± 0.03	* ** * 3.98 ± 0.03	* ** * 4.01 ± 0.08	* ** * 3.66 ± 0.06	NS	†††	††

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ††, p<0.001; †††, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

### *Digestibilitat aparent de la dieta, ingesta digerible i pèrdues fecals*

Els coeficients de digestibilitat aparent (CDA) de la matèria seca, la proteïna, el carboni i el fòsfor van ser reduïts en substituir la farina de peix pel concentrat proteic de soja (Taula 20). No obstant, el CDA de la proteïna va augmentar amb l'hidrolitzat de soja fins a equiparar-se amb el de la dieta FM. La inclusió de l'hidrolitzat de soja també va millorar els CDAs de la matèria seca i el carboni. En canvi, la inclusió de taurina disminuï els CDAs de la matèria seca, del carboni, i també de la proteïna, però només en absència de l'hidrolitzat de soja. El CDA del fòsfor en la dieta HPS+Tau va ser entre un 21 i un 37% superior al de la resta de dietes de soja.

Les orades alimentades amb la dieta FM van ingerir un 28-52% més de matèria seca, un 4-22% més de proteïna, un 23-43% més de carboni, i de 2.3 a 3.4 vegades més de fòsfor digerible que les orades alimentades amb qualsevol de les dietes de soja. La suplementació de taurina i/o hidrolitzat de soja va augmentar la ingesta de matèria seca, proteïna i carboni digeribles en les orades alimentades amb les dietes de soja. Pel que respecta a la ingesta de fòsfor digerible, va augmentar amb la inclusió de taurina. L'hidrolitzat de soja també va millorar la ingesta de fòsfor digerible, tot i que només en combinació amb taurina.

La substitució de la farina de peix va suposar majors pèrdues fecals de matèria seca i carboni. Pel que fa a les pèrdues de proteïna a través de les femtes, el grup alimentat amb la dieta CPS+Tau va presentar valors superiors als de la resta de grups, incloent el FM. Aquest mateix patró es repeteix per a la matèria seca i el carboni. D'altra banda, el grup d'orades alimentades amb la dieta HPS+Tau va presentar menors pèrdues de fòsfor que la resta de grups.

### *Metabòlits en sèrum i fetge*

Les orades alimentades amb la dieta FM van exhibir majors valors de glucosa i triglicèrids en sèrum, i de glicogen i triglicèrids en fetge, que la resta de grups (Taula 21). Va ser especialment notable el descens dels triglicèrids en sèrum i del glicogen hepàtic, els quals arriben a ser entre 2 i 4 vegades superiors amb la dieta FM.

La inclusió de taurina en dieta en combinació amb l'hidrolitzat de proteïna de soja va reduir significativament la glucèmia de les orades (HPS>HPS+Tau). La inclusió d'hidrolitzat de soja en dieta sense taurina va incrementar la glucèmia (HPS>CPS). Pel que fa als nivells sèrics de triglicèrids, la concentració en les orades alimentades amb la dieta HPS va ser un 27-37% superiors als de la resta. En fetge, els triglicèrids van augmentar en suplementar la dieta amb hidrolitzat de soja, i van disminuir en afegir-hi la taurina. El glicogen hepàtic també va ser reduït per la taurina, però no va ser afectat per l'hidrolitzat de soja.

Taula 20. Coeficients de digestibilitat aparent (CDA) i ingestes de matèria seca, proteïna, carboni i fòsfor digeribles en els diferents grups d'orades.

	FM	CPS	CPS+Tau	HPS	HPS+Tau	ANOVA de dues vies			
						Interacció	Tau	HPS	
<i>Coeficients de digestibilitat aparent (CDA. %)</i>									
Matèria seca	75.58 ± 1.11	55.26 ± 1.66	* ** ** 51.55 ± 0.45	* ** ** 59.58 ± 0.92	* ** ** 58.20 ± 0.65	NS	†	+++	
Proteïna	89.09 ± 0.61	84.57 ± 0.48 <sup>b</sup>	* ** ** 79.15 ± 0.73 <sup>c</sup>	* ** ** 87.43 ± 0.37 <sup>a</sup>	* ** ** 86.96 ± 0.42 <sup>a</sup>	++	+++	+++	
Carboni	82.66 ± 1.15	62.37 ± 0.88	* ** ** 57.90 ± 0.79	* ** ** 66.13 ± 0.67	* ** ** 64.91 ± 0.92	NS	††	+++	
Fòsfor	66.74 ± 2.32	38.20 ± 1.39 <sup>c</sup>	* ** ** 43.77 ± 0.23 <sup>b</sup>	* ** ** 38.86 ± 1.09 <sup>bc</sup>	* ** ** 53.28 ± 1.90 <sup>a</sup>	†	+++	††	
<i>Ingesta digerible (g/Kg peix dia)</i>									
Matèria seca	16.36 ± 0.25	10.74 ± 0.16	* ** ** 11.43 ± 0.20	* ** ** 12.38 ± 0.27	* ** ** 12.73 ± 0.10	NS	†	+++	
Proteïna	9.69 ± 0.04	7.92 ± 0.13	* ** ** 8.54 ± 0.02	* ** ** 8.92 ± 0.02	* ** ** 9.35 ± 0.06	NS	+++	+++	
Carboni	8.33 ± 0.09	5.82 ± 0.10	* ** ** 6.15 ± 0.04	* ** ** 6.55 ± 0.11	* ** ** 6.76 ± 0.06	NS	†	+++	
Fòsfor	0.277 ± 0.010	0.081 ± 0.003 <sup>c</sup>	* ** ** 0.102 ± 0.001 <sup>b</sup>	* ** ** 0.085 ± 0.003 <sup>c</sup>	* ** ** 0.120 ± 0.005 <sup>a</sup>	†	+++	††	
<i>Pèrdues fecals (g/Kg peix dia)</i>									
Matèria seca	5.29 ± 0.24	8.70 ± 0.30 <sup>b</sup>	* ** ** 10.74 ± 0.01 <sup>a</sup>	* ** ** 8.40 ± 0.14 <sup>b</sup>	* ** ** 9.15 ± 0.20 <sup>b</sup>	†	+++	††	
Proteïna	1.19 ± 0.07	1.45 ± 0.06 <sup>b</sup>	* ** ** 2.25 ± 0.10 <sup>a</sup>	* ** ** 1.29 ± 0.04 <sup>b</sup>	* ** ** 1.40 ± 0.05 <sup>b</sup>	+++	+++	+++	
Carboni	1.75 ± 0.12	3.51 ± 0.12 <sup>b</sup>	* ** ** 4.47 ± 0.12 <sup>a</sup>	* ** ** 3.35 ± 0.05 <sup>b</sup>	* ** ** 3.66 ± 0.12 <sup>b</sup>	†	+++	††	
Fòsfor	0.138 ± 0.010	0.121 ± 0.001 <sup>a</sup>	* ** ** 0.131 ± 0.001 <sup>a</sup>	* ** ** 0.128 ± 0.002 <sup>a</sup>	* ** ** 0.105 ± 0.004 <sup>b</sup>	+++	†	††	

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ††, p<0.001; †††, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

Taula 21. Glucosa en sèrum, triglicèrids (TG) en sèrum i fetge, i glicogen en el fetge dels diferents grups experimentals.

	FM	CPS	CPS+Tau	HPS	HPS+Tau	ANOVA de dues vies						
						Interacció	Tau	HPS				
<i>Serum</i>												
Glucosa	71.02 ± 2.66	50.49 ± 0.88 <sup>b</sup>	** ** **	57.60 ± 3.76 <sup>ab</sup>	* *	61.60 ± 2.88 <sup>a</sup>	*	50.95 ± 1.68 <sup>b</sup>	** ** **	++	NS	NS
Triglicèrids	406.3 ± 32.46	136.8 ± 5.79 <sup>b</sup>	** ** **	118.2 ± 8.03 <sup>b</sup>	** ** **	188.6 ± 5.98 <sup>a</sup>	** ** **	127.9 ± 8.72 <sup>b</sup>	** ** **	++	+++	+++
<i>Fetge</i>												
Glicogen	89.48 ± 3.68	36.74 ± 4.34	** ** **	29.38 ± 2.29	** ** **	34.28 ± 2.45	** ** **	21.14 ± 1.40	** ** **	NS	++	NS
Triglicèrids	9.32 ± 0.81	4.78 ± 0.21	** ** **	4.25 ± 0.15	** ** **	6.71 ± 0.32	** ** **	5.34 ± 0.42	** ** **	NS	++	+++

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=8). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ††, p<0.001; †††, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

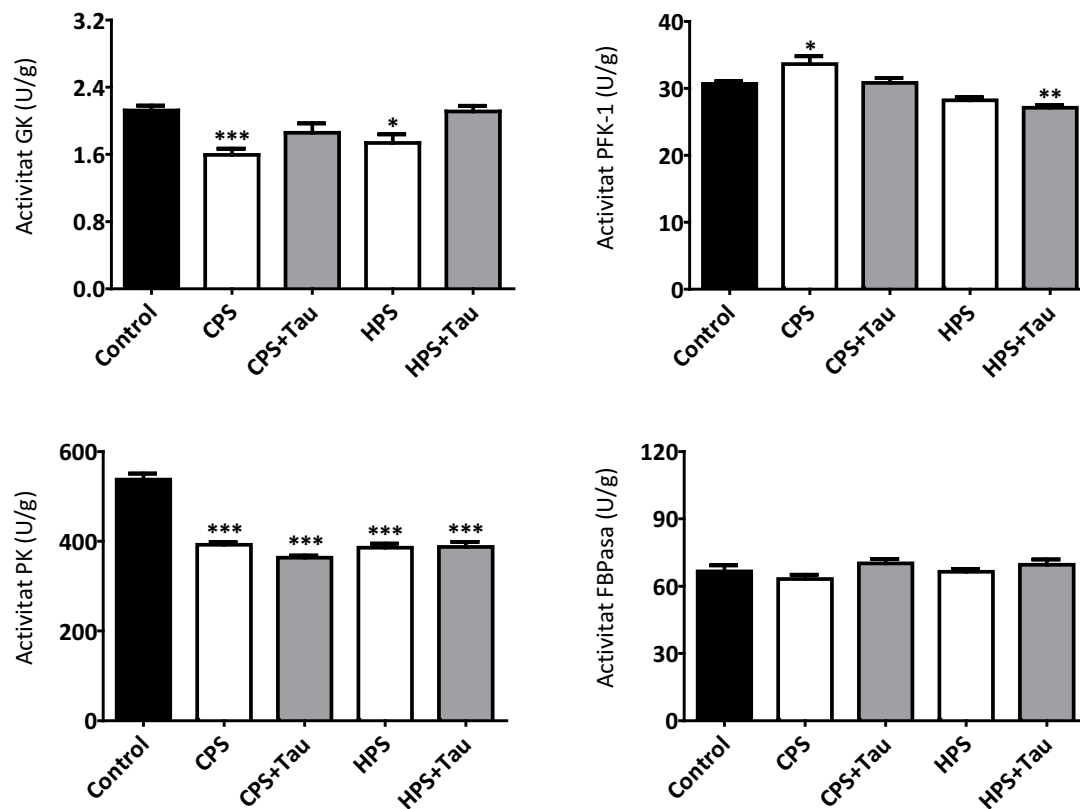
### *Activitats d'enzims del metabolisme intermediari*

L'activitat glucolítica en el fetge de les orades va variar segons la dieta proporcionada (Figura 25). L'activitat PK a les orades alimentades amb dieta de soja va ser inferior a la del grup FM. L'activitat GK a les orades alimentades amb les dietes CPS o HPS va ser significativament inferior a la de les alimentades amb dieta FM. L'activitat PFK-1, en canvi, no va diferir entre les orades alimentades amb la dieta FM i les alimentades amb dieta de soja. En relació a l'activitat FBPasa, no es van observar diferències significatives entre els grups amb dieta de soja i el grup FM.

L'activitat GK va augmentar amb la suplementació de taurina i/o hidrolitzat de soja fins a valors similars als del grup FM. Aquesta tendència, però, no continuà més avall en la via glucolítica, doncs l'activitat PFK-1 es va reduir en incloure l'hidrolitzat de soja, i l'activitat PK no va experimentar canvis en incloure cap dels dos additius. La inclusió de taurina en les dietes de soja va incrementar l'activitat FBPasa.

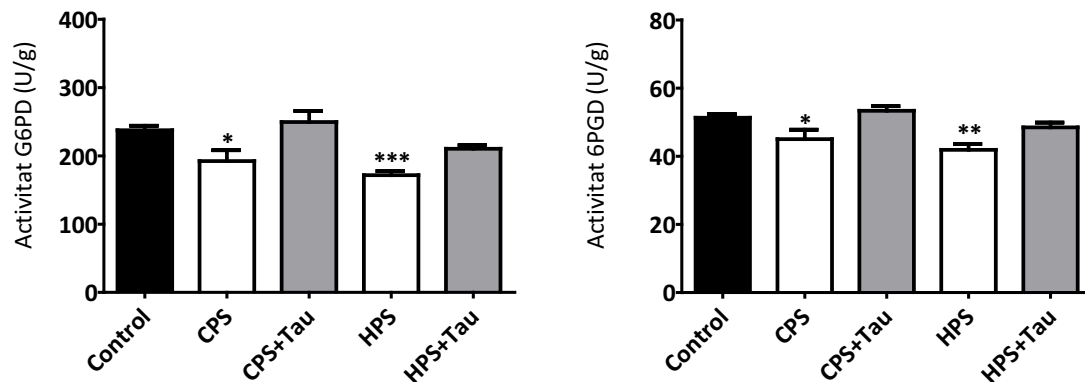
L'activitat G6PD i 6PGD en el fetge de les orades alimentades amb les dietes CPS o HPS va ser significativament inferior a la del grup FM (Figura 26). A les orades alimentades amb dieta de soja, l'activitat G6PD i 6PGD va augmentar amb la taurina i va disminuir amb l'hidrolitzat de soja. A conseqüència de l'augment d'activitat degut a la taurina, els peixos alimentats amb les dietes CPS+Tau i HPS+Tau van exhibir valors d'activitat G6PD i 6PGD similars als dels alimentats amb la dieta FM.





	ANOVA de dues vies		
	Interacció	Tau	HPS
GK	NS	+++	†
PFK-1	NS	†	+++
PK	NS	NS	NS
FBPasa	NS	†	NS

Figura 25. Activitat glucoquinasa (GK), fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), piruvat quinasa (PK) i fructosa bifosfatasa-1 (FBPasa) en fetge d'orades alimentades amb les diferents dietes experimentals. La barra negra representa el valor mitjà (n=8) del grup FM, les barres blanques el valor mitjà dels grups sense suplement de taurina i les grises el valor mitjà dels grups amb suplement de taurina. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†,  $p < 0.05$ ; ††,  $p < 0.001$ ; †††,  $p < 0.0001$ ; NS, no significatiu).

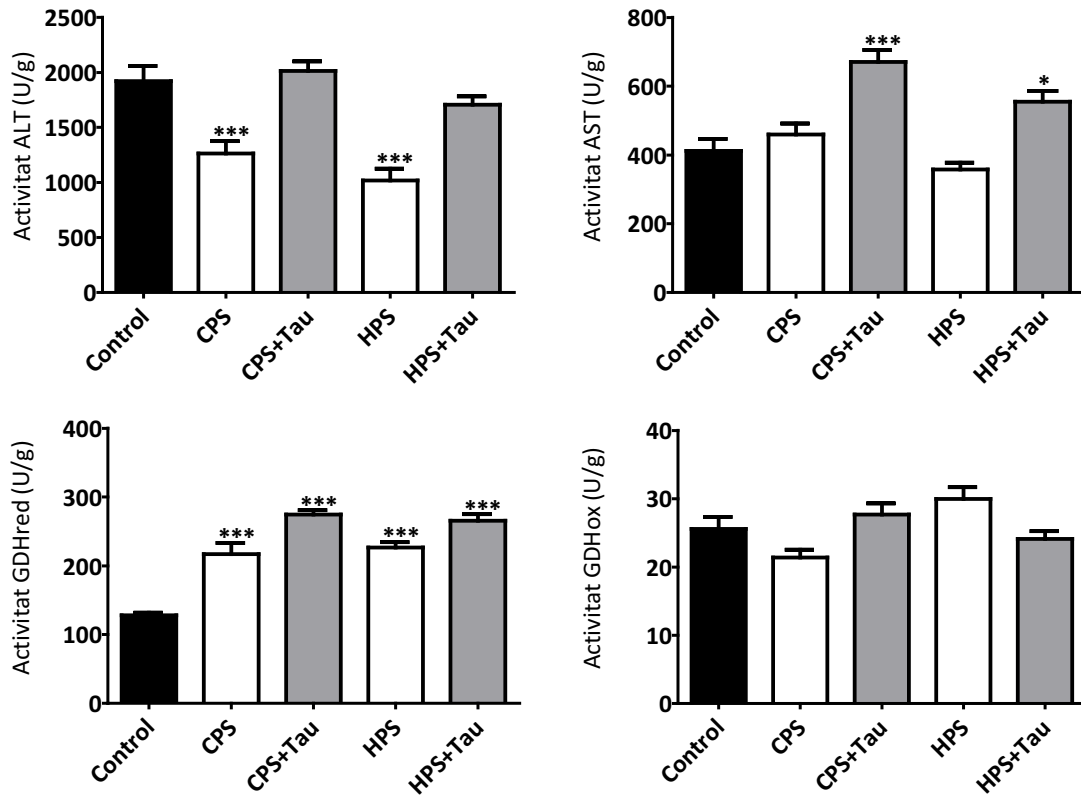


ANOVA de dues vies			
	Interacció	Tau	HPS
G6PDH	NS	+++	†
6PGDH	NS	+++	†

Figura 26. Activitat de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) i la 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) en el fetge dels diferents grups experimentals. La barra negra representa el valor mitjà (n=8) del grup FM, les barres blanques el valor mitjà dels grups sense suplement de taurina i les grises el valor mitjà dels grups amb suplement de taurina. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†,  $p < 0.05$ ; ††,  $p < 0.001$ ; †††,  $p < 0.0001$ ; NS, no significatiu).

La substitució de la farina de peix per concentrat proteic de soja va afectar significativament el metabolisme hepàtic dels aminoàcids (Figura 27). L'activitat ALT en les orades alimentades amb les dietes CPS o HPS va ser, respectivament, un 52 i un 89% menor a la del grup FM. Al contrari, l'activitat GDHred dels grups CPS i HPS va superar la del grup FM en un 70 i un 77%, respectivament. L'activitat AST i GDHox en les orades alimentades amb les dietes CPS o HPS no va diferir significativament de les alimentades amb la dieta FM.

La inclusió de taurina va augmentar l'activitat dels enzims del metabolisme dels aminoàcids, l'ALT fins a valors d'activitat similars a la del grup FM, i l'AST, la GDHred i la GDHox fins a nivells significativament superiors. L'hidrolitzat de soja, en canvi, va reduir significativament l'activitat ALT, AST i GDHox, però no la GDHred.



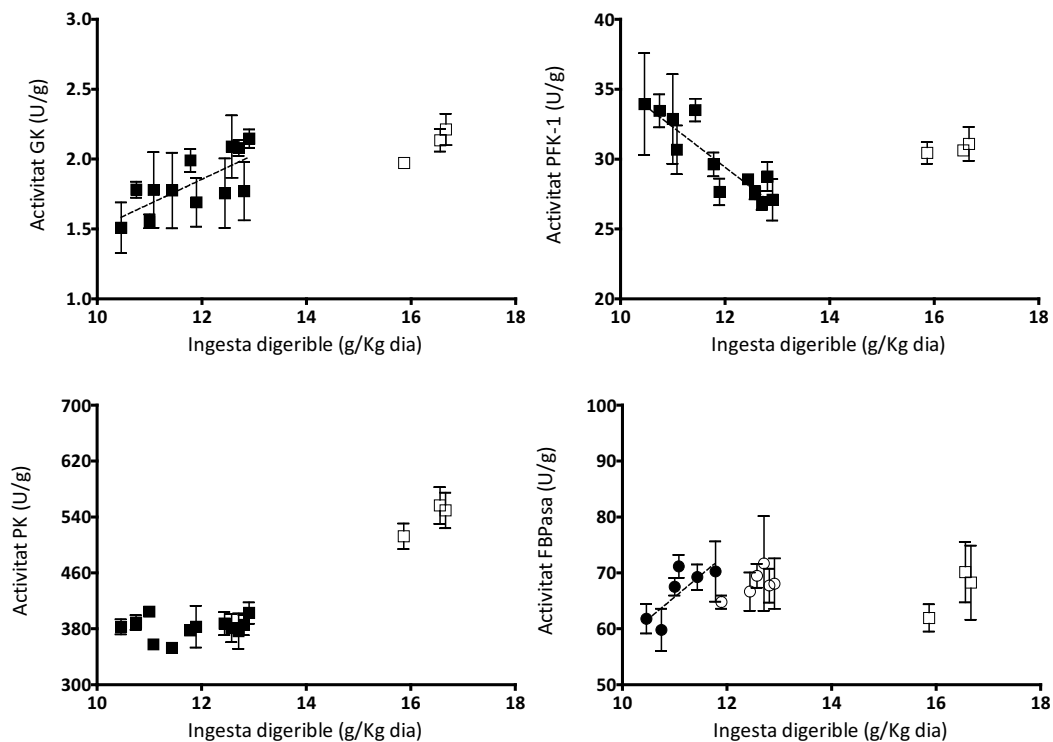
	ANOVA de dues vies			Test post-hoc			
	Interacció	Tau	HPS	CPS	CPS+Tau	HPS	HPS+Tau
ALT	NS	+++	++	-	-	-	-
AST	NS	+++	++	-	-	-	-
GDHred	NS	+++	NS	-	-	-	-
GDHox	+++	NS	NS	b	a	a	b

Figura 27. Activitat de l'alanina aminotransferasa (ALT), l'aspartat aminotransferasa (AST) i la glutamat deshidrogenasa en la direcció de reducció (GDHred) i oxidació (GDHox) en el fetge dels diferents grups experimentals. La barra negra representa el valor mitjà (n=8) del grup FM, les barres blanques el valor mitjà dels grups sense suplement de taurina i les grises el valor mitjà dels grups amb suplement de taurina. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives respecte el grup FM (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ++, p<0.001; +++, p<0.0001; NS, no significatiu).

### Relació entre activitat enzimàtica i ingesta

D'igual manera que a l'Experiment 2, es va avaluar la possible influència de la ingesta de matèria seca digerible en la modulació del metabolisme hepàtic de les orades. En aquest sentit, l'activitat dels diferents enzims no mostraren relació amb la ingesta de matèria seca digerible en orades alimentades amb la dieta FM. No obstant, sí s'han trobat tendències significatives en les orades alimentades amb proteïna vegetal.

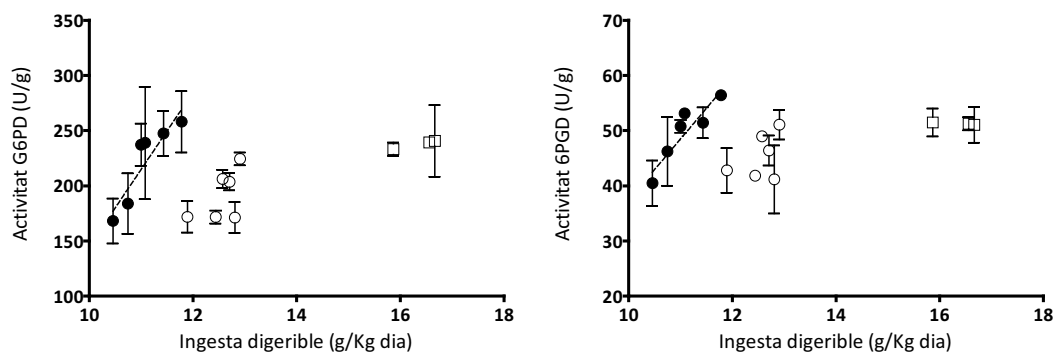
L'activitat GK al fetge de les orades va augmentar proporcionalment a la ingesta de matèria seca digerible (Figura 28). Contràriament, l'activitat PFK-1 es va mostrar inversament proporcional a la ingesta de matèria seca digerible. Activitat PK i ingesta de matèria seca digerible no mostraren cap tipus de correlació. L'activitat FBPasa augmentà proporcionalment a la ingesta de matèria digerible en aquelles orades que no van rebre el suplement d'hidrolitzat de proteïna de soja. Les orades alimentades amb aquest suplement alimentari no van exhibir una correlació significativa entre activitat FBPasa i ingesta de matèria seca digerible.



Enzim	Hidrolitzat proteïna soja	Model	r <sup>2</sup>	p
GK	Presència/Absència	y = -0.26 + 0.18 x	0.22	0.006
PFK-1	Presència/Absència	y = 64.0 - 2.88 x	0.57	<0.0001
FBPasa	Absència	y = -20.11 + 7.80 x	0.29	0.0313

Figura 28. Relació de l'activitat glucoquinasa (GK), fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), piruvat quinasa (PK) i fructosa bifosfatasa-1 (FBPasa) amb la ingesta de matèria seca digerible. Els quadres plens representen els valors d'activitat corresponents a les dietes vegetals, els quadres buits els corresponents a la dieta FM. En cas d'observar tendències diferents (ANCOVA de la pendent i la intercepció del model, p<0.05) segons la presència o absència d'hidrolitzat proteic de soja a la dieta (HPS), els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a cada condició s'analitzarien per separat. Els cercles plens representen els valors obtinguts amb dieta sense HPS, el cercles buits els obtinguts amb presència d'HPS a la dieta.

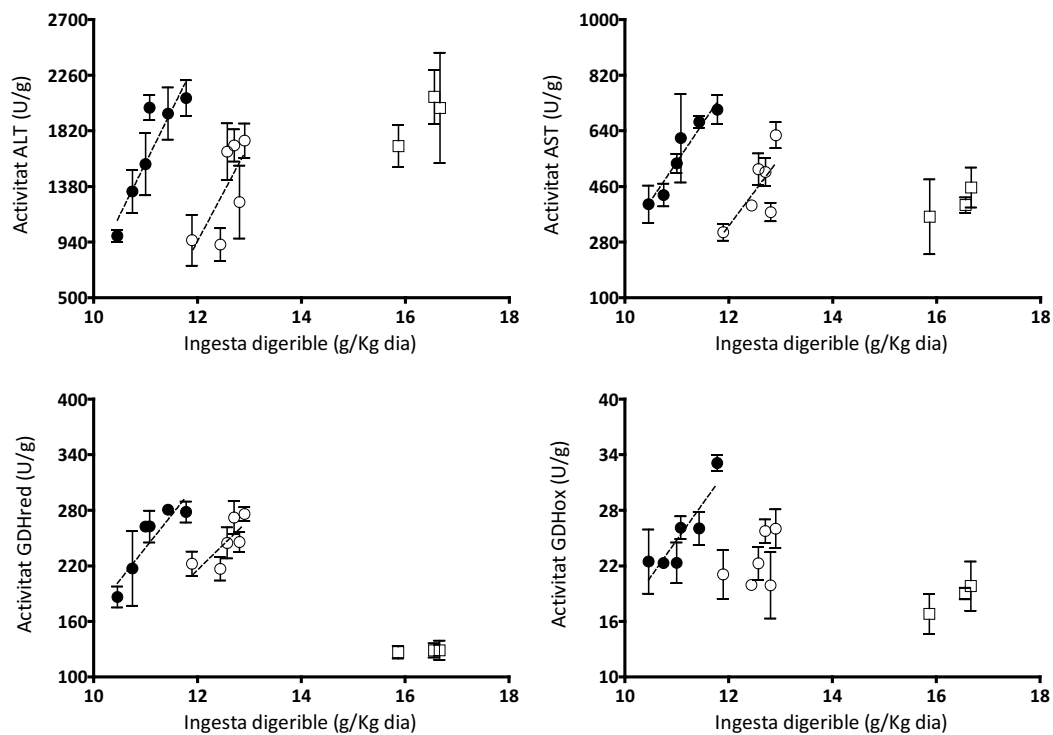
Tal i com es representa a la Figura 29, l'activitat G6PD i 6PGD va augmentar amb la ingesta de matèria seca digerible en aquelles orades alimentades sense el suplement d'hidrolitzat de proteïna de soja. Les orades alimentades amb el suplement no mostraren tendències significatives.



Enzim	Hidrolitzat proteïna soja	Model	r <sup>2</sup>	p
G6PD	Absència	y = -551.9 + 69.7 x	0.46	0.008
6PGD	Absència	y = -73.5 - 11.09 x	0.54	0.0029

Figura 29. Relació de l'activitat glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) i 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) amb la ingesta de matèria seca digerible. En cas d'observar tendències diferents (ANCOVA de la pendent i la intercepció del model, p<0.05) segons la presència o absència d'hidrolitzat proteic de soja a la dieta (HPS), els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a cada condició s'analitzarien per separat. Els cercles plens representen els valors obtinguts amb dieta sense HPS, el cercles buits els obtinguts amb presència d'HPS a la dieta.

Les activitats ALT, AST i GDHred augmentaren linealment amb la ingesta de matèria seca digerible, independentment de la inclusió o no de l'hidrolitzat de proteïna de soja (Figura 30). No obstant, els models descrits pels grups amb o sense suplement discorren paral·lels l'un de l'altre, de tal manera que, per un mateix nivell d'ingesta, les orades no alimentades amb l'hidrolitzat presentaren majors activitats ALT, AST i GDHred. Pel que fa a l'activitat GDHox, aquesta va augmentar proporcionalment a la ingesta de matèria seca digerible.



Enzim	Hidrolitzat proteïna soja	Model	r2	p
ALT	Absència	$y = -7565 + 830.0 x$	0.68	<0.0001
	Presència	$y = -8302 + 770.7 x$	0.39	0.009
AST	Absència	$y = -2212 + 250.0 x$	0.67	0.0001
	Presència	$y = -2357 + 224.1 x$	0.42	0.0063
GDHred	Absència	$y = -536.7 + 70.55 x$	0.64	0.0006
	Presència	$y = -441.6 + 54.75 x$	0.35	0.026
GDHox	Absència	$y = -61.71 + 7.86 x$	0.61	0.001

Figura 30. Relació de l'activitat alanina aminotransferasa (ALT), aspartat aminotransferasa (AST) i glutamat deshidrogenasa (GDHred i GDHox) amb la ingesta de matèria seca digerible. En cas d'observar tendències diferents (ANCOVA de la pendent i la intercepció del model,  $p < 0.05$ ) segons la presència o absència d'hidrolitzat proteic de soja a la dieta (HPS), els valors d'activitat enzimàtica obtinguts per a cada condició s'analitzarien per separat. Els cercles plens representen els valors obtinguts amb dieta sense HPS, el cercles buits els obtinguts amb presència d'HPS a la dieta.

#### 4.2.4. Discussió

##### 4.2.4.1. Efectes de la taurina sobre el rendiment nutricional de les orades

En aquesta tesi es presenten els primers resultats sobre els beneficis de la taurina en el rendiment nutricional d'orades alimentades amb dieta a base de proteïna vegetal. La inclusió de taurina en dietes amb una elevada proporció de proteïna vegetal havia estat capaç de restaurar els creixements de la truita irisada (Boonyoung et al., 2013; Gaylord et al., 2006; Gibson Gaylord et al., 2007), el déntol (Chatzifotis et al., 2008), la *Seriola quinqueradiata* (Khaoian et al., 2014; Nguyen et al., 2013; Takagi et al., 2008), el turbot (Wang et al., 2014; Yun et al., 2012), el llobarro (Brotons Martinez et al., 2004), la cobia (Lunger et al., 2007) i el *Pagrus major* (Takagi et al., 2011). A l'Experiment 1 la complementació amb taurina va millorar el creixement de juvenils d'orada alimentats amb una dieta amb el 90% de proteïna vegetal. S'evidencia, per tant, que la taurina és un nutrient essencial en el creixement dels juvenils d'orada. A partir dels resultats de creixement de l'Experiment 1 es va estimar un requeriment de taurina d'entre el 0.52 i el 0.91% de la dieta. Aquest requeriment és comparable al 0.52% de taurina en dieta estimat per a juvenils de *Pagrus major* (Matsunari et al., 2008), o al 0.99% estimat per *Atractoscion nobilis* (Jirsa et al., 2014). Alhora, aquest requeriment és superior al 0.2% estimat per al llobarro (Brotons Martinez et al., 2004) i inferior als de *Seriola quinqueradiata* (Matsunari et al., 2005) i *Paralichthys olivaceus* (Park et al., 2002), tots dos superiors a l'1%.

Les discrepàncies entre espècies envers el requeriment de taurina podrien ser degudes a diferències en la capacitat de sintetitzar taurina a partir de metionina i cisteïna (veure Introducció, Apartat 1.6.2). Tanmateix, el requeriment de taurina també podria estar condicionat per la composició en macro i micronutrients de la dieta, així com la presència de factors antinutricionals. Qi et al. (2012) observaren que el creixement dels juvenils de turbot deixava d'augmentar més enllà de l'1% d'inclusió de taurina en dieta amb caseïna, gelatina i un 10% de farina de peix. Per contra, segons els resultats de Wang et al. (2014), el creixement dels juvenils de turbot va ser major amb un 2.5% de taurina que amb un 1.5%. Aquesta discrepància podria ser deguda a la inclusió de farina de soja i farina de cacahuet a la dieta base utilitzada per Wang et al. (2014), o a l'absència de farina de peix a la formulació. Segons Kim et al. (1995), l'alimentació amb proteïna de soja en comptes de caseïna va reduir els nivells plasmàtics de taurina en gats. D'altra banda, s'ha comprovat en diferents espècies de peix que el requeriment de taurina disminueix al llarg de l'ontogènesi (Kim et al., 2003; Kim et al., 2008b; Matsunari et al., 2005; Qi et al., 2012). Tenint en compte tots aquests condicionants del

requeriment de taurina, resulta complicat establir un requeriment de taurina fix i específic per a cada espècie.

L'Experiment 1, malgrat les seves limitacions en quant a durada i grandària mostral, va proporcionar una base de coneixement útil per a dissenyar els dos experiments posteriors. Per als Experiments 2 i 3, partint de la base que es treballaria amb orades de menor pes (pesos inicials entorn a 6 i 12 grams, respectivament) que les de l'Experiment 1 (pesos inicials de 34-38 g), es va optar per una suplementació de taurina de l'1%. A aquest nivell d'inclusió, la taurina va millorar significativament el creixement dels juvenils d'orada en els Experiments 2 i 3. Es confirma llavors la necessitat d'incloure taurina en la dieta dels juvenils d'orada alimentats principalment o exclusivament amb proteïna vegetal.

La substitució de la farina de peix per ingredients d'origen vegetal acostuma a reduir el consum de pinso en peixos carnívors, probablement a conseqüència de l'empobriment de la palatabilitat de la dieta (Riche i Williams, 2011). Als tres experiments presents, la substitució total de la farina de peix va reduir significativament la ingesta diària de pinso per part de les orades. La taurina va estimular una major ingesta diària dels juvenils d'orada alimentats tant amb dieta enterament vegetal (Experiment 2 i 3), com amb dieta 90% proteïna vegetal i 10% proteïna de peix (Experiment 2). Aquest fet concorda amb estudis previs en altres espècies de peix, en els quals la taurina millorà la ingesta de dietes vegetals (Brotons Martinez et al., 2004; Chatzifotis et al., 2008; Jirsa et al., 2014; Matsunari et al., 2008; Park et al., 2002; Qi et al., 2012; Yun et al., 2012). A l'Experiment 1, la ingesta diària de pinso va augmentar linealment amb el nivell de taurina en dieta. En *Pagrus major* (família Sparidae, com l'orada), l'augment de la ingesta es va estabilitzar en arribar al 0.5% de taurina en dieta (Matsunari et al., 2008). En turbot, nivells de taurina superiors a l'1% resultaren excessius i reduïren el creixement i la ingesta en turbot (Qi et al., 2012).

Paral·lelament a l'augment en la ingesta, la taurina va millorar la FCR dels juvenils d'orada en tots tres experiments. Aquest fet suggereix que la millora del creixement en orades alimentades amb taurina no es deu únicament a l'increment en la ingesta, i evidencia encara més la necessitat d'incloure-la en dietes per orada amb un alt percentatge de proteïna vegetal. La taurina també ha demostrat augmentar la FCR en altres espècies com el déntol (Chatzifotis et al., 2008) i *Pagrus major* (Matsunari et al., 2008), a més d'altres teleostis com *Atractoscion nobilis* (Jirsa et al., 2014) i el turbot (Yun et al., 2012). Takagi et al. (2008) varen alimentar juvenils de *Seriola quinqueradiata* amb dieta de soja complementada amb un potenciador del



sabor (farina de krill), de manera que, amb taurina o sense, la dieta fos igual d'atractiva per als peixos. Finalment, observaren que la inclusió de taurina millorà el creixement i la FCR dels juvenils, tot reduint la ingesta diària relativa al pes dels peixos. D'altra banda, els resultats de FCR a l'Experiment 1 van permetre calcular un requeriment de taurina en dieta del 0.92%, molt proper al requeriment calculat en base al creixement, i que valida l'elecció d'un 1% de taurina per complementar les dietes dels Experiments 2 i 3. En sobrepassar l'1% de taurina en dieta, els valors de FCR en l'Experiment 1 van empitjorar a conseqüència de l'estancament del creixement i l'augment de la ingesta.

#### 4.2.4.2. Efectes de la taurina sobre la digestibilitat de la matèria seca, la proteïna i el carboni de la dieta

És ben conegut que els ingredients d'origen vegetal presenten components poc digeribles i antinutrients que afecten negativament a la digestibilitat de la dieta (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007). Aquest fet es reflecteix en els resultats de digestibilitat aparent als Experiments 2 i 3. Segons aquests, la digestibilitat de la matèria seca, del carboni i del fòsfor de la dieta varen ser reduïts en substituir la farina de peix per ingredients vegetals. El perjudici sobre la digestibilitat de la proteïna no va ser tan marcat. En aquest sentit, les proteïnes de la soja i el gluten del blat i el blat de moro són conegudes per la seva elevada digestibilitat (Tibbetts et al., 2006). D'aquest fet se'n dedueix que l'afectació sobre la digestibilitat general de la dieta (la matèria seca) vindria donada en major mesura pels greixos i carbohidrats de la dieta.

La taurina participa en la digestió en conjugant-se amb àcids biliars per formar sals biliars, necessàries per a la digestió i l'absorció de lípids i vitamines liposolubles (Chiang, 2009; Hofmann i Hagey, 2008). En *Sebastes schlegeli* i *Paralichthys olivaceus*, l'àcid taurocòlic, resultat de la conjugació de l'àcid còlic amb la taurina, representa més del 95% dels àcids biliars conjugats (Kim et al., 2014; Kim et al., 2008a). Alhora, les sals biliars també s'uneixen a les proteïnes a la llum intestinal i afavoreix l'acció de les proteases. Amb tot, hi ha pocs estudis sobre els efectes de la taurina a la digestibilitat de la dieta en peixos. La inclusió de taurina va afectar distintament la digestibilitat aparent de la matèria seca i el carboni de la dieta segons l'experiment. A l'Experiment 3, la taurina va reduir la digestibilitat aparent de la matèria seca i el carboni de la dieta. En canvi, a l'Experiment 2, la taurina va augmentar la digestibilitat d'aquests components a la dieta amb proteïna exclusivament vegetal (dieta 100T). En el mateix experiment, però, la taurina no va afectar la digestibilitat de la matèria seca, la proteïna i el carboni de la dieta amb un 7% de farina de peix (dieta 90T). Així doncs, els diferents

ingredients que conformen la dieta semblen determinar l'acció de la taurina sobre la digestibilitat.

La principal diferència de formulació entre les dietes dels dos experiments rau en la proporció de concentrat proteic de soja. Mentre que les dietes de l'Experiment 2 contenen, a més de la proteïna de soja, gluten de blat i blat de moro; a les dietes de l'Experiment 3 el concentrat proteic de soja era l'única font de proteïna. A diferència dels cereals, la soja és pobre en midó però abundant en altres polisacàrids poc o gens digeribles (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007). Aquests polisacàrids, anomenats comunament *Non-Starch Polysaccharides* o NSPs, dificulten l'acció dels enzims digestius en unir-se als àcids biliars i en augmentar la viscositat del contingut intestinal. En déntols s'ha observat que, a major contingut de concentrat proteic de soja en la dieta, menor era la promoció per part de la taurina de l'activitat lipasa als cecs pilòrics (Chatzifotis et al., 2008). Malgrat el tractament al que és sotmesa la soja durant el procés d'elaboració del concentrat proteic, el producte final conserva nivells de NSPs superiors als dels glúten de blat i de blat de moro (Taula 22). Per tant, és probable que les orades de l'Experiment 3 haguessin ingerit una major quantitat de NSPs, els quals podrien haver anul·lat el possibles efectes beneficiosos de la taurina en la digestió de la dieta. La soja també presenta nivells elevats de saponines, compostos amb una coneguda activitat antinutricional. No obstant, és normalment absent a concentrats proteics de soja rentats amb aigua i alcohol (Collins et al., 2013), com l'utilitzat en els presents experiments (veure fitxa tècnica en Annex).

Taula 22. Concentracions (% pes sec) d'àcid fític, midó i NSPs solubles i insolubles al concentrat proteic de soja i als glúten de blat i blat de moro.

	Concentrat proteic de soja	Gluten de blat	Gluten de blat de moro	Referència
Àcid fític (% del fòsfor final)	1.0 - 2.2 (62)	2.1 (60 - 80)	0.29 (69 )	Reddy, 2002; Viveros et al., 2000
Midó	6.9	2.7 - 8.9	20.7	Knudsen, 1997; Wang et al., 2003
NSP solubles	5.9 - 8.1	Blat: 1.6	0.6	
NSP insolubles	6.7 - 19.9	1.0 - 1.7	1.4	

La suplementació de taurina no va millorar la digestibilitat de la proteïna de les dietes emprades als dos experiments. De fet, a les dietes no complementades amb farina de peix o hidrolitzat de soja, la taurina va arribar a reduir la digestibilitat de la proteïna. Igual que amb la digestibilitat de la matèria seca i el carboni dietètic, aquests resultats suggereixen la presència d'un antinutrient. No obstant, en aquest cas, el perjudici sobre la digestió és independent a la

proporció de concentrat proteic de soja. Per tant, totes tres fonts de proteïna vegetal contindrien aquest antinutrient. D'acord a la literatura i a la informació facilitada pel fabricant del concentrat proteic de soja (Archer Daniels Midland Company, veure Annex), els tres ingredients vegetals emprats presentarien nivells baixos o inexistents d'inhibidors de proteases (Apper-Bossard et al., 2013; Moyano López et al., 1999). No obstant, aquests ingredients sí contindrien quantitats similars d'àcid fític (Taula 22), el qual podria disminuir la disponibilitat de la proteïna dietètica en formar complexos fitat-proteïna (Francis et al., 2001). En reforç d'aquest supòsit, Sajjadi i Carter (2004) indicaren que la suplementació d'àcid fític va reduir la digestibilitat de la proteïna de la dieta sense haver estat afectada l'activitat de la tripsina en els cecs pilòrics.

Malgrat els pobres resultats de digestibilitat, l'estímul de la ingesta per part de la taurina va incrementar la quantitat de matèria seca, proteïna i carboni finalment digerida i assimilada per les orades. Certament, aquest fet hauria contribuït de forma significativa a l'augment del creixement de les orades alimentades amb el suplement de taurina. No obstant això, depenent de la magnitud de l'augment en la ingesta de pinso, la ineffectivitat de la taurina envers la digestibilitat de la proteïna de la dieta conduí a una major excreció de nitrogen al medi a través de les femtes dels animals. Així, les orades alimentades amb la dieta 90T (Experiment 2) i la dieta CPS+Tau presentaren majors pèrdues fecals de proteïna que la resta de grups, incloent-hi les orades alimentades amb dieta FM. La digestibilitat de la proteïna de la dieta és un aspecte important en la producció de peixos en captivitat, no tan sols a nivell de rendibilitat econòmica, sinó també com a font d'impacte en el medi natural. Una major descàrrega de compostos nitrogenats a través de les femtes pot comprometre la qualitat de l'aigua circumdant, així com l'estructura i biodiversitat de la comunitat bentònica adjacent als cultius.

#### 4.2.4.3. Efectes de la taurina sobre la digestibilitat del fòsfor de la dieta

Tant a l'Experiment 2 com al 3 la taurina va millorar la digestibilitat del fòsfor dietètic. La taurina no només participa en la conjugació dels àcids biliars, sinó que també promouria la síntesi d'àcids biliars en el fetge de peixos (Kim et al., 2014; Yun et al., 2012) i rates (Yokogoshi et al., 1999). Els àcids biliars faciliten l'absorció de vitamines liposolubles a l'intestí, entre elles la vitamina D. Al seu torn, la vitamina D regula l'expressió de proteïnes transportadores de fosfat sodi-dependents, principal mecanisme d'absorció de fòsfor en l'intestí (Lock et al., 2010). Tot i que no hi ha estudis previs en peixos sobre l'efecte de la taurina en la digestibilitat del fòsfor dietètic, la taurina havia mostrat millorar la retenció del fòsfor dietètic a *Trachinotus ovatus* alimentat amb un 80% de proteïna vegetal (Wu et al., 2014). D'altra banda, la

suplementació o la injecció intraperitoneal de vitamina D<sub>3</sub> i calcitriol (la forma activa de la vitamina D<sub>3</sub>) ha demostrat elevar els nivells plasmàtics de fòsfor en el peix gat *Clarias batrachus* (Swarup et al., 1984), l'anguila americana (Fenwick et al., 1984) i la carpa (Swarup et al., 1991), així com la retenció de fòsfor en el peix gat *Pelteobagrus fulvidraco* (Zhu et al., 2015). En truita irisada, un suplement d'àcids biliars també va elevar els nivells de fòsfor en plasma (Yamamoto et al., 2007). No obstant, en cap d'aquests estudis la vitamina D<sub>3</sub> o els àcids biliars van millorar significativament la digestibilitat del fòsfor. L'eficàcia d'aquests suplementes podria estar condicionada per la proporció d'ingredients vegetals a la dieta. A l'estudi amb *Trachinotus ovatus*, si bé la taurina va millorar la retenció de fòsfor de la dieta amb un 80% de proteïna vegetal, no va tenir efecte en dietes amb el 40 o el 0% (Wu et al., 2014). En aquest sentit, la suplementació de vitamina D<sub>3</sub> es va mostrar més efectiva millorant la retenció de fòsfor a truites irisades alimentades amb nivells inferiors de fòsfor assimilable (Coloso et al., 2001).

La baixa biodisponibilitat del fòsfor fític es compta entre les múltiples causes del baix rendiment nutricional dels peixos alimentats amb ingredients d'origen vegetal (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007). Per incrementar la ingesta de fòsfor assimilable dels peixos, els investigadors han proposat la complementació de la dieta amb fòsfor inorgànic com el fosfat dicàlcic (Lee et al., 2010), o l'ús de fitasa per a hidrolitzar l'àcid fític present als ingredients vegetals (Dalsgaard et al., 2009; Vielma et al., 2000; Vielma et al., 2002; Zhu et al., 2014; Zhu et al., 2015). Aquestes dues pràctiques han demostrat millorar el creixement i l'eficiència alimentària en peixos. Així doncs, aquests antecedents apunten que la millora en la digestibilitat del fòsfor observada en els Experiments 2 i 3 hauria contribuït a l'augment del creixement de les orades tractades amb taurina.

#### 4.2.4.4. Efectes de la interacció de la taurina amb la farina de peix sobre la nutrició de les orades

La farina de peix constitueix una font de proteïna de qualitat per als peixos, ja sigui pel seu alt contingut proteic, l'excel·lent perfil d'aminoàcids essencials o per la seva elevada digestibilitat. Proporcions de farina de peix en dieta del 18% (un 25% de la proteïna de la dieta) havien demostrat millorar el creixement de les orades respecte d'una alimentació exclusivament a base de proteïna vegetal (Gómez-Requeni et al., 2004; Sitjà-Bobadilla et al., 2005). A l'Experiment 2, però, la inclusió d'un 7% de farina de peix a la dieta (el 10% de la proteïna) va millorar el creixement i la ingesta de les orades en comparació amb la dieta formulada exclusivament amb proteïna vegetal. Alhora, el suplement de farina de peix va

promoure l'acumulació de proteïna en el cos de les orades, tal com indiquen l'augment de la proporció de proteïna corporal i dels valors de retenció proteica. Per tant, els nostres resultats evidencien l'elevat valor nutricional de la farina de peix per al creixement de l'orada.

Més enllà dels seus efectes individuals, el grau de substitució de farina de peix per proteïna vegetal a l'Experiment 2 va condicionar la magnitud dels efectes de la taurina sobre la nutrició de les orades. La inclusió d'un 7% de farina de peix a la dieta va accentuar la millora del creixement, la FCR i la retenció proteica per part de la taurina. Ara bé, la interacció més destacable entre la taurina i la presència o no de farina de peix a la formulació de la dieta s'observà en metabolisme lipídic.

Segons els Experiments 2 i 3, l'addició de taurina en dietes formulades exclusivament amb proteïna vegetal no tan sols no resulta en l'acumulació de greixos corporals, com seria d'esperar arran de l'augment en la ingesta (Cui et al., 1996; Cui i Wootton, 1988; Storebakken i Austreng, 1987), sinó que redueix clarament els greixos corporals de les orades. En aquest sentit, la taurina ha demostrat promoure la síntesi d'àcids biliars en el fetge de peixos (Yun et al., 2012) i rates (Yokogoshi et al., 1999) en incrementar l'activitat i l'expressió gènica de la colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1, EC 1.14.13.17), enzim limitant de la síntesi d'àcids biliars a partir del colesterol. Així, igual que les orades dels presents experiments, la suplementació de taurina en dieta amb alt contingut de proteïna vegetal va reduir la proporció de greixos corporals als juvenils de turbot (Yun et al., 2012). Aquest fet suggereix un augment de l'activitat lipolítica per a satisfer la major demanda d'acetil CoA per a la síntesi de colesterol i d'àcids biliars. La reducció en dels nivells de triglicèrids en sèrum i en fetge observada a les orades dels Experiments 2 i 3 reforçarien aquesta hipòtesi.

La promoció de la lipòlisi per part de la taurina seria contrarestada per la inclusió d'un 7% de farina de peix a la dieta. Als Experiments 1 i 2, la suplementació d'un 1% de taurina en dieta amb un 90% de proteïna vegetal va resultar en l'augment dels nivells de triglicèrids al sèrum de les orades. Així mateix, a les orades de l'Experiment 2, la taurina va promoure una major deposició de greixos corporals. Aquest canvi de tendència respecte les dietes 100% proteïna vegetal assenyala que la farina de peix contribuiria a restaurar el patró normal de resposta del metabolisme lipídic envers a la major ingesta d'aliment. Per contra, la suplementació d'un 2% de taurina a l'Experiment 1 va reduir els nivells de triglicèrids al sèrum i al fetge de les orades. Aquest nou canvi de tendència té com a origen més probable la promoció de la síntesi d'àcids biliars per part de la taurina. Així doncs, l'acumulació de reserves

de greix als peixos sembla governar-se per dos efectes contraposats: l'increment promogut per la ingesta i el descens per acció de la taurina; tots dos condicionats per la presència o no de farina de peix a la dieta.

A l'Experiment 2, la inclusió d'un 7% farina de peix va resultar en la reducció de la digestibilitat aparent de determinats nutrients, depenent també de la presència o no de taurina en la dieta. Tal i com demostraren Albrektsen et al. (2006) i Mundheim et al. (2004), la substitució de la farina de peix per ingredients vegetals redueix la digestibilitat de la dieta. Per tant, resulta poc probable que la inclusió de farina de peix perjudiqués la digestió de la dieta. No obstant això, aquests dos estudis anteriors dissenyaren dietes amb majors diferències en la proporció de farina de peix. Per tant, lluny de contradir els resultats obtinguts per altres investigadors, els nostres resultats indicarien que un 7% de farina de peix no va ser suficient per a millorar la digestibilitat de la dieta, però sí la ingesta. A conseqüència d'això, la digestibilitat aparent de la dieta pot veure's reduïda.

Tenint en compte la baixa proporció de farina de peix inclosa a la dieta, uns efectes tan marcats sobre la nutrició de l'orada, suggereixen la presència d'altres nutrients, apart de la taurina, que condicionarien la nutrició de les orades. No sembla probable que la substitució d'un 7% de farina de peix comprometés la disponibilitat d'algun mineral o aminoàcid essencial en les dietes 100 i 100T, doncs no va alterar el contingut en cendres o els perfils d'aminoàcids, ni va afectar negativament la digestibilitat de la proteïna ni del fòsfor dietètic. Per tal que una petita quantitat de farina de peix condicioni el creixement i la nutrició de les orades, el component o components responsables han de ser, o bé prou abundants a la farina de peix, o bé biològicament molt actius, o totes dues coses alhora.

Aquests factors nutricionals per identificar podrien formar part de la fracció soluble en aigua de la farina de peix, en la qual abunden la mateixa taurina, proteïnes de baix pes molecular, pèptids, aminoàcids lliures, nucleòtids i altres compostos nitrogenats (Aksnes, 2005). Kousoulaki et al. (2009) observaren que salmons atlàntics alimentats amb dietes similars a la dieta 90 milloraren el seu creixement en complementar la dieta amb solubles de farina de peix. Malgrat que el creixement dels salmons s'ajustava positivament amb els nivells de taurina i hidroxiprolina a la dieta, el disseny de l'experiment no va permetre establir una relació causal. Posteriorment, Kousoulaki et al. (2012) va observar que el creixement dels salmons millorava en ser alimentats amb dieta enriquida amb pèptids solubles menors de 1000 Da (daltons). En el mateix estudi, la suplementació d'un 0.15% de taurina o hidroxiprolina

no va afavorir el creixement dels salmons. Tal i com s'ha assenyalat prèviament (Apartat 4.2.4.1), els requeriments de taurina en peixos podrien variar segons els ingredients amb els quals es formula la dieta. Així doncs, les quantitats suplementades de taurina i hidroxiprolina podrien haver estat insuficients per als salmons. A tall d'exemple, als nostres experiments les dietes vegetals suplementades amb taurina presentaren concentracions d'aquest compost dues vegades superiors als de la dieta FM (un 2% i un 1%, respectivament).

#### 4.2.4.5. Efectes de l'hidrolitzat de soja sobre la nutrició de l'orada

Un altre factor que podria limitar el creixement dels peixos serien els baixos nivells d'aminoàcids lliures, pèptids i proteïnes de baix pes molecular en els ingredients vegetals. A l'Experiment 3, independentment de la taurina, la inclusió d'un 6.5-6.6% d'hidrolitzat de proteïna de soja va millorar significativament el creixement i la FCR dels juvenils d'orada. L'hidrolitzat va incrementar la digestibilitat i la ingesta de matèria seca, proteïna i carboni, i en combinació amb la taurina, també la digestibilitat i la ingesta de fòsfor. L'hidrolitzat de proteïna de soja no havia estat estudiat prèviament com a suplement en dietes a base de proteïna vegetal, però sí com a font proteica substitutiva de la farina de peix. Així, juvenils de *Platichthys olivaceus* presentaren majors valors de creixement, ingesta i eficiència alimentària en substituir un 20% de la farina de peix de la dieta per un hidrolitzat de proteïna de soja (Mamauag et al., 2011). En un altra espècie del mateix gènere, *Platichthys stellatus*, els beneficis en el creixement, la ingesta i l'eficiència alimentària es van estendre fins el 50% de substitució de farina de peix per hidrolitzat de proteïna de soja (Song et al., 2014). És més, en aquest darrer estudi, l'hidrolitzat de proteïna va ser capaç de reemplaçar el 85% de la farina de peix sense afectar negativament al creixement dels animals.

Com a l'Experiment 2, la inclusió de taurina a les dietes de l'Experiment 3 va augmentar la retenció proteica dels juvenils d'orada. L'hidrolitzat de proteïna de soja, tot i millorar el creixement de les orades, no va tenir efecte sobre la retenció de proteïna en reduir la proporció de proteïna corporal. D'altra banda, la inclusió de taurina o d'hidrolitzat per separat va millorar la retenció de greixos. No obstant, la combinació de tots dos additius no va donar com a resultat la suma dels seus efectes individuals. Això es va deure a efectes antagònics de la taurina i l'hidrolitzat en la proporció de greix corporal de les orades. L'hidrolitzat de proteïna de soja va promoure l'acumulació de greix corporal en absència de taurina a la dieta. La taurina, en canvi, va reduir la proporció de greix corporal, en especial en presència d'hidrolitzat. D'acord amb aquests resultats, la suplementació de l'hidrolitzat en absència de taurina va resultar en majors nivells de triglicèrids en sèrum. En canvi, els nivells sèrics de

triglicèrids a les orades alimentades amb un suplement de taurina no van variar respecte dels del grup CPS, malgrat haver ingerit una major quantitat de dieta. Seguint una tendència similar, els triglicèrids hepàtics van augmentar amb la inclusió de l'hidrolitzat i disminuir amb la de taurina.

#### 4.2.4.6. Rendiment nutricional de les orades alimentades amb dieta vegetal envers el control amb farina de peix

Els presents experiments demostren que la taurina millora el creixement de les orades alimentades majoritàriament o exclusivament amb proteïna vegetal. No obstant, en ser comparats aquests creixements amb els de les orades alimentades amb dieta a base de farina de peix (dieta FM, Experiments 2 i 3), es constata que aquesta millora no va ser suficient per a restaurar completament el creixement dels peixos. Les dietes vegetals formulades per aquesta tesi plantejaven la substitució total de la farina de peix, un objectiu difícil però coherent amb les necessitats del sector aquícola. En aquest sentit, la taurina ha demostrat ser un additiu alimentari amb un gran potencial per a assolir aquesta fita.

El major creixement de les orades del grup FM vindria donat per un ús més eficient dels nutrients de la dieta, tal i com indiquen els valors de FCR, eficiència proteica i retenció de greixos. Així mateix, la major digestibilitat de la dieta FM hauria afavorit en gran mesura el creixement i l'eficiència alimentària de les orades. Una elevada digestibilitat seria facilitada pel menor contingut en fibra alimentària i antinutrients, així com per un major contingut en fòsfor més fàcilment assimilable. D'acord amb això, les diferències de digestibilitat més acusades entre la dieta FM i les dietes vegetals es van trobar al carboni de la dieta i al fòsfor. Com és lògic, les ingestes de matèria seca, carboni i fòsfor digeribles foren millors a les orades alimentades amb la dieta FM.

Pel que fa a les deficiències nutricionals de les dietes, un defecte recurrent a les dietes formulades amb proteïna vegetal és el dèficit d'un o diversos aminoàcids essencials (AAE). En els nostres experiments, les dietes vegetals foren complementades amb metionina i lisina, els dos aminoàcids normalment més deficitaris en cereals i lleguminoses. D'aquesta manera es varen assegurar uns perfils d'AAE ajustats a les demandes nutricionals de l'orada estimades per Kaushik (1998). Certament, les deficiències nutricionals de les dietes aquí formulades no semblen tenir origen en la component proteica, sinó en els carbohidrats i els greixos.



Després de l'empobriment del rendiment alimentari, el perjudici més significatiu causat per la substitució de la farina de peix fou la reducció de reserves de greix corporal i glicogen hepàtic. El baix contingut en glicogen dels grups d'orades alimentades amb dieta vegetal és coherent amb la proporció de midó afegit en aquests dietes, a saber, dues vegades inferior al de la dieta FM. Tal i com va exposar Metón et al. (1999), el contingut de glicogen guarda directa relació amb la quantitat de carbohidrats a la dieta. No obstant, valors tan baixos de glicogen hepàtic (fins a cinc cops inferiors) podrien ser, en gran mesura, un reflex de l'estatus nutricional de les orades.

Pel que fa a les reserves de greix corporal i els nivells de triglicèrids en sèrum, la seva reducció és un tret comú en orades (Gómez-Requeni et al., 2004; Kissil et al., 2000) i en altres peixos (Deng et al., 2006; Riche i Williams, 2011; Song et al., 2014) alimentades amb elevades proporcions d'ingredients vegetals. En explicar les possibles causes cal distingir dos efectes que freqüentment s'observen amb altes substitucions de farina de peix per ingredients d'origen vegetal. Per una banda, l'alt contingut de NSPs (*Non-Starch Polysaccharides*) a la soja, els quals se'ls associa amb la reducció de la digestibilitat dels greixos (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007). Aquests compostos segresten els àcids biliars i altres esteroides a la llum intestinal i dificulten l'emulsió dels greixos. És més, segons l'estudi de Kortner et al. (2013) la farina de soja hauria reduït l'expressió de gens codificants de transportadors de colesterol i àcids biliars a l'intestí distal de salmons

Per una altra banda, la substitució total de farina de peix indueix l'expressió d'enzims clau en la  $\beta$ -oxidació i la síntesi de colesterol a la truita irisada (Panserat et al., 2009; Vilhelmsson et al., 2004). És probable que ambdós processos estiguin estretament relacionats, atès que els NSPs augmenten l'excreció de colesterol i àcids biliars amb les femtes, la qual cosa podria derivar en la promoció de la lipòlisi hepàtica per a sintetitzar nou colesterol. El conegut efecte hipocolesterolèmic dels ingredients vegetals (en especial els de soja) en peixos (Kaushik et al., 1995; Romarheim et al., 2008; Sitjà-Bobadilla et al., 2005; Song et al., 2014) concordaria amb aquest raonament.

#### 4.2.4.7. Els efectes de la taurina sobre el metabolisme intermediari al fetge de les orades

L'activitat GK en el fetge de les orades va augmentar proporcionalment amb el nivell de taurina de la dieta (Experiment 1). Aquesta correlació concorda amb els valors d'ingesta d'aliment. D'igual manera, l'estimulació de la ingesta de matèria seca digerible per la taurina està estretament relacionada amb l'increment de l'activitat GK als Experiments 2 i 3. En estudis previs en orada, l'activitat GK havia demostrat adequar-se en proporció a la ració d'aliment subministrada (Caseras et al., 2000). A juvenils de *Totoaba macdonaldi*, la inclusió de taurina va resultar en una major activitat hexoquinasa (HK; EC 2.7.1.1), sense haver afectat les taxes d'ingesta d'aliment (Bañuelos-Vargas et al., 2014). Els nivells glucèmics a les orades dels presents experiments suggereixen una acció específica de la taurina, diferent a la pròpia de la ingesta. Així, a les orades de l'Experiment 1, la glucèmia va augmentar paral·lelament a la ingesta en incloure fins a un 1% de taurina a la dieta. No obstant, en afegir un 2% de taurina, la glucèmia a les orades es va reduir, malgrat l'augment de la ingesta. Aquest mateix efecte es va reproduir a les orades dels Experiments 2 i 3, on la inclusió d'un 1% de taurina reduí significativament la glucèmia, alhora que augmentà la ingesta. Tot i que seria convenient avaluar aïlladament l'efecte de la taurina sobre la regulació de la GK amb racions fixes d'aliment, estudis previs han demostrat un efecte hipoglucèmic de la taurina en mamífers (Franconi et al., 2004).

De la mateixa manera que la GK, s'ha observat que l'activitat PFK-1 i PK al fetge de l'orada augmenta amb la ració d'aliment (Metón et al., 1999). Als Experiments 2 i 3, les orades alimentades amb la dieta FM van mostrar correlacions positives entre l'activitat GK, PFK-1 i PK amb la ingesta de matèria seca digerible. Tanmateix, el coneixement dels efectes de la ració sobre el metabolisme de la glucosa dels peixos no s'estén a dietes a base de proteïna vegetal. Als nostres experiments, l'augment de l'activitat GK amb la taurina no va resultar en majors activitats PFK-1 i PK. De fet, l'activitat PFK-1 va disminuir amb la inclusió de taurina. Segons aquests resultats, la glucòlisi jugaria un paper menor en la metabolització de la glucosa al fetge de les orades alimentades amb dieta vegetal. Es descartaria, llavors, aquesta via com a receptora de l'excés de glucosa fosforilada per la GK. Per tant, l'enzim GK no actuaria com a iniciadora del procés de conversió de glucosa en piruvat, sinó com a subministradora de glucosa-6-fosfat per a altres vies metabòliques.

La disminució dels nivells hepàtics de glicogen amb la taurina a les orades alimentades exclusivament amb proteïna vegetal descarta la glicogènesi com a destí per a l'excés de glucosa-6-fosfat (Experiment 2 i 3). Encara més, el contingut de glicogen hepàtic de les orades

alimentades amb un 90% de proteïna vegetal, malgrat augmentar en incloure un 1% de taurina en la dieta (Experiment 1 i 2), es va reduir amb un 2% de taurina (Experiment 1). Bañuelos-Vargas et al. (2014) van detectar un descens en els nivells de glicogen hepàtic de *Totoaba macdonaldi* a conseqüència de la inclusió de taurina a la dieta. Els autors atribueixen la reducció de la síntesi de glicogen a la promoció de l'oxidació de la glucosa-6-fosfat mitjançant l'activitat G6PD. En línia amb aquesta hipòtesi, a l'Experiment 3 la suplementació de taurina va resultar en majors activitats G6PD i 6PGD, la qual cosa assenyala la via de la pentosa fosfat com un dels possibles destins de la glucosa-6-fosfat no oxidada pels enzims glucolítics.

La fase oxidativa de la via de la pentosa fosfat és la principal productora de NADPH al citosol i és normalment associada a la síntesi de lípids (Wamelink et al., 2008). A l'Experiment 3, però, l'augment de l'activitat G6PD i 6PGD amb la taurina va concórrer amb el descens dels nivells de triglicèrids en sèrum i fetge, així com de la proporció de greix corporal de les orades. Contràriament, a l'Experiment 2 l'activitat G6PD i 6PGD disminuïren amb la suplementació de la taurina. Paral·lelament, tal i com s'ha discutit anteriorment (Apartat 4.2.4.4), la taurina va reduir els nivells de triglicèrids en sèrum i fetge, així com la proporció de greix corporal de les orades. En suma, els nostres resultats evidencien que els canvis en l'activitat G6PD i 6PGD per part de la taurina no obeeixen a la demanda de NADPH per a la síntesi de lípids, tal i com s'esperaria en orades alimentades amb dietes a base de farina de peix.

El NADPH no emprat en la síntesi d'àcids grassos podria haver estat derivat a la síntesi d'altres metabòlits la disponibilitat dels quals estaria més compromesa. La inclusió de farina i proteïna de soja a la dieta dificulta la reabsorció del colesterol i dels àcids biliars a l'intestí distal de peixos (Kaushik et al., 1995; Kortner et al., 2013; Nguyen et al., 2011). D'aquesta manera, es limitaria el seu posterior reaprofitament en el fetge i obligaria a invertir més NADPH i acetil-CoA en la síntesi *de novo* de colesterol i àcids biliars. Aquestes demandes podrien ser satisfetes per la via de la pentosa fosfat (Wamelink et al., 2008) i la degradació dels àcids grassos (Panserat et al., 2009). La suplementació de taurina, en ser promotora de la síntesi d'àcids biliars en fetge (Kim et al., 2014; Yun et al., 2012), contribuiria a l'augment de la demanda de NADPH i acetil-CoA. Aquesta hipòtesi concordaria amb el descens del nivell de lípids corporals de les orades, així com amb l'augment de l'activitat G6PD i 6PGD a les orades de l'Experiment 3, però contrastaria amb el descens de l'activitat G6PD i 6PGD a les orades dels Experiments 1 i 2. Així doncs, tot i que la literatura i els resultats aquí presentats evidencien que els ingredients vegetals i la taurina promouen la lipòlisi i la síntesi d'àcids biliars, no és possible establir una relació clara entre aquests ajustos i la via de la pentosa fosfat.

No poden descartar-se altres processos metabòlics, amb un alt requeriment de NADPH, que afectarien la regulació de la via de la pentosa fosfat, i compliquen la interpretació dels resultats d'activitat G6PD i 6PGD. Estudis previs realitzats en orada i altres peixos indiquen que la inclusió d'ingredients vegetals a la dieta incrementa la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS, *Reactive Oxygen Species*) i indueix l'expressió d'enzims amb activitat antioxidant per tal d'evitar possibles danys cel·lulars (Bañuelos-Vargas et al., 2014; Olsvik et al., 2011; Sitjà-Bobadilla et al., 2005; Zheng et al., 2012). L'activitat d'un d'aquests enzims, la glutatió peroxidasa (GPX, EC 1.11.1.9), depèn del subministrament de NADPH per a mantenir els nivells cel·lulars de glutatió reduït amb el qual reduir lípids peroxidats i ROS (Wamelink et al., 2008). Per aquest motiu, un augment de l'activitat G6PD al fetge de les orades podria respondre a un increment de l'activitat GPX i, per tant, a un major estrès oxidatiu. Malgrat que el mecanisme d'acció no ha estat encara esclarit, la taurina ha demostrat millorar la capacitat antioxidant dels hepatòcits en peixos. A exemplars de llobarro i *Totoaba macdonaldi* alimentats amb dietes amb substitució parcial de farina de peix, la suplementació de taurina va incrementar l'activitat de la catalasa (EC 1.11.1.6), enzim encarregat de la conversió del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) intracel·lular en oxigen i aigua (Bañuelos-Vargas et al., 2014; Feidantsis et al., 2014a). En el cas del *Totoaba macdonaldi*, l'activitat de la catalasa augmentà conjuntament amb l'activitat G6PD. El NADPH no participa en la reacció catalitzada per la catalasa, però n'evita la inactivació per acció del mateix  $H_2O_2$  (Gaetani et al., 2005).

Estudis realitzats en *Seriola quinqueradiata* i *Pagrus major* demostren que la deficiència de taurina en dietes formulades exclusivament amb proteïna vegetal augmenta l'hemòlisi i l'acumulació de pigments biliars al fetge, la qual cosa resultaria en l'anomenat síndrome del fetge verd (Goto et al., 2001b; Takagi et al., 2008; Takagi et al., 2011; Takagi et al., 2006a; Takagi et al., 2006b). Conseqüentment, el dèficit de taurina augmenta la producció de biliverdina, la qual supera la seva taxa d'excreció al fetge, i en propicia l'acumulació. Alhora, l'acumulació de biliverdina promou la seva reducció a bilirubina, menys polar i més difícil d'excretar pel fetge a menys que sigui conjugada amb taurina o àcid glucurònic. Aquest procés, des de la producció de la biliverdina a la conjugació de la bilirubina, consumeix agents reductors NADPH, àcid glucurònic, sintetitzat a partir de la glucosa-6-fosfat (Wamelink et al., 2008), i taurina. En peixos, la bilirubina es conjuga preferentment amb taurina, la qual cosa dificulta l'excreció de pigments biliars acumulats al fetge de *Seriola quinqueradiata*. En canvi, a *Pagrus major*, espècie de la mateixa família de l'orada (Sparidae), l'excreció dels pigments biliars no es veu afectada per la deficiència de taurina dietètica. Els autors d'aquests estudis atribuïren aquesta discrepància a que *Pagrus major* té una major capacitat per a sintetitzar

taurina, tal com s'ha comentat prèviament. En qualsevol cas, la inclusió de taurina a la dieta redueix la producció hemolítica de pigments biliars i en redueix la concentració al fetge de *Seriola quinqueradiata* i *Pagrus major*, i probablement també al de l'orada. Aquesta altra propietat de la taurina contribuiria també a la reducció de la demanda metabòlica de NADPH al fetge de l'orada. D'altra banda, la possible relació entre l'acumulació de pigments biliars i l'estrès oxidatiu hepàtic no ha estat encara estudiada en peixos, possiblement perquè la mateixa bilirubina no conjugada té activitat antioxidant. No obstant, en concentracions elevades la bilirubina ha demostrat causar estrès oxidatiu i efectes citotòxics en cèl·lules humanes (Jangi et al., 2013).

Als nostres experiments, l'activitat FBPasa al fetge de les orades va augmentar amb inclusió de taurina. L'increment de l'activitat FBPasa contrasta amb el descens de l'activitat PFK-1 i ens indica una promoció de la gluconeogènesis. La FBPasa catalitza la reacció inversa a la de la PFK-1 i ambdós enzims són estretament regulats pels nivells de fructosa-2,6-bisfosfat, metabòlit sintetitzat i degradat per l'enzim bifuncional 6PF-2-K/Fru-2,6-P2asa (EC 2.7.1.105/EC 3.1.3.46) (Baanante et al., 1991; Enes et al., 2009; García de Frutos and Baanante, 1994; García de Frutos et al., 1990). L'expressió de la 6PF-2-K/Fru-2,6-P2asa, al seu torn, és modulada segons la composició de la dieta i la ració d'aliment subministrat (Metón et al., 2000). Malgrat l'increment concomitant de la ingesta de matèria seca digerible amb la taurina, els resultats obtinguts no permeten concloure si la ingesta és un factor determinant en l'augment de l'activitat FBPasa. Tanmateix, a Bañuelos-Vargas et al. (2014) la taurina va induir l'activitat FBPasa hepàtica a *Totoaba macdonaldi* amb independència de la ingesta. És més, la inclusió d'un 7% de farina de peix (Experiment 2) disminuï l'activitat FBPasa, tot i augmentar la ingesta de matèria seca digerible. En orades alimentades amb farina de peix, la gluconeogènesi hepàtica havia demostrat reduir-se proporcionalment a la ingesta (Caseras et al., 2002; Metón et al., 1999) i augmentar en dejú. A major ingesta de carbohidrats, menor dependència de la síntesi de glucosa endògena per a satisfer les demandes del fetge i altres òrgans. Aquests resultats evidencien encara més el canvi de paradigma en el metabolisme de la glucosa a les orades alimentades amb proteïna vegetal. Tant és així, que la inducció de la FBPasa i la inhibició de la PFK-1 són pròpies de peixos en dejú (Metón et al., 1999). Així doncs, a les orades alimentades amb proteïna vegetal, l'augment de la gluconeogènesi respondria a una major demanda de glucosa o glucosa-6-fosfat, derivada de deficiències nutricionals no resoltes per la taurina. De fet, la promoció de l'activitat FBPasa fou més acusada a les dietes amb pitjor rendiment nutricional: les dietes 100 i 100T a Experiment 2; i les dietes CPS i CPS+Tau a l'Experiment 3. En el cas concret de les orades alimentades amb les dietes CPS i CPS+Tau, la

taxa de síntesi de glucosa aparentment va superar a la de degradació. D'aquesta manera es justificaria que la inclusió de taurina no reduís la glicèmia de les orades, tal com va ocórrer amb la resta de dietes amb idèntica formulació entre elles, tret de la inclusió o no de taurina.

En peixos teleostis, la transaminació i la desaminació d'aminoàcids en el fetge constitueix una de les fonts principals d'esquelets de carboni per a la síntesi *de novo* de glucosa, especialment en condicions de dejú (French et al., 1981). D'entre els aminoàcids, l'alanina i l'aspartat són els principals aminoàcids gluconeogènics en peixos (Li et al., 2009b). D'entre les transaminases, l'ALT i l'AST són les més abundants als fetges dels peixos teleostis (Cowey i Walton, 2002). En línia amb això, la suplementació de taurina va resultar en majors activitats ALT i AST al fetge de les orades. L'activació de la via gluconeogènica, indicada per l'activitat FBPasa, hauria estat sustentada per una major provisió d'oxaloacetat procedent de la transaminació de l'alanina i l'aspartat. A *Totoaba macdonaldi*, la taurina també va promoure una major activitat ALT i AST (Bañuelos-Vargas et al., 2014). Per als grups d'orades alimentades exclusivament amb proteïna vegetal, la inclusió de taurina a la dieta va incrementar l'activitat oxidativa de la GDH (GDHox), la qual proveiria  $\alpha$ -cetoglutarat per a la producció d'ATP o per a la gluconeogènesi. No obstant, i en contra de la tendència observada a l'activitat de la FBPasa i les transaminases, la combinació de taurina amb l'hidrolitzat de proteïna de soja o el 7% de farina de peix va reduir l'activitat GDHox (Experiment 1; dietes 90 i 90T, Experiment 2; dietes HPS i HPS+Tau, Experiment 3). Aquesta discrepància indicaria que el glutamat seria emprat preferencialment com a substrat energètic, no com a precursor per a la síntesi de glucosa. Alhora, el descens de l'activitat GDHox suggereix que, en presència de l'hidrolitzat de proteïna de soja o la farina de peix a la dieta, la taurina reduiria significativament la demanda d'ATP procedent de la cadena respiratòria.

D'acord amb l'activitat reductora de la GDH (GDHred), la taxa de síntesi de glutamat al fetge de les orades va augmentar amb la inclusió de la taurina. Donat que l'activitat GDH també constitueix una de les principals fonts de glutamat per a la síntesi de glutatió (Fang et al., 2002; Newsholme et al., 2003), la taurina hauria contribuït a una major disponibilitat de glutatió per a combatre el possible estrès oxidatiu causat pels ingredients vegetals de la dieta.

#### 4.2.4.8. Efectes de la substitució de la farina de peix sobre metabolisme intermediari al fetge de les orades

Les dietes FM emprades als Experiments 2 i 3 varen ser formulades amb farina de peix com a font exclusiva de proteïnes. Al no contenir fibra, la farina de peix va permetre incloure una proporció de midó major que a les dietes vegetals. Altres autors han optat per compensar les diferències en el contingut de fibra afegint cel·lulosa a les dietes amb farina de peix. No obstant, aquesta pràctica dificultaria l'extrapolació dels resultats obtinguts a l'escenari d'una explotació piscícola real. Dit d'un altra manera, en afegir fibra, el valor nutricional de la dieta amb farina de peix s'aproximaria al de les dietes a base de proteïna vegetal, quan l'objectiu del sector piscícola i de la recerca en nutrició de peixos és el contrari.

En estudis previs l'orada ha demostrat certa capacitat per adequar l'expressió d'enzims glucolítics hepàtics a la proporció de carbohidrats en la dieta (Enes et al., 2009; Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999). Certament, a les orades alimentades amb les dietes FM s'evidencia, a través de l'activitat PK i dels nivells de glicogen hepàtic, un major flux de glucosa cap a la via glucolítica i la síntesi de glicogen. Tant l'activitat PK com el contingut de glicogen al fetge d'aquestes orades superaren més de dues vegades els dels grups alimentats amb dieta vegetal. No obstant, el major contingut de midó a les dietes FM no va suposar un augment d'igual magnitud en l'activitat GK i PFK-1. Això indicaria que els valors d'activitat GK i PFK-1 a les orades alimentades amb les dietes vegetals no responen proporcionalment al contingut de carbohidrats digeribles a la dieta. Així doncs, l'elevada activitat GK i PFK-1 en aquests grups s'hauria mantingut gràcies a la producció de glucosa endògena. Pel que fa a l'activitat GK, un ritme elevat d'oxidació i renovació de glucosa reforçaria la hipòtesi que les deficiències nutricionals dels ingredients vegetals incrementarien la demanda hepàtica de glucosa-6-fosfat. D'altra banda, convé destacar la manca de correlació entre les activitats PFK-1 i PK a les orades alimentades amb dieta vegetal, la qual cosa indicaria que part de la fructosa 1,6-bifosfat generada per la PFK-1 hauria estat desviada de la via glucolítica. Un possible destí alternatiu per aquesta fructosa 1,6-bifosfat seria la biosíntesi de glicerol. A Panserat et al. (2009), la substitució de farina de peix per a ingredients vegetals va derivar en la sobreexpressió al fetge de la truita irisada de la glicerol quinasa (EC 2.7.1.30), enzim que catalitza la interconversió del glicerol a glicerol-3-fosfat, necessari per a l'esterificació d'àcids grassos en triglicèrids. Aquest fet contrastaria amb l'augment del catabolisme de triglicèrids proposada en aquesta tesi, evidenciat pel descens dels nivells de triglicèrids. No obstant, el fetge és el teixit més actiu en clau lipogènica i satisfà les necessitats lipídiques d'altres teixits metabòlicament menys actius,

com és el teixit muscular (Álvarez et al., 2000; Kolditz et al., 2008). De tota manera, caldrien més estudis per a confirmar aquesta hipotètica promoció de la síntesi de triglicèrids i, de ser així, descriure a quins processos metabòlics i a quines necessitats fisiològiques respondria.

Als Experiments 2 i 3, les orades alimentades amb la dieta FM exhibiren activitats G6PD i 6PGD generalment més elevades que les alimentades amb dieta vegetal, amb l'excepció de les dietes suplementades amb taurina de l'Experiment 3. Aquesta discrepància es deu a l'efecte de la taurina, específic per aquest experiment, i que ha estat atribuït a l'augment de l'estrès oxidatiu i a la necessitat d'una major síntesi de colesterol. Aquest no sembla ser el cas de les orades alimentades amb la dieta FM. Atenent a la proporció de greix corporal i a la retenció de greix en aquestes orades, el NADPH produït per l'activitat G6PD i 6PGD hauria estat destinat a la lipogènesi. D'altra banda, la major ingesta de carbohidrats digeribles amb la dieta FM propiciaria la inducció dels enzims oxidatius de la via de la pentosa fosfat. En aquest sentit, és sabut que l'activitat G6PD i 6PGD al fetge dels peixos és capaç d'adaptar-se per processar una major aportació de glucosa a través de la dieta (Enes et al., 2010; Fernández et al., 2007; Li et al., 2013; Metón et al., 1999).

Pel que fa a la gluconeogènesi, el major contingut de midó a les dietes FM no va afectar significativament l'activitat FBPasa. Aquest no és, però, un resultat sorprenent en peixos. En estudis previs realitzats en orada, l'activitat FBPasa al fetge dels peixos no va modular-se segons la proporció de carbohidrats de la dieta (Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999). La G6Pasa (EC 3.1.3.9), el darrer enzim de la gluconeogènesi, encarregat de la hidròlisi de la glucosa-6-fosfat a glucosa, tampoc mostraria correlació amb el nivell de carbohidrats de la dieta en orada (Caseras et al., 2002), i en altres peixos (Enes et al., 2006; Panserat et al., 2000b). De fet, aquesta manca d'inhibició de la gluconeogènesi ha estat proposada com una de les causes de l'ineficient aprofitament dels carbohidrats dietètics (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012).

En comparar les activitats ALT i AST de les orades alimentades amb farina de peix (dieta FM) amb les de les alimentades amb proteïna vegetal, s'observen dues tendències diferents segons la transaminasa en qüestió. En el cas de l'ALT, l'activitat als grups alimentats amb la dieta FM tendeix a ser superior a la dels grups alimentats amb dietes vegetals. En canvi, l'activitat AST presenta la tendència contrària: les orades alimentades amb dietes vegetals mostren activitats més elevades. Estudis previs realitzats en peixos assenyalen que l'activitat transaminasa en el fetge s'inhibeix proporcionalment a la ingesta de carbohidrats (Enes et al.,



2008; Fernández et al., 2007; Gaye-Siessegger et al., 2006; Metón et al., 1999). Així, la tendència observada en l'activitat ALT no s'ajustaria al contingut de midó de la dieta FM. L'activitat ALT s'adequaria en major mesura a la quantitat d'alanina present a la dieta, que és major en la dieta FM que en les dietes vegetals, i a la ingesta més gran de proteïna digerible.

La desaminació del glutamat (GDHox) al fetge de l'orada, igual que la transaminació de l'alanina i l'aspartat, també s'inhibiria amb la inclusió de carbohidrats a la dieta (Enes et al., 2008). Tot i així, les orades alimentades amb dieta FM van mostrar valors d'activitat GDHox similars als de les orades alimentades amb dietes vegetals, inclús superiors, en el cas del grup alimentat amb la dieta 100 (Experiment 2). Així mateix, la uniformitat en l'activitat GDHox tampoc s'ajustaria als nivells de glutamat a la dieta, ja que aquests eren notablement superiors a les dietes vegetals, tret que, d'altra banda, és característic de molts ingredients vegetals com la soja i el gluten de blat. Descartats aquests dos factors, es dedueix que l'elevada activitat GDHox a les orades del grup FM es deu probablement a la major ingesta de proteïna digerible.

En resum, el major creixement de les orades alimentades amb la dieta FM vindria determinat per la major digestibilitat i el major contingut de midó de la dieta. Per una banda, la major digestibilitat de la dieta proporcionaria els nutrients necessaris per a sustentar una taxa de creixement més elevada. D'una altra banda, la major aportació de midó amb la dieta FM va elevar l'activitat glucolítica, la qual cosa podria haver contribuït a la major retenció proteica observada en aquestes orades. Alhora, el contingut de midó de la dieta FM també hauria derivat en una activitat lipogènica més elevada, així com en una major acumulació de glucogen al fetge de les orades.

### 4.3. COMPLEMENTACIÓ D'UNA DIETA VEGETAL AMB GLUTAMAT

#### 4.3.1. Disseny de l'experiment

L'objectiu del present experiment era comprovar si els efectes de la suplementació de glutamat observats a l'experiment de l'Apartat 4.1 eren reproduïbles en orades alimentades amb dieta formulada majoritàriament amb proteïna vegetal. A fi d'establir una possible relació entre els canvis a nivell somàtic i metabòlic, d'igual manera que en els experiments anteriors, també s'estudiaren els efectes del glutamat en diferents paràmetres bioquímics en el sèrum i el fetge de les orades. Alhora, per a comprendre millor la relació entre nutrició i metabolisme, s'analitzaren mostres de sèrum i fetge preses 6 i 24 hores després de la darrera ingesta de pinso.

A aquest efecte, es dissenyaren tres dietes diferents: una primera dieta a base de farina de peix (dieta FM), una segona a base de proteïna vegetal (dieta VEG), i una tercera de formulació idèntica a la segona però complementada amb un 4% de glutamat (dieta GLU). Tal i com es detalla a la Taula 23, totes tres dietes foren formulades amb un 50% de proteïna. A les dietes VEG i GLU, un 10% de la proteïna procedia de farina de peix, mentre que el 90% restant corresponia a una mescla de concentrat proteic de soja i glúten de blat i blat de moro. Aprofitant el coneixement adquirit sobre les propietats nutricionals de la taurina en orada, les dietes VEG i GLU incorporaren un 1% de taurina. Per a descartar que les dietes dissenyades per als experiments de l'Apartat 4.2 haguessin estat deficientes en metionina o lisina, s'incrementà d'un 0.4 a un 0.6% la inclusió de metionina, i d'un 0.6 a un 0.9% la de lisina. A la Taula 24 es mostra el perfil d'aminoàcids de les tres dietes. Per a descartar la possibilitat que l'alginat emprat en les dietes de l'Apartat 4.2 hagués afectat a la digestibilitat de la dieta, en aquest experiment es va optar per canviar l'agent aglutinant per a carragenina.

En arribar al laboratori, els juvenils d'orada de  $6.0 \pm 0.6$  g varen ser distribuïts en 9 aquaris. Un cop aclimatats a les noves condicions d'establiment, foren assignades cadascuna de les dietes experimentals a tres aquaris aleatoris. Els peixos varen ser alimentats diàriament *ad libitum* durant 37 dies. Per al seguiment del pes, el sacrifici i la presa de mostres s'empraren els protocols descrits a Materials i Mètodes (Apartat 3.4 i 3.5).

Taula 23. Formulació i composició química de les tres dietes experimentals.

	FM	VEG	GLU
<i>Formulació (%)</i>			
Farina de peix <sup>1</sup>	67.5	6.5	6.2
CPS <sup>2</sup>	-	41.0	38.9
Gluten de blat <sup>2</sup>	-	7.2	6.8
Gluten de blat de moro <sup>2</sup>	-	10.8	10.2
Midó pregelatinitzat <sup>3</sup>	17.2	8.0	7.2
Oli de peix <sup>4</sup>	13.1	19.7	19.8
L-Lisina <sup>5</sup>	-	0.6	0.6
DL-Metionina <sup>2</sup>	-	0.9	0.9
Taurina <sup>5</sup>	-	1.0	1.0
L-glutamat <sup>5</sup>	-	-	4.0
CaHPO <sub>4</sub> <sup>5</sup>	-	2.2	2.2
Mescla mineral <sup>6</sup>	0.9	0.9	0.9
Mescla vitamínica <sup>7</sup>	0.1	0.1	0.1
Clorur de colina <sup>5</sup>	0.1	0.1	0.1
Carragenina <sup>5</sup>	1.0	1.0	1.0
<i>Anàlisi química (% pes sec)</i>			
Proteïna crua	50.1	50.0	50.0
Greix cru	18.8	19.7	19.7
Cendres	11.5	6.6	6.2
Fòsfor	1.7	1.0	1.0

CPS: Concentrat proteic de soja.

<sup>1</sup> Corpesca S.A. *Super-Prime fish meal* (Santiago de Chile, Chile).

<sup>2</sup> SPAROS Lda. (Olhão, Portugal).

<sup>3</sup> Midó pregelatinitzat de blat de moro adquirit a Brenntag Química S.A. (St. Andreu de la Barca, Barcelona, Spain).

<sup>4</sup> A.F.A.M.S.A. (Vigo, Spain).

<sup>5</sup> L-lisina, L-glutamat, taurina, CaHPO<sub>4</sub>, clorur de colina i iota carragenina adquirits a Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

<sup>6</sup> Mescla mineral (mg/Kg): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7340; MgO, 800; KCl, 750; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60; ZnO, 30; MnO<sub>2</sub>, 15; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.7; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.5; KI, 1.5; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.3.

<sup>7</sup> Mescla de vitamines (mg/Kg): mio-inositol, 400; àcid ascòrbic, 200; àcid nicotínic, 70; acetat d'alfa-tocoferol, 60; pantotemat de calci, 30; riboflavina, 15; piridoxin, 10; àcid fòlic, 10; menadion, 10; tiamina-HCl, 8; tot-trans retinol, 2; biotina, 0.7; colecalciferol, 0.05; cianocobalamina, 0.05.

Taula 24. Composició en aminoàcids de les diferents dietes experimentals.

	<b>FM</b>	<b>VEG</b>	<b>GLU</b>
ARG	5.4	5.6	5.3
HIS	3.0	2.2	2.2
LYS	6.9	5.2	5.2
THR	4.2	3.8	3.6
ILE	3.7	3.6	3.5
LEU	6.5	7.5	7.4
VAL	4.3	3.9	3.8
MET	2.9	3.1	3.1
PHE	3.9	5.0	5.0
Cys	0.3	0.6	0.5
Tyr	3.5	3.9	3.8
Asx <sup>1</sup>	8.1	8.2	7.9
Glx <sup>2</sup>	11.7	16.1	21.9
Ala	5.2	4.4	4.3
Gly	4.5	3.6	3.5
Ser	3.7	4.7	4.4
Pro	3.5	6.1	5.9
Tau	1.0	2.2	2.3

Els aminoàcids essencials s'indiquen en majúscules, els no essencials en minúscules.

<sup>1</sup> Asx representa la suma de concentracions d'Asn i Asp, atès que l'Asn és transformat a Asp durant la hidròlisi.

<sup>2</sup> Glx representa la suma de concentracions de Gln i Glu, atès que la Gln és transformada a Glu durant la hidròlisi.

## 4.3.2. Resultats

### 4.3.2.1. Creixement, eficiència alimentària i composició corporal

Les orades alimentades amb dieta FM assoliren pesos finals i presentaren taxes de creixement significativament superiors als de les orades alimentades amb les dietes VEG o GLU (Taula 25). Comparant entre grups alimentats amb dieta vegetal, la suplementació amb glutamat (dieta GLU) va millorar significativament la taxa de creixement. A més a més, les orades alimentades amb la dieta GLU van ingerir diàriament més quantitat de pinso que la resta de grups. Els valors de FCR del grup amb dieta VEG van ser significativament superiors als del grup amb dieta FM, però no respecte al grup amb dieta GLU, el qual presentà valors intermedis. D'altra banda, la retenció de proteïna i greix van ser superiors en les orades alimentades amb dieta FM que en les alimentades amb les dietes VEG o GLU. L'índex hepatosomàtic del grup FM va ser significativament superior al del grup VEG, però no al del grup GLU.

Taula 25. Resultats dels paràmetres de creixement, ingesta diària, eficiència alimentària i composició corporal d'orades alimentades amb les diferents dietes experimentals.

	FM	VEG	GLU	p
Pes inicial (g)	8.52 ± 0.06	8.24 ± 0.16	8.06 ± 0.13	0.101
Pes final (g)	18.36 ± 0.18 <sup>a</sup>	15.61 ± 0.42 <sup>b</sup>	16.29 ± 0.44 <sup>b</sup>	<0.001
SGR (%/dia)	2.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.90 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.001
Ingesta (g/ Kg dia)	21.21 ± 0.19 <sup>b</sup>	21.66 ± 0.54 <sup>b</sup>	23.95 ± 0.53 <sup>a</sup>	0.011
FCR	1.10 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.010
Retenció proteica (%)	29.35 ± 1.04 <sup>a</sup>	22.89 ± 1.09 <sup>b</sup>	25.65 ± 0.78 <sup>ab</sup>	0.010
Retenció de greixos (%)	43.41 ± 2.81 <sup>a</sup>	21.23 ± 1.11 <sup>b</sup>	21.73 ± 1.11 <sup>b</sup>	<0.001
IHS	1.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>ab</sup>	<0.001
<i>Composició corporal (% pes en fresc. PF; % pes sec. PS)</i>				
Humitat (% PF)	70.09 ± 0.21 <sup>c</sup>	70.99 ± 0.07 <sup>b</sup>	71.74 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.001
Proteïna crua (% PS)	16.36 ± 0.14 <sup>b</sup>	16.64 ± 0.01 <sup>ab</sup>	17.06 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.045
Greix cru (% PS)	9.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.16 <sup>b</sup>	7.88 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.003
Cendres (% PS)	3.38 ± 0.05	3.47 ± 0.02	3.43 ± 0.04	NS

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup Control (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ††, p<0.001; †††, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

La substitució de la farina de peix per ingredients vegetals va afectar significativament la composició corporal de les orades. Així doncs, les orades alimentades amb la dieta FM van presentar cossos amb una menor proporció d'aigua, proteïna i cendres, i una major proporció de greix, en comparació a les alimentades amb les dietes VEG o GLU. D'una altra banda, la inclusió de glutamat en la dieta GLU només va afectar a la proporció d'aigua corporal, la qual va augmentar respecte al grup alimentat amb la dieta VEG.

#### 4.3.2.2. Digestibilitat aparent de la dieta, ingesta digerible i pèrdues fecals

La dieta GLU va resultar en coeficients de digestibilitat aparent (CDA) de la matèria seca i el carboni significativament inferiors als de la dieta FM, i similars als de la dieta VEG (Taula 26). En canvi, els CDAs de la proteïna no van variar significativament entre dietes. En comparació amb la dieta FM, el CDA del fòsfor de les dietes GLU i VEG es va reduir un 38%.

Taula 26. Coeficients de digestibilitat aparent (CDA) i ingestes de matèria seca, proteïna, carboni i fòsfor digeribles en els diferents grups d'orades.

	FM	VEG	GLU	p
<i>Coeficients de digestibilitat aparent (CDA. %)</i>				
Matèria seca	67.22 ± 1.79 <sup>a</sup>	56.41 ± 1.31 <sup>b</sup>	51.98 ± 1.24 <sup>b</sup>	0.001
Proteïna	78.09 ± 3.20	84.13 ± 2.41	82.57 ± 1.37	NS
Carboni	79.94 ± 1.49 <sup>a</sup>	68.51 ± 2.90 <sup>b</sup>	62.83 ± 1.79 <sup>b</sup>	0.005
Fòsfor	50.94 ± 2.24 <sup>a</sup>	37.23 ± 2.72 <sup>b</sup>	36.71 ± 2.77 <sup>b</sup>	0.013
<i>Ingesta digerible (g/Kg peix dia)</i>				
Matèria seca	14.25 ± 0.26 <sup>a</sup>	12.20 ± 0.26 <sup>b</sup>	12.44 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.010
Proteïna	8.30 ± 0.24 <sup>b</sup>	9.12 ± 0.47 <sup>ab</sup>	9.89 ± 0.27 <sup>a</sup>	0.047
Carboni	8.13 ± 0.08	7.50 ± 0.50	7.54 ± 0.24	NS
Fòsfor	0.186 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.082 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.088 ± 0.008 <sup>b</sup>	<0.001
<i>Pèrdues fecals (g/Kg peix dia)</i>				
Matèria seca	6.96 ± 0.44 <sup>c</sup>	9.45 ± 0.46 <sup>b</sup>	11.50 ± 0.44 <sup>a</sup>	0.001
Proteïna	2.34 ± 0.39	1.71 ± 0.21	2.08 ± 0.15	NS
Carboni	2.04 ± 0.17 <sup>c</sup>	3.38 ± 0.25 <sup>b</sup>	4.47 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.006
Fòsfor	0.179 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.138 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.152 ± 0.005 <sup>ab</sup>	0.014

Els valors de cada grup experimental s'expressen com a mitjanes ± errors estàndards de la mitjana (n=3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte el grup Control (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Les significàncies en l'ANOVA de dues vies són indicades amb creus (†, p<0.05; ††, p<0.001; †††, p<0.0001; NS, no significatiu). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grups alimentats amb dieta vegetal (p<0.05).

La ingesta de matèria seca i carboni digeribles van ser similars en els tres grups d'orades. En canvi, la ingesta de proteïna digerible va ser superior en les orades alimentades amb dieta

GLU que en les alimentades amb la dieta FM. La ingesta de fòsfor digerible en el grup amb dieta FM va ser més de dues vegades superior que la dels grups amb les dietes VEG o GLU.

Les pèrdues de matèria seca i carboni a través de les femtes foren majors en les orades alimentades amb la dieta GLU que en les alimentades amb la dieta VEG. Aquestes darreres, al seu torn, excretaren més matèria seca i carboni que les alimentades amb la dieta FM. D'altra banda, les orades alimentades amb la dieta FM presentaren pèrdues fecals de fòsfor majors que les alimentades amb la dieta VEG, però similars a les alimentades amb la dieta GLU. No s'observaren diferències significatives en relació a l'excreció de proteïnes amb les femtes.

#### 4.3.2.3. Metabòlits en sèrum i fetge

6 hores després de la darrera ingesta, la glicèmia i els triglicèrids en sèrum i fetge de les orades alimentades amb la dieta FM foren superiors als dels grups alimentats amb les dietes VEG o GLU, 1.7 i 1.9 vegades superior en el cas de la glucèmia, 2.1 i 1.8 vegades en el dels triglicèrids sèrics, 3.1 i 2.6 vegades en el dels triglicèrids hepàtics, respectivament (Figura 31). A les 24 hores, tant la glucèmia com els triglicèrids sèrics i hepàtics havien disminuït significativament en els tres grups d'orades. El grup alimentat amb dieta FM va continuar mostrant els valors de glucèmia i triglicèrids en sèrum i fetge més elevats, tot i que, en el cas de la glucèmia, les diferències amb els grups VEG i GLU es van reduir a la meitat. Els nivells de glicogen hepàtic no van variar amb el temps i foren 2.7 i 3.4 vegades superiors amb la dieta FM que amb les dietes VEG i GLU, respectivament. A les 6 hores, el glutamat lliure hepàtic va ser significativament superior en el grup VEG que en el grup GLU, i similar a la del grup FM. Posteriorment, la concentració de glutamat va augmentar en el grup FM i va disminuir en els grups VEG i GLU. D'aquesta manera, a les 24 hores, el fetge de les orades alimentades amb dieta VEG presentaren més glutamat lliure que les alimentades amb dieta GLU, i aquestes darreres més que les alimentades amb dieta FM.

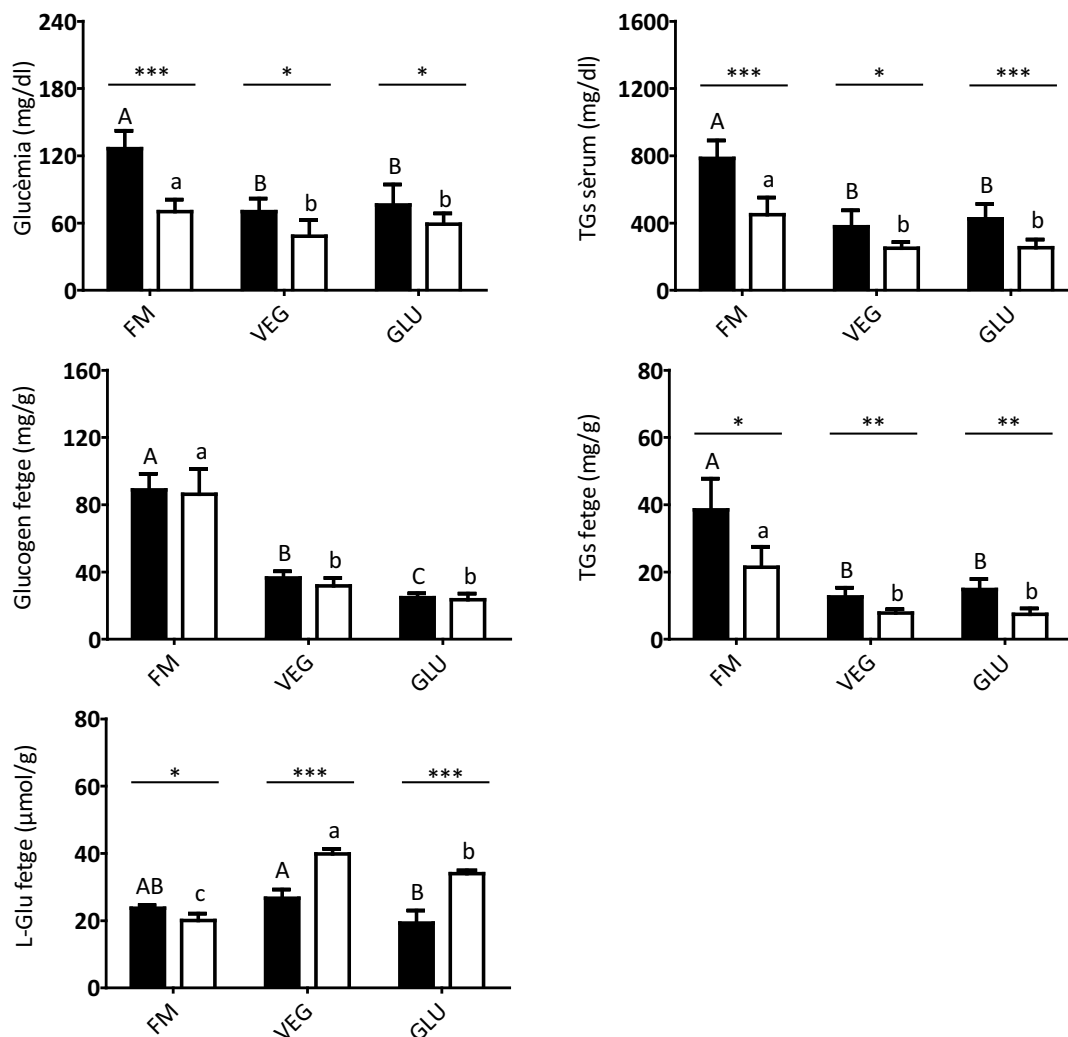


Figura 31. Glucosa en sèrum, de triglicèrids (TGs) en sèrum i fetge, i de glicogen i glutamat lliure en el fetge dels diferents grups experimentals. Les barres negres representen el valor mitjà (n=8) a les 6 hores postprandials i les blanques el valor mitjà a les 24 hores. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Els asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives entre les 6 i les 24h (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ). Lletres majúscules i minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre mitjanes a les 6 i les 24 hores, respectivament.

#### 4.3.2.4. Activitats dels enzims del metabolisme intermediari

A les 6 hores postprandials, els fetges de les orades alimentades amb les dietes FM o GLU van mostrar, respectivament, una activitat GK 2.4 i 2.8 vegades major a la de les orades alimentades amb la dieta VEG (Figura 32). Després de 24 hores, l'activitat GK s'havia reduït en tots tres grups, 6.7 i 7.8 vegades en els grups FM i GLU, respectivament; 3.3 vegades en el grup VEG. Conseqüentment, es deixaren d'observar diferències d'activitat GK entre grups. De manera similar a la GK, l'activitat PFK-1 a les 6 hores va ser major en els grups FM i GLU que en el grup VEG. En canvi, a diferència de la GK, l'activitat PFK no va canviar amb el temps, per



tant, a les 24 hores es mantienien les mateixes diferències entre grups. A les 6 hores, l'activitat PK en el grup FM va ser 1.6 i 1.5 vegades superior a la dels grups VEG i GLU, respectivament. A les 24 hores, degut a la davallada de l'activitat PK en els grups VEG i GLU, les diferències d'activitat respecte al grup FM s'ampliaren a 2.4 i 2.5 vegades, respectivament.

Pel que fa a l'activitat gluconeogènica, 6 hores després de la darrera ingesta, l'activitat FBPasa en les orades alimentades amb dieta FM va ser 1.2 i 1.3 vegades superior a la de les alimentades amb les dietes VEG i GLU, respectivament. A les 24 hores, l'activitat FBPasa del grup FM fou similar a la del grup VEG, però continuà sent superior a la del grup GLU.

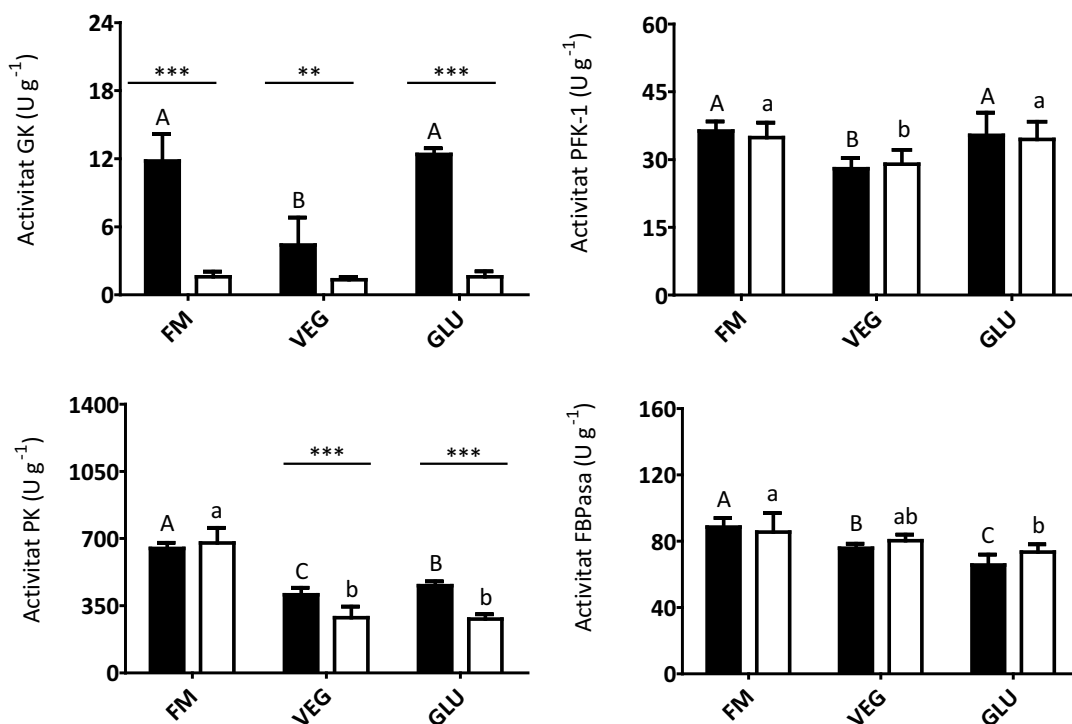


Figura 32. Activitat de la glucoquinasa (GK), la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), la piruvat quinasa (PK) i la fructosa bifosfatasa-1 (FBPasa) en el fetge dels diferents grups experimentals. Les barres negres representen el valor mitjà (n=8) a les 6 hores postprandials i les blanques el valor mitjà a les 24 hores. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Els asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives entre les 6 i les 24h (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Lletres majúscules i minúscules diferents indiquen diferències significatives (p<0.05) entre mitjanes a les 6 i les 24 hores, respectivament.

A les 6 hores després de la ingesta, l'activitat G6PD i 6PGD en el fetge de les orades alimentades amb dieta FM va ser entre 1.3 i 1.5 vegades superiors a la de les alimentades amb dieta VEG o GLU (Figura 33). A les 24 hores, l'activitat de tots dos enzims havia disminuït significativament en tots els grups, però les diferències entre grups d'orades es mantingueren.

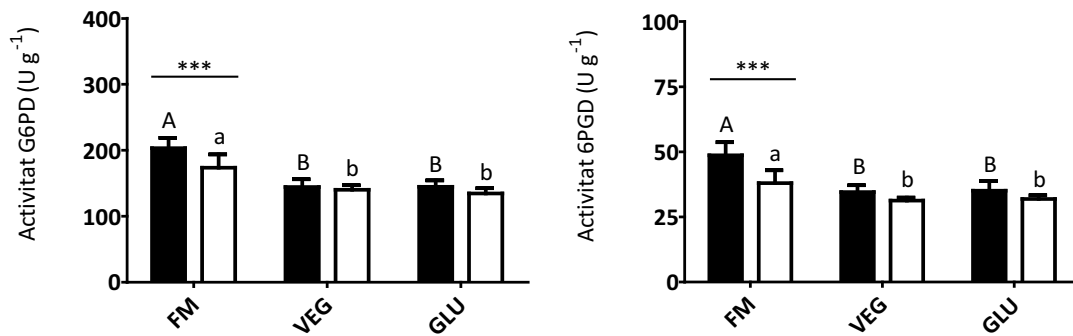


Figura 33. Activitat de la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD) i la 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) en el fetge dels diferents grups experimentals. Les barres negres representen el valor mitjà (n=8) a les 6 hores postprandials i les blanques el valor mitjà a les 24 hores. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Els asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives entre les 6 i les 24h (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ). Lletres majúscules i minúscules diferents indiquen diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre mitjanes a les 6 i les 24 hores, respectivament.

Les orades alimentades amb les dietes FM o VEG presentaren activitats ALT similars a les 6 i a les 24 hores (Figura 34). La inclusió de glutamat, malgrat no afectar l'activitat ALT a les 6 hores, va reduir significativament l'activitat a les 24 hores, assolint-se valors 1.8 vegades inferiors als de la resta de grups. A les 6 hores postprandials, l'activitat AST en els grups VEG o GLU va ser 2 vegades major que en el grup FM. A les 24 hores, l'activitat AST s'havia reduït en els grups amb dieta vegetal, especialment en el grup GLU. L'activitat AST del grup VEG continuà sent superior a la del grup FM (1.5 vegades), no obstant, l'activitat AST en el grup GLU va passar a ser 1.5 i 2.2 vegades inferior a la dels grups FM i VEG, respectivament. L'activitat GDH en ambdues direccions (reducció i oxidació) va augmentar entre les 6 i les 24 hores postprandials. Tant a les 6 com a les 24 hores, l'activitat GDH<sub>red</sub> va ser superior en les orades alimentades amb dieta vegetal, ampliant-se les diferències amb el temps, d'1.7-1.9 vegades a les 6 hores, a 2.3-2.4 vegades a les 24 hores. A les 6h, l'activitat GDH<sub>ox</sub> de les orades del grup FM va ser inferior a la dels grups VEG i GLU. A les 24 hores, en canvi, les orades alimentades amb la dieta VEG van mostrar activitats 1.5 vegades superiors a les de la resta.

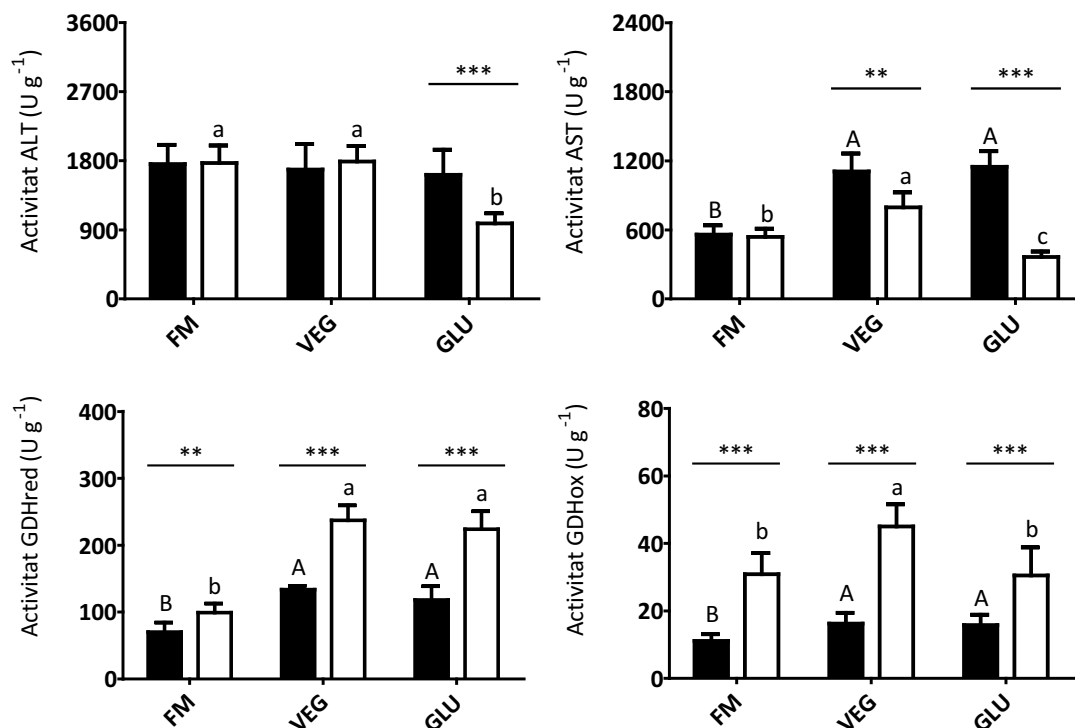


Figura 34. Activitat de l'alanina aminotransferasa (ALT), l'aspartat aminotransferasa (AST) i la glutamat deshidrogenasa en la direcció de reducció (GDHred) i oxidació (GDHox) en el fetge dels diferents grups experimentals. Les barres negres representen el valor mitjà (n=8) a les 6 hores postprandials i les blanques el valor mitjà a les 24 hores. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana de cada grup d'orades. Els asteriscs sobre les barres indiquen diferències significatives entre les 6 i les 24h (\*, p<0.05; \*\*, p<0.001; \*\*\*, p<0.0001). Lletres majúscules i minúscules diferents indiquen diferències significatives (p<0.05) entre mitjanes a les 6 i les 24 hores, respectivament.

### 4.3.3. Discussió

#### 4.3.3.1. Efectes del glutamat sobre el creixement, la ingesta i la retenció proteica

La substitució de farina de peix de la dieta per fonts de proteïna vegetal va resultar en un descens del creixement i l'eficiència alimentària dels juvenils d'orada. Malgrat això, la suplementació d'un 4% de glutamat en dieta a base de proteïna vegetal aconseguí restaurar parcialment la taxa de creixement dels peixos. Prenent en consideració les reduccions del creixement comunament observades en orades alimentades amb més d'un 75% de proteïna vegetal (Gómez-Requeni et al., 2004; Kissil et al., 2000; Sánchez-Lozano et al., 2009; Sitjà-Bobadilla et al., 2005), els nostres resultats assenyalarien al glutamat com a additiu alimentari avantatjós per a orades alimentades majoritàriament amb proteïna vegetal. Els ingredients vegetals acostumen a contenir alts nivells de glutamat, tal i com es pot comprovar en els perfils d'aminoàcids de les dietes emprades al llarg d'aquesta tesi. Aquest seria el principal motiu pel qual no es troben antecedents de suplementació de glutamat en dietes a base

d'ingredients vegetals per a peixos. No obstant, la major part del glutamat als ingredients vegetals no es troba en forma lliure, sinó formant part de proteïnes. Per contra, la farina de peix, tot i contenir nivells més moderats de glutamat, presenta una major proporció en estat lliure (Li et al., 2011). Les possibles implicacions d'aquest fet foren considerades per Aksnes et al. (2006), Kousoulaki et al. (2009) i Kousoulaki et al. (2012) quan estudiaren els beneficis de complementar dietes vegetals per a salmònids amb diferents fraccions hidrosolubles de la farina de peix.

En comparació amb l'experiment de l'Apartat 4.1, la inclusió de glutamat es mostra més efectiva en la millora del creixement de les orades. Convé recordar que, malgrat compartir el mateix objectiu, tots dos experiments van ser dissenyats seguint criteris diferents.

En primer lloc, les dietes de l'experiment de l'Apartat 4.1 foren formulades a base de farina de peix, mentre que en el present experiment el 90% de la proteïna de la dieta tenia origen vegetal. D'acord amb els experiments de l'Apartat 4.2, la substitució de la farina de peix per proteïna vegetal incrementaria la taxa de síntesi i oxidació de glutamat al fetge de les orades. L'elevada taxa de recanvi ha estat atribuïda a una major demanda d'energia i, possiblement, també de glutatió per a combatre l'estrès oxidatiu induït per l'intens ritme metabòlic. La suplementació d'un 4% de glutamat podria haver contribuït a suplir aquestes demandes. Qiyou et al. (2011) observaren que la complementació amb glutamina d'una dieta formulada amb parts iguals de farina de peix i de soja va millorar la capacitat antioxidant de l'intestí de juvenils d'híbrid d'esturió (*Acipenser schrenckii* x *Huso dauricus*). Així mateix, la suplementació de glutatió en dieta amb un alt contingut de proteïna vegetal ha demostrat millorar el creixement de *Ctenopharyngodon idellus* (Yuan et al., 2015).

En segon lloc, al contrari que a l'experiment de l'Apartat 4.1, les orades en aquest experiment van ser alimentades *ad libitum*. Tal i com es va hipotetitzar a l'anterior experiment, el suplement de glutamat va estimular la ingesta de pinso. El glutamat i altres aminoàcids en estat lliure són reconeguts estimuladors de la ingesta en peixos (Kasumyan i Døving, 2003; Li et al., 2009b). Tenint en compte que la FCR no diferí significativament entre grups d'orades alimentades amb dieta vegetal, l'augment de la ingesta seria, a priori, la causa més probable de la millora del creixement per part del suplement de glutamat. No obstant, si es pren en consideració els resultats d'ingesta digerible, l'intestí de les orades alimentades amb dieta GLU absorbí una major quantitat de proteïna crua, però no d'altres nutrients. Així mateix, l'augment de la ingesta de proteïna digerible va ser significatiu en comparació amb les orades

alimentades amb la dieta FM, però no en comparació a les orades alimentades amb l'altra dieta vegetal (dieta VEG). Per tant, la suplementació de glutamat no només va incrementar l'absorció de proteïna, sinó també l'ús d'aquesta per a créixer, tal i com demostren els valors de retenció de proteïna.

#### 4.3.3.2. Efectes de la inclusió de proteïna vegetal i glutamat sobre la digestibilitat de la dieta

La suplementació de glutamina i glutamat ha mostrat millorar la capacitat digestiva de porcs i peixos en incrementar la superfície absorptiva de l'intestí (Cabrera et al., 2013; Cheng et al., 2011; Cheng et al., 2012; Pohlenz et al., 2012; Qiyu et al., 2011; Rezaei et al., 2013; Wu et al., 2011; Yan i Qiu-Zhou, 2006). En el present experiment, però, la inclusió de glutamat en una dieta amb un 90% de proteïna vegetal no va millorar la digestibilitat aparent de cap dels nutrients analitzats. Igual com en els experiments de l'Apartat 4.2, la substitució de la farina de peix per alternatives vegetals va resultar en l'empobriment de la digestibilitat de la dieta. A conseqüència d'això, les orades alimentades amb la dieta FM varen ingerir una major quantitat de matèria seca digerible. Així mateix, cal assenyalar dos aspectes importants sobre la naturalesa d'aquesta matèria seca absorbida. El primer, que les dietes aquí emprades foren formulades de forma similar a les de l'anterior capítol. El segon, que mentre la digestibilitat de la matèria seca i el carboni disminuïren en substituir la farina de peix, la digestibilitat de la proteïna de la dieta restà inalterada. Per tant, d'igual manera que a l'Apartat 4.2, la menor ingesta de matèria seca digerible en les orades alimentades amb dieta vegetal seria atribuïble a la menor proporció de midó i al major contingut de fibra alimentària d'aquestes dietes. Tal i com s'ha anat explicant al llarg de la tesi, el concentrat proteic de soja és pobre en midó però ric en altres polisacàrids poc o gens digeribles, els quals s'uneixen a greixos i en dificulten la digestió (Francis et al., 2001; Gatlin et al., 2007).

El fòsfor representa una mínima part del total de les dietes, concretament un 1% en les dietes vegetals i un 1.7% en la dieta FM. No obstant, una ingesta deficient de fòsfor limita el creixement, redueix l'eficiència alimentària i empobreix la mineralització dels ossos dels peixos (Lall, 1991; Lall, 2002). Per tant, resulta especialment destacable la reducció de la digestibilitat del fòsfor observada a les dietes VEG i GLU. La dieta FM no només contenia més fòsfor, sinó que aquest era, a més a més, més fàcil d'assimilar que el present a les dues dietes vegetals. Malgrat el suplement d'hidrogenfosfat de calci, gran part del fòsfor a les dietes VEG i GLU hi seria present en forma d'àcid fític de baix o nul valor nutricional. A conseqüència d'això, les orades alimentades amb la dieta FM van ingerir diàriament el doble de fòsfor digerible que les alimentades amb dieta vegetal. El baix contingut en fòsfor assimilable dels ingredients vegetals

és una de les majors limitacions d'aquests productes com alternatives de la farina de peix (Gatlin et al., 2007). D'acord amb les estimacions de Pimentel-Rodrigues i Oliva-Teles (2001), les orades requereixen un 0.75% de fòsfor a la dieta. No obstant, aquestes estimacions foren realitzades mitjançant dietes a base de proteïna purificada (caseïna, gelatina) amb diferents graus d'inclusió d'hidrogenfosfat de calci. En no haver considerat la digestibilitat del fòsfor en aquestes dietes, aquesta estimació resulta difícilment extrapolable a aquest experiment. Per a un altre espèrid, el *Sparus macrocephalus*, Shao et al. (2008) sí va considerar aquest factor i va estimar un requeriment de fòsfor digerible en dieta del 0.55%. Segons els resultats de composició i de digestibilitat aparent, en aquest experiment, la dieta FM contindria un 0.88% de fòsfor digerible, mentre que a les dietes VEG i GLU, aquest percentatge es reduiria a un 0.37%.

#### 4.3.3.3. Efectes de la inclusió de proteïna vegetal i glutamat en dieta sobre la composició química de les orades

La conseqüència més evident de la reducció de la ingesta de glúcids, greixos i fòsfor digeribles seria la reducció del creixement de les orades. No obstant, les diferències d'absorció d'aquests nutrients podrien també explicar els canvis en la composició corporal de les orades. En aquest sentit, i novament seguint el mateix patró observat a l'Apartat 4.2, les orades alimentades amb la dieta FM presentaren majors reserves de greix que les alimentades amb proteïna vegetal. En consonància amb això, els nivells sèrics i hepàtics de triglicèrids en aquestes orades foren significativament superiors als dels grups alimentats amb les dietes VEG i GLU. Considerant que totes tres dietes varen ser formulades amb el mateix contingut de greix, la major deposició de greix podria haver estat resultat de la major proporció de midó a la dieta FM. Fernández et al. (2007) observaren que el percentatge de greix al cos dels juvenils d'orada va augmentar proporcionalment al contingut de midó de la dieta. No es poden descartar, però, possibles alteracions en l'absorció dels greixos ingerits i en el metabolisme lipídic a les orades alimentades amb les dietes VEG i GLU.

A diferència de l'experiment de l'Apartat 4.1, i tal com s'ha discutit al paràgraf anterior, la inclusió de glutamat en aquest experiment no va resultar en una major acumulació de greixos. Per contra, tal i com suggereix l'augment de la proporció de proteïna corporal, la promoció del creixement per part del suplement de glutamat derivaria principalment de l'augment de massa muscular en les orades, la qual cosa és coherent amb la millora parcial de la retenció de proteïna.

#### 4.3.3.4. Efectes de la inclusió de proteïna vegetal i glutamat en dieta sobre el metabolisme de la glucosa i els aminoàcids en el fetge de les orades

El major contingut de midó de la dieta FM, el doble respecte de les dietes VEG i GLU, va quedar reflectit en valors de glicèmia a les 6 hores postprandials dos cops superiors als de les orades alimentades amb dieta vegetal. Transcorregudes 24 hores, els nivells glucèmics havien disminuït en els tres grups d'orades. El descens de la glicèmia més intens, però, es va observar en el grup FM, la qual cosa evidencia capacitat d'adaptació del metabolisme de l'orada al contingut de carbohidrats de la dieta, com ja s'havia observat en treballs d'altres autors (Enes et al., 2009; Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999) i als experiments de l'Apartat 4.2 d'aquesta tesi. També en conformitat amb altres experiments de la tesi i amb l'estudi de Metón et al. (1999), en ser alimentades amb una major quantitat de midó, les orades del grup FM presentaren majors reserves hepàtiques de glucogen, concretament, més de dos cops superiors a les observades en les orades dels grups VEG i GLU.

Malgrat les diferències de contingut de midó entre dietes, els resultats del present experiment permeten identificar efectes específics del glutamat en el metabolisme de la glucosa. A les 6 hores després de la ingesta, la inclusió de glutamat a la dieta va resultar en un increment de les activitats GK i PFK-1 fins a valors similars als de les orades alimentades amb la dieta FM. També s'evidencia una major activitat PK a les 6 hores, però en aquest cas només en relació al grup alimentat amb la dieta VEG. De fet, els valors d'activitat PK més elevats s'observen a les orades del grup FM, la qual cosa fa palesa una major activitat glucolítica, i això s'ajusta al contingut de midó de la dieta. Com a l'experiment de l'Apartat 4.1, el glutamat va promoure una major activitat glucolítica al fetge de les orades. Un increment d'activitat que no s'ajustaria al contingut de midó de la dieta. En línia amb això, a l'experiment de l'Apartat 4.1, l'alimentació amb un suplement del 4% de glutamat va resultar en una activitat GK similar a la de les orades alimentades amb un 4% més de midó. D'altra banda, l'elevada activitat glucolítica a les orades del grup GLU tampoc respondria a una major assimilació de glúcids a partir de la ingesta, atès que presentaren valors d'ingesta de matèria seca i carboni digeribles similars a les del grup VEG, a més de nivells glucèmics baixos en relació als de les orades del grup FM. De la mateixa manera, a l'experiment de l'Apartat 4.1, tots els grups d'orades van ingerir quantitats similars de pinso.

Al cap de 24 hores, l'activitat GK havia caigut fins a nivells basals similars en els tres grups d'orades. La GK ha demostrat ser un enzim funcional en peixos, en tant que la seva

expressió gènica es modula en funció de la ingesta de carbohidrats (Enes et al., 2009). A Caseras et al. (2000) l'expressió i l'activitat de la GK al fetge d'orades va descriure un cicle de 24 hores amb valors màxims entre les 6 i les 8 hores postprandials, i un retorn als nivells basals a partir de les 10 hores. A diferència de la GK, l'activitat PFK-1 no va canviar al llarg de 24 hores a cap dels tres grups d'orades. Aquest estat estacionari és compartit per l'activitat FBPasa al fetge de les orades, la qual cosa és coherent amb el fet que ambdós enzims són controlats pel mateix efector al·lostèric, la fructosa-2,6-difosfat (Mediavilla et al., 2008). D'acord amb les tendències observades en les activitats PFK-1 i FBPasa, experiments previs amb orada demostraren que els nivells de fructosa-2,6-difosfat en fetge restaven inalterats durant 24 hores de dejú (García De Frutos et al., 1991; García de Frutos et al., 1990). Igual que a les 6 hores, l'activitat PK a les 24 hores reflecteix, com no ho fan la GK i la PFK-1, el major ritme d'oxidació de glucosa en el fetge de les orades alimentades amb farina de peix respecte de les alimentades amb ingredients vegetals. Alhora, cal afegir que, a les orades del grup FM l'activitat PK no varia significativament entre les 6 i les 24 hores postprandials. En canvi, a les orades alimentades amb dieta vegetal s'observà una davallada significativa de l'activitat PK a les 24 hores. Aquests resultats suggereixen que, a les orades alimentades amb les dietes VEG i GLU, part dels metabòlits intermediaris de la glucòlisi es canalitzaren cap a altres vies metabòliques i no arribaren a metabolitzar-se en piruvat. D'acord amb aquest supòsit, la magnitud de l'activació dels enzims glucolítics per part del glutamat sembla reduir-se en avançar per la via glucolítica. Respecte a les orades del grup VEG, l'activitat GK al fetge de les orades del grup GLU augmenta 2.8 vegades a les 6 hores; l'activitat PFK-1, 1.3 vegades a les 6 i 24 hores; l'activitat PK, 1.1 vegades a les 6 hores. Típicament, les activitats PK i PFK-1 han demostrat augmentar de forma conjunta amb el contingut de carbohidrats de la dieta (Enes et al., 2009; Fernández et al., 2007; Metón et al., 1999). De fet, el producte de la reacció catalitzada per la PFK-1, la fructosa-1,6-difosfat, és un activador al·lostèric de la PK (Yamada i Noguchi, 1999).

En peixos, els aminoàcids han demostrat jugar un paper clau en la regulació del metabolisme intermediari dels peixos (Li et al., 2009a). A l'Apartat 4.1, la promoció de la glucòlisi per part del suplement de glutamat va ser atribuïda al seu paper en l'activació de la via mTOR (Durán i Hall, 2012; Fumarola et al., 2005; Wu et al., 2013) i en l'activitat insulinoatròfica dels aminoàcids en peixos (Andoh, 2007). En el present experiment, tant l'augment de les activitats GK i PFK-1, com el descens de l'activitat FBPasa són congruents amb els efectes de la insulina en peixos descrits a Caruso i Sheridan (2011). Ara bé, a diferència de l'experiment de l'Apartat 4.1, la inclusió de glutamat a la dieta va reduir les reserves de



glicogen hepàtic. Per una banda, una menor glicogènesi implicaria un increment de glucosa disponible per a una via glucolítica més activa, la qual no compta, a priori, d'una font dietètica de glucosa adequada. D'una altra banda, aquest patró no coincidiria amb els treballs revisats per Caruso i Sheridan (2011), els quals sostenen que la insulina en peixos promou la síntesi de glicogen. Tal i com recull Polakof et al. (2012), la promoció de la glicogènesi és el patró comunament observat en assajos *in vitro* amb hepatòcits de peixos. No obstant, segons recull també Polakof et al. (2012), els experiments *in vivo* mostren una major tendència cap a la disminució del glicogen hepàtic. Els efectes de la insulina en el metabolisme intermediari dels peixos són encara avui dia poc conclouents, inclús contradictoris, especialment pel que fa al metabolisme de la glucosa. Aquesta inconsistència ha estat atribuïda a que l'activitat de la insulina podria estar subjecte a l'estat nutricional del peix (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012). En aquest sentit, probablement la substitució de la farina de peix per ingredients vegetals afectaria l'acció de la insulina en el metabolisme hepàtic dels peixos. Tot i que encara són escassos els estudis sobre els efectes dels ingredients vegetals sobre l'excreció i la sensibilitat a la insulina en peixos, en fetge de truita irisada ha estat detectada la reducció de l'expressió d'un substrat receptor d'insulina (en anglès, *Insulin Receptor Substrate* o IRS) (Panserat et al., 2009).

La inclusió de glutamat no va influir sobre les activitats G6PD i la 6PGD, ni va promoure l'acumulació de greixos somàtics, tal i com va fer a l'experiment de l'Apartat 4.1. La insulina en peixos s'associa normalment a l'acumulació de greix somàtic a conseqüència de la reducció de la lipòlisi i l'augment de la lipogènesi (Caruso i Sheridan, 2011). No obstant, com és ben sabut, per a síntesi de lípids es precisa de la provisió de cofactors NADPH, procedents principalment de l'oxidació de glucosa 6-fosfat a través de la via de la pentosa fosfat (Wamelink et al., 2008). D'aquesta manera, l'activitat G6PD i 6PGD, així com la deposició de greix al cos de les orades augmenten proporcionalment a la relació carbohidrats/proteïna de la dieta (Fernández et al., 2007). La disponibilitat de glucosa procedent de la dieta sembla ser el motiu pel qual, per una banda, el grup FM exhibís les majors activitats G6PD i 6PGD i la major proporció de greixos; i per una altra banda, que la inclusió de glutamat no alterés cap d'aquests paràmetres, atès el limitat subministrament de glucosa exògena.

Cal ressaltar també el descens a les 24 hores de l'activitat G6PD i 6PGD al fetge de les orades del grup FM. Pel que fa a aquest fet, en fetge de truita irisada, l'expressió de gens involucrats en la lipogènesi ha demostrat incrementar-se després de la ingesta i reduir-se hores més tard (Mennigen et al., 2012). A les orades dels grups VEG i GLU no es varen observar

canvis significatius en les activitats G6PD i 6PGD, probablement a causa del baix contingut de midó de la dieta.

Tal i com va exposar Bañuelos-Vargas et al. (2014), i s'ha assenyalat en els experiments de l'Apartat 4.2, l'activitat de la G6PD i la 6PGD en orades alimentades amb ingredients vegetals estaria dirigida en gran mesura cap al manteniment del potencial redox dels hepatòcits i la síntesi de colesterol, en comptes de cap a la biosíntesi d'àcids grassos. Segons els valors d'activitat G6PD i 6PGD obtinguts al present experiment, la suplementació de glutamat no va promoure la lipogènesi, ni va alleugerir el possible estrès oxidatiu o la possible afectació del metabolisme del colesterol. La complementació de la dieta amb un 4% de glutamat no va incrementar la concentració de glutamat lliure al fetge de les orades, el qual podria ser emprat en la síntesi de glutatió (Brosnan i Brosnan, 2013). El suplement de glutamat tampoc va alterar l'activitat GDHred en relació a l'observada a les orades alimentades amb la dieta VEG. D'igual manera que a l'Apartat 4.2, la substitució de la farina de peix per proteïna vegetal va derivar en una major activitat GDHred, malgrat el major contingut de glutamat d'aquestes dietes. Aquest fet resulta coherent amb la hipòtesi d'un requeriment de glutatió imposat per un major estrès oxidatiu. No obstant, no es pot descartar que l'excés de glutamat no hagués estat metabolitzat a l'intestí abans de poder arribar al torrent sanguini. L'intestí de peixos i mamífers té el glutamat i la glutamina com a substrats energètics preferencials, per sobre de la glucosa o altres aminoàcids (Ando, 1988; Blachier et al., 2009; Burrin i Stoll, 2009; Reeds et al., 2000).

Pel que fa al metabolisme aminoacídic, es varen observar tant tendències comunes entre grups, com diferències substancials derivades de la substitució de la farina de peix i la inclusió de glutamat. L'activitat ALT al fetge de les orades alimentades amb les dietes FM i VEG es va mantenir constant durant les 24 hores postprandials. Això contrasta amb l'augment postprandial de l'activitat GDHox i s'ajusta amb l'estacionarietat de l'activitat FBPasa. Per tant, el ritme de transaminació d'alanina respondria en major mesura a la demanda de piruvat per a síntesi de glucosa que no pas a requeriments energètics. D'altra banda, l'activitat AST va ser superior a les orades alimentades amb dieta vegetal. Com a l'Apartat 4.2, aquest patró és coherent amb el contingut de midó de la dieta, el qual era més elevat a la dieta FM.

A la vista de les activitats dels enzims del metabolisme aminoacídic, el metabolisme del glutamat guanya rellevància durant el període postprandial. Independentment de la substitució de la farina de peix i la inclusió de glutamat, les activitats GDHred i GDHox

augmentaren conjuntament al llarg de les 24 hores posteriors a la darrera ingesta. No obstant això, els nivells de glutamat lliure al fetge de les orades suggereixen diferències entre dietes pel que fa al balanç entre producció/oxidació de l'aminoàcid. Així doncs, al fetge de les orades del grup FM es va observar una lleugera reducció dels nivells hepàtics de glutamat en 24 hores. Al fetge de les orades dels grups VEG i GLU, per contra, els nivells de glutamat augmentaren. Igual que les activitats GDHred i GDHox, les concentracions de glutamat lliure al fetge de les orades alimentades amb proteïna vegetal indiquen com d'elevada és llur demanda metabòlica, i com aquesta augmenta al llarg de 24 hores postprandials. Com ha estat discutit en reiterades ocasions al llarg de la tesi, a fi de contrarestar les deficiències nutricionals dels ingredients vegetals el metabolisme hepàtic de les orades incorreria en una major despesa de recursos metabòlics.

La inclusió de glutamat a la dieta va resultar en una menor activitat AST a les 24 hores postprandials. Així mateix, l'activitat ALT i GDHox també va ser inhibida en relació a les orades del grup VEG i es va equiparar a l'observada a les del grup FM. Aquests resultats evidencien que el suplement de glutamat va alleugerir la dependència energètica de l'orada envers el catabolisme dels aminoàcids, la qual cosa és coherent amb la promoció de via glucolítica. Aquest canvi d'orientació del metabolisme hepàtic podria resultar en l'estalvi de proteïna dietètica, la qual podria ser emprada en la formació de nou teixit i en un major creixement de l'animal. Coincidint amb aquest raonament, les orades del grup GLU exhibiren un major creixement respecte de les del grup VEG i una retenció de proteïna més propera a l'observada en el grup FM. Aquests resultats reproduïen els obtinguts a l'experiment de l'Apartat 4.1 i, per tant, demostren els beneficis potencials de la suplementació amb glutamat per a optimitzar el valor nutricional de la proteïna i els carbohidrats de les dietes per a orada.

## **5. CONCLUSIONS**

---



## 5. CONCLUSIONS

1. En orades (*Sparus aurata*) alimentades a base de farina de peix, el glutamat i la glutamina són més eficaços que el midó en la millora de l'ús de la proteïna ingerida per al creixement.
2. A les orades alimentades amb un suplement d'un 4% de glutamina, l'augment de l'activitat GDHox i de la retenció proteica ens indica que l'oxidació de l'excés de glutamina podria reduir l'ús d'altres aminoàcids com a substrat energètic.
3. En incloure un 4% de glutamat a una dieta amb farina de peix i un 10% de midó, incrementa l'activitat i l'expressió gènica de la GK al fetge de les orades. La major taxa de fosforilació de glucosa contribueix a l'augment de la síntesi de glucogen i la producció de NADPH per a la lipogènesi.
4. En orades alimentades amb dieta formulada amb proteïna majoritàriament d'origen vegetal (el 90% de la proteïna) i un 7% de midó, la suplementació d'un 4% de glutamat incrementa l'activitat GK en fetge, independentment de la baixa disponibilitat de carbohidrats digeribles a la dieta. No obstant, les reserves de glucogen són reduïdes en incloure glutamat a la dieta.
5. Independentment de la font principal de proteïna, l'addició de glutamat millora la retenció proteica en promoure l'oxidació de glucosa. Els nostres resultats suggereixen que la suplementació de glutamat podria facilitar la substitució de proteïna per carbohidrats en dietes per a orades.
6. La inclusió d'un 4% de glutamat en la dieta a base de proteïna vegetal millora el creixement en orades mitjançant l'estimulació de la ingesta i l'augment de la retenció proteica.
7. Els nostres resultats de creixement i eficiència alimentaria assenyalen a la taurina com a nutrient essencial en dietes amb elevada substitució de farina de peix per proteïna d'origen vegetal. En base al creixement, orades alimentades amb proteïna majoritàriament d'origen vegetal requereixen una inclusió de taurina en la dieta d'entre el 0.52 i el 0.91%. En base a l'eficiència alimentària, aquest requeriment seria del 0.93%.

8. La suplementació d'un 1% de taurina millora el creixement d'orades alimentades amb proteïna majoritàriament o exclusivament d'origen vegetal. L'increment del creixement deriva de l'estimulació de la ingesta de pinso i la millora de l'eficiència alimentària (FCR).
9. La taurina millora la digestibilitat del fòsfor de les dietes vegetals i la ingesta de fòsfor digerible per part de les orades. La pobra assimilació de fòsfor és una de les principals causes del baix rendiment nutricional de les dietes vegetals.
10. La taurina incrementa l'activitat GK al fetge de les orades alimentades amb dietes vegetals, alhora que disminueix la glucèmia. El suplement de taurina redueix l'activitat PFK-1 i no mostra efectes sobre l'activitat PK. Així, la glucosa fosforilada per a la GK seria destinada a suplir altres demandes metabòliques.
11. La inclusió de taurina incrementa l'activitat FBPasa al fetge de les orades alimentades amb proteïna vegetal. L'activitat FBPasa indica una regulació a l'alça de la via gluconeogènica, efecte que es nodriria de l'augment de la transaminació d'alanina i aspartat resultant de la suplementació de taurina.
12. La suplementació d'un 1% de taurina incrementa la retenció proteica a les orades alimentades amb proteïna vegetal, no obstant, només es tradueix en l'augment de la proporció de proteïna corporal en ser inclosa en dieta amb un 90% de proteïna vegetal.
13. No s'observen efectes sobre la digestibilitat de la matèria seca i del carboni en incloure taurina en dieta amb proteïna majoritàriament vegetal. En canvi, en dieta amb proteïna exclusivament vegetal, la taurina exerceix efectes contraposats segons la proporció d'aquesta proteïna aportada pel concentrat proteic de soja. La digestibilitat de la matèria seca i del carboni disminueix en el cas de les dietes formulades únicament amb concentrat proteic de soja. Per contra, augmenta en aquelles formulades en base a una mescla de proteïnes vegetals. Així, sembla recomanable utilitzar mescles d'ingredients a l'hora de substituir la farina de peix.
14. La taurina promou la lipòlisi en orada. La magnitud d'aquest efecte és condicionat pel grau de substitució de farina de peix a la dieta. En dieta

formulada amb proteïna exclusivament d'origen vegetal, un 1% de taurina redueix la proporció de greix corporal i els nivells de triglicèrids en sèrum i fetge. En dieta formulada amb proteïna majoritàriament d'origen vegetal, aquests efectes no s'observen fins que no s'afegeix un 2% de taurina.

15. La taurina afecta a l'activitat G6PD i 6PGD de diferent manera segons el nivell de substitució de farina de peix. Redueix l'activitat en incloure-la en dieta amb el 90% de la proteïna d'origen vegetal, i l'augmenta en afegir-la en dieta amb el 100%. Les activitats d'ambdós enzims no mostren vinculació amb el metabolisme lipídic. Per tant, la modulació de l'activitat G6PD i 6PGD al fetge de les orades respondria a la necessitat de NADPH per a altres funcions fisiològiques.
16. La presència d'un 7% de farina de peix a la dieta suposa un major creixement de les orades en estimular la ingesta i augmentar la retenció proteica. Alhora, la presència de farina de peix accentua els efectes beneficiosos de la taurina sobre el creixement, la FCR i la retenció proteica. La inclusió d'un 7% de farina de peix no aconsegueix millorar la digestibilitat de la dieta, però sí la ingesta.
17. La inclusió d'un 6.5-6.6% d'hidrolitzat de proteïna de soja afavoreix la digestibilitat de la matèria seca, la proteïna i el carboni de la dieta. La major absorció de nutrients contribueix a la millora de la FCR i, per tant, a un major creixement de les orades.
18. Malgrat que la taurina i l'hidrolitzat de soja milloren notablement el creixement de les orades, cap dels dos és capaç d'equiparar el valor nutricional de les dietes vegetals al de la dieta control a base de farina de peix. La digestibilitat de la dieta sembla ser un dels principals factors que limitaria l'adequació de les dietes vegetals als requeriments nutricionals de l'orada.





## **6. BIBLIOGRAFIA**

---



## 6. BIBLIOGRAFIA

### A.

Abboudi, T., Mambrini, M., Larondelle, Y., Rollin, X., 2009. The effect of dispensable amino acids on nitrogen and amino acid losses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry fed a protein-free diet. *Aquaculture* 289, 327-333.

Aksnes, A., 2005. Feed ingredients. The impacts of nitrogen extractives in aqua feed ingredients. *Int Aqua Feed* 8, 28-30.

Albrektsen, S., Mundheim, H., Aksnes, A., 2006. Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources. *Aquaculture* 261, 626-640.

Álvarez, M.J., Diez, A., López-Bote, C., Gallego, M., Bautista, J.M., 2000. Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Br J Nutr* 84, 619-628.

Ando, M., 1988. Amino acid metabolism and water transport across the seawater eel intestine. *J Exp Biol* 138, 93-106.

Andoh, T., 2007. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). *Gen Comp Endocrinol* 151, 308-317.

Anticamara, J.A., Watson, R., Gelchu, A., Pauly, D., 2011. Global fishing effort (1950–2010): Trends, gaps, and implications. *Fish Res* 107, 131-136.

Apper-Bossard, E., Feneuil, A., Wagner, A., Respondek, F., 2013. Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds. *Aquat Biosyst* 9, 21.

Aragão, C., Conceição, L.E.C., Martins, D., Rønnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233, 293-304.

Asche, F., 2008. Farming the sea. *Mar Resour Econ* 23, 527.

Asche, F., Oglend, A., Tveteras, S., 2013. Regime shifts in the fish meal/soybean meal price ratio. *J Agr Econ* 64, 97-111.

### B.

Baanante, I.V., García de Frutos, P., Bonamusa, L., Fernandez, F., 1991. Regulation of fish glycolysis—gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P<sub>2</sub> and PFK-2. *Comp Biochem Phys B* 100, 11-17.

- Ballantyne, J.S., 2001. Amino acid metabolism, En Wright, P.A.m Anderson, P.M. (Eds.). *Fish physiology*. Academic Press, San Diego, 77-107.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L.M., Pérez-Jiménez, A., Peres, H., 2014. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comp Biochem Phys B* 170, 18-25.
- Bernt, E., Bergmeyer, H.U., 1974. L-Glutamate UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD. En Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed. Academic Press, New York, 1704-1708.
- Bibiano Melo, J.F., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp Biochem Phys A* 145, 181-187.
- Blachier, F., Boutry, C., Bos, C., Tomé, D., 2009. Metabolism and functions of L-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am J Clin Nutr* 90, 814S-821S.
- Boonyoung, S., Haga, Y., Satoh, S., 2013. Preliminary study on effects of methionine hydroxy analog and taurine supplementation in a soy protein concentrate-based diet on the biological performance and amino acid composition of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. *Aquac Res* 44, 1339-1347.
- Borrebaek, B., Christophersen, B., Sundby, A., 2003. Metabolic function of hepatic hexokinase in perch, *Perca fluviatilis*. *Aquac Res* 34, 235-239.
- 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.
- Braun, A., Little, D.P., Köster, H., 1997. Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extension and mass spectrometry. *Clin Chem* 43, 1151-1158.
- Brosnan, J.T., 2000. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J Nutr* 130, 988.
- Brosnan, J.T., 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* 133, 2068-2072.
- Brosnan, J.T., Brosnan, M.E., 2013. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 45, 413-418.
- Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 2009. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes. *Am J Clin Nutr* 90, 857-861.
- Brotos Martínez, J., Chatzifotis, S., Divanach, P., Takeuchi, T., 2004. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and feed selection of sea bass *Dicentrarchus labrax* fry fed with demand-feeders. *Fish Sci* 70, 74-79.
- Burrin, D.G., Stoll, B., 2009. Metabolic fate and function of dietary glutamate in the gut. *Am J Clin Nutr* 90, 850-856.

### C.

Cabrera, R.A., Usry, J.L., Arrellano, C., Nogueira, E.T., Kutschenko, M., Moeser, A.J., Odle, J., 2013. Effects of creep feeding and supplemental glutamine or glutamine plus glutamate (Aminogut) on pre- and post-weaning growth performance and intestinal health of piglets. *J Anim Sci Biotechnol* 4, 1-13.

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 Peptides* 110, 123-132.

Capilla, E., Médale, F., Panserat, S., Vachot, C., Rema, P., Gomes, E., Kaushik, S., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2004. Response of hexokinase enzymes and the insulin system to dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Reprod Nutr Dev* 44, 233-242.

Carter, C.G., Mente, E., Barnes, R., Nengas, I., 2012. Protein synthesis in gilthead sea bream: response to partial fishmeal replacement. *Br J Nutr* 108, 2190-2197.

Caruso, M.A., Sheridan, M.A., 2011. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *Gen Comp Endocrinol* 173, 227-247.

Caseras, A., Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V., 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim Biophys Acta* 1493, 135-141.

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.

Castano, J., Nieto, A., Feliu, J.E., 1979. Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 254, 5576-5579.

Clements, K.D., Raubenheimer, D., Choat, J.H., 2009. Nutritional ecology of marine herbivorous fishes: ten years on. *Func Ecol* 23, 79-92.

Coloso, R.M., Basantes, S.P., King, K., Hendrix, M.A., Fletcher, J.W., Weis, P., Ferraris, R.P., 2001. Effect of dietary phosphorus and vitamin D3 on phosphorus levels in effluent from the experimental culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 202, 145-161.

Collins, S.A., Mansfield, G.S., Desai, A.R., Van Kessel, A.G., Hill, J.E., Drew, M.D., 2013. Structural equation modeling of antinutrients in rainbow trout diets and their impact on feed intake and growth. *Aquaculture* 416-417, 219-227.

Conceição, L.E.C., Rønnestad, I., Tonheim, S.K., 2002. Metabolic budgets for lysine and glutamate in unfed herring (*Clupea harengus*) larvae. *Aquaculture* 206, 305-312.

Costas, B., Couto, A., Azeredo, R., Machado, M., Krogdahl, Å., Oliva-Teles, A., 2014. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune responses are modulated after feeding with purified antinutrients. *Fish Shellfish Immunol* 41, 70-79.

Cowey, C.B., Walton, M.J., 2002. Intermediary metabolism, En Halver, J. (Ed.). *Fish nutrition*. Academic Press., San Diego, 259-329.

Cui, Y., Hung, S.S.O., Zhu, X., 1996. Effect of ration and body size on the energy budget of juvenile white sturgeon. *J Fish Biol* 49, 863-876.

Cui, Y., Wootton, R.J., 1988. Effects of ration, temperature and body size on the body composition, energy content and condition of the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.). *J Fish Biol* 32, 749-764.

Chatzifotis, S., Polemitou, I., Divanach, P., Antonopoulou, E., 2008. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and bile salt activated lipase activity of common dentex, *Dentex dentex*, fed a fish meal/soy protein concentrate-based diet. *Aquaculture* 275, 201-208.

Cheng, Z., Buentello, A., Gatlin III, D.M., 2011. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 319, 247-252.

Cheng, Z., Gatlin III, D.M., Buentello, A., 2012. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Aquaculture* 362-363, 39-43.

Chiang, J.Y.L., 2009. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50, 1955-1966.

Cho, C.Y., 1992. Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture* 100, 107-123.

Cho, C.Y., Bayley, H.S., Slinger, S.J., 1974. Partial replacement of herring meal with soybean meal and other changes in a diet for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 31, 1523-1528.

#### D.

Dabrowska, H., Wojno, T., 1977. Studies on the utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) of feed mixtures containing soya bean meal and an addition of amino acids. *Aquaculture* 10, 297-310.

Dai, W., Panserat, S., Mennigen, J.A., Terrier, F., Dias, K., Seiliez, I., Skiba-Cassy, S., 2013. Post-prandial regulation of hepatic glucokinase and lipogenesis requires the activation of TORC1 signalling in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 216, 4483-4492.

Dalsgaard, J., Ekmann, K.S., Pedersen, P.B., Verlhac, V., 2009. Effect of supplemented fungal phytase on performance and phosphorus availability by phosphorus-depleted juvenile rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*), and on the magnitude and composition of phosphorus waste output. *Aquaculture* 286, 105-112.

Dalsgaard, J., Verlhac, V., Hjermitsev, N.H., Ekmann, K.S., Fischer, M., Klausen, M., Pedersen, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Anim Feed Sci Tech* 171, 181-191.

Davidson, A.L., Arion, W.J., 1987. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch Biochem Biophys* 253, 156-167.

De Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., Gómez-Réqueni, P., Médale, F., Kaushik, S.J., Mecatti, M., Poli, B.M., 2007. Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. *Aquac Nutr* 13, 361-372.

De la Puerta, C., Arrieta, F., Balsa, J., Botella-Carretero, J., Zamarrón, I., Vázquez, C., 2010. Taurine and glucose metabolism: a review. *Nutr hosp* 25, 910.

de Silva, S.S., Anderson, T.A., 1995. Fish nutrition in aquaculture, Fish nutrition in aquaculture., 1st ed. Chapman & Hall, London, 203-210.

del Sol Novoa, M., Capilla, E., Rojas, P., Baró, J., Gutiérrez, J., Navarro, I., 2004. Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 139, 48-54.

Deng, J., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Wang, X., Xu, W., Liufu, Z., 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 258, 503-513.

DeVries, J.W., 2003. On defining dietary fibre. *P Nutr Soc* 62, 37-43.

Di Sebastiano, K.M., Bell, K.E., Barnes, T., Weeraratne, A., Premji, T., Mourtzakis, M., 2013. Glutamate supplementation is associated with improved glucose metabolism following carbohydrate ingestion in healthy males. *Br J Nutr*, 2165–2172.

Dias, J., Álvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169-186.

Dias, J., Conceição, L.E.C., Ribeiro, A.R., Borges, P., Valente, L.M.P., Dinis, M.T., 2009. Practical diet with low fish-derived protein is able to sustain growth performance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during the grow-out phase. *Aquaculture* 293, 255-262.

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182-188.



Durán, R.V., Hall, M.N., 2012. Glutaminolysis feeds mTORC1. *Cell Cycle* 11, 4107.

## E.

Ekdahl, K., Ekman, P., 1985. Fructose-1, 6-bisphosphatase from rat liver. A comparison of the kinetics of the unphosphorylated enzyme and the enzyme phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260, 14173-14179.

Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2006. Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comp Biochem Phys A* 145, 73-81.

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., Sanchez-Gurmaches, J., Navarro, I., Gutiérrez, J., Oliva-Teles, A., 2010. Role of insulin and IGF-I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels. *Comp Biochem Phys A* 157, 346-353.

Espe, M., Holen, E., 2013. Taurine attenuates apoptosis in primary liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Br J Nutr* 110, 20-28.

## F.

Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.

FAO, 2014. FAOSTAT Statistical Database. [en xarxa]. <<http://faostat.fao.org/>> (Consulta, novembre 2014)

FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Rome, Italy.

Fauconneau, B., 1988. Partial substitution of protein by a single amino acid or an organic acid in rainbow trout diets. *Aquaculture* 70, 97-106.

FEAP, 2014a. Annual report 2014. FEAP Aquaculture, Liege, Belgium.

FEAP, 2014b. European Aquaculture Production Report (2004-2013). FEAP Aquaculture, Liege, Belgium.

Feidantsis, K., Kaitetzidou, E., Mavrogiannis, N., Michaelidis, B., Kotzamanis, Y., Antonopoulou, E., 2014b. Effect of taurine-enriched diets on the Hsp expression, MAPK activation and the antioxidant defence of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquac Nutr* 20, 431-442.

Fenwick, J.C., Smith, K., Smith, J., Flik, G., 1984. Effect of various vitamin D analogs on plasma calcium and phosphorus and intestinal calcium absorption in fed and unfed American eels, *Anguilla rostrata*. *Gen Comp Endocrinol* 55, 398-404.

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. *J Exp Mar Bio Ecol* 343, 1-10.

Figueiredo-Silva, A.C., Corraze, G., Kaushik, S., Peleteiro, J.B., Valente, L.M.P., 2010. Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. *Amino Acids* 39, 1401-1416.

Fournier, V., Huelvan, C., Desbruyeres, E., 2004. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 236, 451-465.

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* 88, 587-605.

Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.

Franconi, F., Di Leo, M.S., Bennardini, F., Ghirlanda, G., 2004. Is Taurine Beneficial in Reducing Risk Factors for Diabetes Mellitus? *Neurochem Res* 29, 143-150.

French, C.J., Mommsen, T.P., Hochachka, P.W., 1981. Amino Acid Utilisation in Isolated Hepatocytes from Rainbow Trout. *Eur J Biochem* 113, 311-317.

Fumarola, C., Monica, S.L., Guidotti, G.G., 2005. Amino acid signaling through the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway: Role of glutamine and of cell shrinkage. *J Cell Physiol* 204, 155-165.

## G.

Gaetani, G., Ferraris, A., Sanna, P., Kirkman, H., 2005. A novel NADPH:(bound) NADP+ reductase and NADH:(bound) NADP+ transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochem J* 385, 763-768.

García de Frutos, P., Baanante, I.V., 1994. 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in liver of the teleost *Sparus aurata*. *Arch Biochem Biophys* 308, 461-468.

García De Frutos, P., Bonamusa, L., Baanante, I.V., 1991. Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Comp Biochem Phys A* 98, 329-331.

García de Frutos, P., Bonamusa, L., Fernandez, F., Baanante, I.V., 1990. Fructose 2,6-bisphosphate in liver of *Sparus aurata*: Influence of nutritional state. *Comp Biochem Phys B* 96, 63-65.

Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* 38, 551-579.

Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Becker, K., 2006. Effect of dietary protein/carbohydrate ratio on activities of hepatic enzymes involved in the amino acid metabolism of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Fish Physiol Biochem* 32, 275-282.

Gaylord, T.G., Teague, A.M., Barrows, F.T., 2006. Taurine Supplementation of All-plant Protein Diets for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J of the World Aquaculture Society* 37, 509-517.

Gibson Gaylord, T., Barrows, F.T., Teague, A.M., Johansen, K.A., Overturf, K.E., Shepherd, B., 2007. Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 269, 514-524.

Glasel, J., 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 18, 62.

Gómez-Requeni, P., Calduch-Giner, J., Vega-Rubín de Celis, S., Médale, F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2005. Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 94, 353-361.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilization and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.

Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotrophic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749-767.

Goto, T., Matsumoto, T., Takagi, S., 2001a. Distribution of the hepatic cysteamine dioxygenase activities in fish. *Fisheries Sci* 67, 1187-1189.

Goto, T., Takagi, S., Ichiki, T., Sakai, T., Endo, M., Yoshida, T., Ukawa, M., Murata, H., 2001b. Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets: Relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. *Fisheries Sci* 67, 58-63.

Goto, T., Tiba, K., Sakurada, Y., Takagi, S., 2001c. Determination of hepatic cysteinesulfinate decarboxylase activity in fish by means of OPA-prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation. *Fisheries Sci* 67, 553-555.

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

Guillaume, J., Blanco, A.S., 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Mundi-Prensa Madrid, España.

Gutierrez, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Planas, J., 1984. Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of sea bass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *Gen Comp Endocrinol* 55, 393-397.

## H.

Hochachka, P., Guppy, M., Guderley, H., Storey, K., Hulbert, W., 1978. Metabolic biochemistry of water-vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. *Can J Zool* 56, 736-750.

Hofmann, A.F., Hagey, L.R., 2008. Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65, 2461-2483.

Hughes, S.G., 1985. Evaluation of glutamic acid and glycine as sources of nonessential amino acids for lake trout (*Salvelinus namaycush*) and rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp Biochem Phys A* 81, 669-671.

Huxtable, R., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72, 101-163.

## J.

Jangi, S., Otterbein, L., Robson, S., 2013. The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2843-2851.

Jirsa, D., Davis, D.A., Salze, G.P., Rhodes, M., Drawbridge, M., 2014. Taurine requirement for juvenile white seabass (*Atractoscion nobilis*) fed soy-based diets. *Aquaculture* 422–423, 36-41.

Jow, L.Y., Chew, S.F., Lim, C.B., Anderson, P.M., Ip, Y.K., 1999. The marble goby *Oxyeleotris marmoratus* activates hepatic glutamine synthetase and detoxifies ammonia to glutamine during air exposure. *J Exp Biol* 202, 237-245.

Jung, B. Evaluation of dietary nucleotides for broilers. 2011. University of Georgia. Tesi doctoral.

## K.

Kasumyan, A.O., Døving, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. *Fish Fish* 4, 289-347.

Kato, K., Yamamoto, M., Peerapon, K., Fukada, H., Biswas, A., Yamamoto, S., Takii, K., Miyashita, S., 2014. Effects of dietary taurine levels on epidermal thickness and scale loss in red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac Res* 45, 1818-1824.

Kaushik, S.J., 1998. Whole body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquat Living Resour* 11, 355-358.

Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., 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, S.J., Seiliez, I., 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquac Res* 41, 322-332.

Keppler, D., Decker, K., 1974. Glycogen determination with amyloglucosidase, En Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 2nd ed. Academic Press, New York, 1127-1131.

Ketola, H.G., 1975. Mineral Supplementation of Diets Containing Soybean Meal as a Source of Protein for Rainbow Trout. *Progr Fish Cult* 37, 73-75.

Khaoian, P., Nguyen, H.P., Ogita, Y., Fukada, H., Masumoto, T., 2014. Taurine supplementation and palm oil substitution in low-fish meal diets for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 420–421, 219-224.

Kim, K., Grimshaw, T.W., Kayes, T.B., Amundson, C.H., 1992. Effect of fasting or feeding diets containing different levels of protein or amino acids on the activities of the liver amino acid-degrading enzymes and amino acid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 107, 89-105.

Kim, S.-K., Kim, K.-G., Kim, K.-D., Kim, K.-W., Son, M.-H., Rust, M., Johnson, R., 2014. Effect of dietary taurine levels on the conjugated bile acid composition and growth of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquac Res*. doi: 10.1111/are.12431

Kim, S.-K., Matsunari, H., Nomura, K., Tanaka, H., Yokoyama, M., Murata, Y., Ishihara, K., Takeuchi, T., 2008a. Effect of dietary taurine and lipid contents on conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci* 74, 875-881.

Kim, S.-K., Takeuchi, T., Akimoto, A., Furuita, H., Yamamoto, T., Yokoyama, M., Murata, Y., 2005a. Effect of taurine supplemented practical diet on growth performance and taurine contents in whole body and tissues of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci* 71, 627-632.

Kim, S.-K., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Murata, Y., 2003. Effect of dietary supplementation with taurine,  $\beta$ -alanine and GABA on the growth of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci* 69, 242-248.

Kim, S.-K., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Murata, Y., Kaneniwa, M., Sakakura, Y., 2005b. Effect of dietary taurine levels on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 250, 765-774.

Kim, S.K., Matsunari, H., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Furuita, H., Murata, Y., Goto, T., 2008b. Comparison of taurine biosynthesis ability between juveniles of Japanese flounder and common carp. *Amino Acids* 35, 161-168.

Kim, S.W., Morris, J.G., Rogers, Q.R., 1995. Dietary soybean protein decreases plasma taurine in cats. *J Nutr* 125, 2831-2837.

Kirchner, S., Kaushik, S., Panserat, S., 2003. Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 134, 337-347.

Kissil, G.W., Lupatsch, I., Higgs, D.A., Hardy, R.W., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquac Res* 31, 595-601.

Knudsen, K.E.B., 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim Feed Sci Tech* 67, 319-338.

Kokou, F., Rigos, G., Henry, M., Kentouri, M., Alexis, M., 2012. Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* 364–365, 74-81.

Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefèvre, F., Médale, F., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol-Reg I* 294, R1154-R1164.

Kortner, T.M., Gu, J., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., 2013. Transcriptional regulation of cholesterol and bile acid metabolism after dietary soyabean meal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Br J Nutr* 109, 593-604.

Kousoulaki, K., Albrektsen, S., Langmyhr, E., Olsen, H.J., Campbell, P., Aksnes, A., 2009. The water soluble fraction in fish meal (stickwater) stimulates growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) given high plant protein diets. *Aquaculture* 289, 74-83.

Kousoulaki, K., Olsen, H.J., Albrektsen, S., Langmyhr, E., Mjøs, S.A., Campbell, P., Aksnes, A., 2012. High growth rates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed 7.5% fish meal in the diet. Micro-, ultra- and nano-filtration of stickwater and effects of different fractions and compounds on pellet quality and fish performance. *Aquaculture* 338–341, 134-146.

Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M., 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac Res* 41, 333-344.

## L.

Lall, S., 1991. Digestibility, metabolism and excretion of dietary phosphorus in fish. En Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.). *Nutritional strategies and aquaculture waste*. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 21-36.

- Lall, S.P., 2002. The minerals. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.). *Fish nutrition*. Tercera ed. Academic Press, New York, 259-308.
- Larsen, B.K., Dalsgaard, J., Pedersen, P.B., 2012. Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 326–329, 90-98.
- Lee, C.-Y., 1981. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse. *Methods Enzymol* 89, 252-257.
- Lee, K.-J., Powell, M.S., Barrows, F.T., Smiley, S., Bechtel, P., Hardy, R.W., 2010. Evaluation of supplemental fish bone meal made from Alaska seafood processing byproducts and dicalcium phosphate in plant protein based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 302, 248-255.
- Lee, M.A., Squirrell, D.J., Leslie, D.L. & Brown, T., 2004. Homogeneous fluorescent chemistries. En Edwards et al. (Eds.). *Real-Time PCR; An Essential Guide*. Horizon Bioscience. Wymondham, p. 31-70.
- Li, P., Gatlin III, D.M., 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251, 141-152.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., 2009a. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43-53.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009b. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43-53.
- Li, X., Rezaei, R., Li, P., Wu, G., 2011. Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids* 40, 1159-1168.
- Li, X.F., Wang, Y., Liu, W.B., Jiang, G.Z., Zhu, J., 2013. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquac Nutr* 19, 701-708.
- Lim, S.-J., Oh, D.-H., Khosravi, S., Cha, J.-H., Park, S.-H., Kim, K.-W., Lee, K.-J., 2013. Taurine is an essential nutrient for juvenile parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture* 414, 274-279.
- Livak, K. J. i Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- Lock, E.J., Waagbø, R., Wendelaar Bonga, S., Flik, G., 2010. The significance of vitamin D for fish: a review. *Aquac Nutr* 16, 100-116.
- Lu, S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 13, 1169-1183.
- Lunger, A.N., McLean, E., Gaylord, T.G., Kuhn, D., Craig, S.R., 2007. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 271, 401-410.

Lupatsch, Kissil, Sklan, Pfeffer, 2001. Effects of varying dietary protein and energy supply on growth, body composition and protein utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac Nutr* 7, 71-80.

## M.

Makkar, H., 1993. Antinutritional factors in foods for livestock. BSAP occasional publication: an occasional publication of the British Society of Animal Production.

Mamaug, R.E.P., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Gao, J., Nguyen, B.T., Ragaza, J.A., 2011. Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 321, 252-258.

Mambrini, M., Kaushik, S.J., 1994. Partial replacement of dietary protein nitrogen with dispensable amino acids in diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 109, 469-477.

Martínez-Llorens, S., Vidal, A.N.A.T., Garcia, I.J., Torres, M.P., Cerdá, M.J., 2009. Optimum dietary soybean meal level for maximizing growth and nutrient utilization of on-growing gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquac Nutr* 15, 320-328.

Martínez-Llorens, S., Vidal, A.T., Cerdá, M.J., 2012. A new tool for determining the optimum fish meal and vegetable meals in diets for maximizing the economic profitability of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) feeding. *Aquac Res* 43, 1697-1709.

Matsunari, H., Iwashita, Y., Suzuki, N., Saito, T., Akimoto, A., Okamatsu, K., Sugita, T., Yamamoto, T., 2010. Influence of fermented soybean meal-based diet on the biliary bile status and intestinal and liver morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Sci* 58, 243-252.

Matsunari, H., Takeuchi, T., Takahashi, M., Mushiake, K., 2005. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance of yellowtail juveniles *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Sci* 71, 1131-1135.

Matsunari, H., Yamamoto, T., Kim, S.-K., Goto, T., Takeuchi, T., 2008. Optimum dietary taurine level in casein-based diet for juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci* 74, 347-353.

McGoogan, B.B., Gatlin III, D.M., 1999. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus* I. Effects of dietary protein and energy levels. *Aquaculture* 178, 333-348.

McGoogan, B.B., Gatlin III, D.M., 2000. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: II. Effects of energy level and nutrient density at various feeding rates. *Aquaculture* 182, 271-285.



- Mediavilla, D., Metón, I., Baanante, I.V., 2008. Purification and kinetic characterization of 6-phosphofructo-1-kinase from the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Biochem* 144, 235-244.
- Meijer, A.J., 2003. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *J Nutr* 133, 2057-2062.
- Mennigen, J.A., Panserat, S., Larquier, M., Plagnes-Juan, E., Medale, F., Seilliez, I., Skiba-Cassy, S., 2012. Postprandial regulation of hepatic microRNAs predicted to target the insulin pathway in rainbow trout. *PLoS one* 7, e38604.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F., Baanante, I.V., 2000. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *BBA-Gene Struct Expr* 1491, 220-228.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 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.
- Milgram, S.L., McDonald, J.K., Noe, B.D., 1991. Neuronal influence on hormone release from anglerfish islet cells. *Am J Physiol-Endoc M* 261, E444-E456.
- Möellering, H., Bergmeyer, H., 1984. D-gluconate (D-glucono delta lactone) and D-gluconate-6-phosphate. *Methods Enzymol* 4, 220-227.
- Mommsen, T., Plisetskaya, E., 1991. Insulin in fishes and agnathans-history, structure, and metabolic-regulation. *Rev Aquat Sci* 4, 225-259.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp Biochem Phys B* 129, 207-219.
- Mommsen, T.P., Walsh, P.J., Moon, T.W., 1985. Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of Atlantic salmon. *Mol Physiol* 8, 89-99.
- Moyano, F.J., Cardenete, G., De la Higuera, M., 1991. Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Phys A* 100, 759-762.
- Moyano López, F.J., Martínez Díaz, I., Díaz López, M., Alarcón López, F.J., 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comp Biochem Phys B* 122, 327-332.
- Mundheim, H., Aksnes, A., Hope, B., 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture* 237, 315-331.

## N.

Nagai, M., Ikeda, S., 1972. Carbohydrate Metabolism in Fish-III. Effect of Dietary Composition on Metabolism of Glucose-U-14C and Glutamate-U-14C in Carp. *B Jpn Soc Sci Fish* 38, 137-143.

Nagai, M., Ikeda, S., 1973. Carbohydrate metabolism in fish-IV. Effect of dietary composition on metabolism of acetate-U-14C and L-alanine-U-14C in carp. *B Jpn Soc Sci Fish* 39, 633-643.

Navarro, I., Rojas, P., Capilla, E., Albalat, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M., Gutiérrez, J., 2002. Insights into Insulin and Glucagon Responses in Fish. *Fish Physiol Biochem* 27, 205-216.

Nengas, I., Alexis, M.N., Davies, S.J., 1996. Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diets for the gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.). *Aquac Res* 27, 147-156.

Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M.R., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2003. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 21, 1-9.

Nguyen, H., Khaoian, P., Fukada, H., Nakamori, T., Furuta, H., Masumoto, T., 2011. Effects of different soybean proteins on lipid digestion and growth of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Sci* 77, 357-365.

Nguyen, H.P., Khaoian, P., Fukada, H., Suzuki, N., Masumoto, T., 2013. Feeding fermented soybean meal diet supplemented with taurine to yellowtail *Seriola quinqueradiata* affects growth performance and lipid digestion. *Aquac Res*, doi: 10.1111/are.12267

## O.

Obrosova, I.G., Stevens, M.J., 1999. Effect of dietary taurine supplementation on GSH and NAD(P)-redox status, lipid peroxidation, and energy metabolism in diabetic recataractous lens. *Invest Ophth Vis Sci* 40, 680-688.

Oehme, M., Grammes, F., Takle, H., Zambonino-Infante, J.L., Refstie, S., Thomassen, M.S., Rørvik, K.A., Terjesen, B.F., 2010. Dietary supplementation of glutamate and arginine to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) increases growth during the first autumn in sea. *Aquaculture* 310, 156-163.

Oliva-Teles, A., Pereira, J.P., Gouveia, A., Gomes, E., 1998. Utilisation of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquat Living Resour* 11, 255-259.

Olsen, R.L., Hasan, M.R., 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends Food Sci Tech* 27, 120-128.

Olsvik, P.A., Torstensen, B.E., Hemre, G.I., Sanden, M., Waagbø, R., 2011. Hepatic oxidative stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) transferred from a diet based on marine feed ingredients to a diet based on plant ingredients. *Aquac Nutr* 17, 424-436.

**P.**

Palmer, T.N., Ryman, B.E., 1972. Studies on oral glucose intolerance in fish. *J Fish Biol* 4, 311-319.

Pannevis, M., Houlihan, D., 1992. The energetic cost of protein synthesis in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Physiol B* 162, 393-400.

Panserat, S., Hortopan, G.A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerré, D., Geurden, I., Médale, F., Kaushik, S., Corraze, G., 2009. Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294, 123-131.

Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000a. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am J Physiol-Reg I* 278, R1164-R1170.

Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2000b. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem* 11, 22-29.

Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2002. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *BBA-Gene Struct Expr* 1579, 35-42.

Park, G.-S., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Seikai, T., 2002. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci* 68, 824-829.

Peng, K.W., Chew, S.F., Lim, C.B., Kuah, S.S.L., Kok, W.K., Ip, Y.K., 1998. The mudskippers *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH<sub>3</sub> concentrations of 446 and 36µM, respectively. *Fish Physiol Biochem* 19, 59-69.

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

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

Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2004. Evaluation of micronized lupin seed meal as an alternative protein source in diets for gilthead sea bream *Sparus aurata* L. juveniles. *Aquac Res* 35, 828-835.

Peres, H., Oliva-Teles, A., 2005. The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles. *Aquaculture* 250, 755-764.

Peres, H., Oliva-Teles, A., 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 256, 395-402.

Pimentel-Rodrigues, A.M., Oliva-Teles, A., 2001. Phosphorus requirements of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquac Res* 32, 157-161.

Plisetskaya, E.M., 1998. Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comp Biochem Phys B* 121, 3-11.

Pohlenz, C., Buentello, A., Bakke, A.M., Gatlin III, D.M., 2012. Free dietary glutamine improves intestinal morphology and increases enterocyte migration rates, but has limited effects on plasma amino acid profile and growth performance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 370-371, 32-39.

Polakof, S., Mommsen, T.P., Soengas, J.L., 2011. Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comp Biochem Phys B* 160, 123-149.

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J., Moon, T., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *J Comp Physiol B* 182, 1015-1045.

## Q.

Qi, G., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Yun, B., Zhou, H., 2012. Effects of dietary taurine supplementation to a casein-based diet on growth performance and taurine distribution in two sizes of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 358–359, 122-128.

Qiyu, X., Qing, Z., Hong, X., Chang'an, W., Dajiang, W., 2011. Dietary glutamine supplementation improves growth performance and intestinal digestion/absorption ability in young hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* x *Huso dauricus*). *J Appl Ichthyol* 27, 721-726.

## R.

Rashid, K., Das, J., Sil, P.C., 2013. Taurine ameliorate alloxan induced oxidative stress and intrinsic apoptotic pathway in the hepatic tissue of diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 51, 317-329.

Reeds, P.J., Burrin, D.G., Stoll, B., Jahoor, F., 2000. Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr* 130, 978.

Rezaei, R., Knabe, D.A., Tekwe, C.D., Dahanayaka, S., Ficken, M.D., Fielder, S.E., Eide, S.J., Lovering, S.L., Wu, G., 2013. Dietary supplementation with monosodium glutamate is safe and improves growth performance in postweaning pigs. *Amino Acids* 44, 911-923.

Riche, M., Williams, T.N., 2011. Fish meal replacement with solvent-extracted soybean meal or soy protein isolate in a practical diet formulation for Florida pompano (*Trachinotus carolinus*, L.) reared in low salinity. *Aquac Nutr* 17, 368-379.

Ripps, H., Shen, W., 2012. Review: taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis* 18, 2673.

Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219-233.

Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 157, 347-359.

Romarheim, O.H., Skrede, A., Penn, M., Mydland, L.T., Krogdahl, Å., Storebakken, T., 2008. Lipid digestibility, bile drainage and development of morphological intestinal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing defatted soybean meal. *Aquaculture* 274, 329-338.

Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-García, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L.E.C., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture* 227, 147-164.

Roy, A., Sil, P.C., 2012. Taurine protects murine hepatocytes against oxidative stress-induced apoptosis by tert-butyl hydroperoxide via PI3K/Akt and mitochondrial-dependent pathways. *Food Chem* 131, 1086-1096.

Rumsey, G.L., Ketola, H.G., 1975. Amino acid supplementation of casein in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) Fry and of Soybean Meal for Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fingerlings. *J Fish Res Board Can* 32, 422-426.

## S.

Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2007. Growth performance and metabolic utilization of diets with different protein: carbohydrate ratios by white sea bream (*Diplodus sargus*, L.) juveniles. *Aquac Res* 38, 100-105.

Sabaut, J.J., Luquet, P., 1973. Nutritional requirements of the gilthead bream *Chrysophrys aurata*. Quantitative protein requirements. *Mar Biol* 18, 50-54.

Sajjadi, M., Carter, C.G., 2004. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquac Nutr* 10, 135-142.

Salze, G., McLean, E., Battle, P.R., Schwarz, M.H., Craig, S.R., 2010. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 298, 294-299.

Salze, G.P., Davis, D.A., 2015. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture* 437, 215-229.

Sánchez-Lozano, N.B., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Cerdá, M.J., 2009. Effect of high-level fish meal replacement by pea and rice concentrate protein on growth, nutrient utilization and fillet quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture* 298, 83-89.

- Sánchez-Lozano, N.B., MartíÑez-Llorens, S., TomÁS-Vidal, A., Jover CerdÁ, M., 2011. Amino acid retention of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed with pea protein concentrate. *Aquac Nutr* 17, 604-614.
- Sánchez-Lozano, N.B., Tomás Vidal, A., Martínez-Llorens, S., Nogales Mérida, S., Blanco, J.E., Moñino López, A., Pla Torres, M., Cerdá, M.J., 2007. Growth and economic profit of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal. *Aquaculture* 272, 528-534.
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., Gallardo, M.A., 2008. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282, 68-74.
- Schuhmacher, A., Münch, M., Gropp, J.M., 1995. Non-essential amino acid sources in crystalline amino acid diets for trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Ichthyol* 11, 317-321.
- Schuller-Levis, G.B., Park, E., 2003. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* 226, 195-202.
- Seilliez, I., Gabillard, J.-C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutiérrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., Tesseraud, S., 2008. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am J Physiol-Reg I* 295, 329-335.
- Shao, Q., Ma, J., Xu, Z., Hu, W., Xu, J., Xie, S., 2008. Dietary phosphorus requirement of juvenile black seabream, *Sparus macrocephalus*. *Aquaculture* 277, 92-100.
- Shearer, K., 2000. Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. *Aquac Nutr* 6, 91-102.
- Sissener, N.H., Sanden, M., Krogdahl, Å., Bakke, A.-M., Johannessen, L.E., Hemre, G.-I., 2011. Genetically modified plants as fish feed ingredients. *Can J Fish Aquat Sci* 68, 563-574.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387-400.
- Song, Z., Li, H., Wang, J., Li, P., Sun, Y., Zhang, L., 2014. Effects of fishmeal replacement with soy protein hydrolysates on growth performance, blood biochemistry, gastrointestinal digestion and muscle composition of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 426-427, 96-104.
- Spitze, A.R., Wong, D.L., Rogers, Q.R., Fascetti, A.J., 2003. Taurine concentrations in animal feed ingredients; cooking influences taurine content. *J Anim Physiol An N* 87, 251-262.
- Staal, G.E., Van Berkel, T.J., Nijessen, J., Koster, J., 1975. Normalisation of red blood cell pyruvate kinase in pyruvate kinase deficiency by riboflavin treatment. *Clin Chim Acta* 60, 323-327.

Stipanuk, M., 2004. Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. *Neurochem Res* 29, 105-110.

Storebakken, T., Austreng, E., 1987. Ration level for salmonids: I. Growth, survival, body composition, and feed conversion in Atlantic salmon fry and fingerlings. *Aquaculture* 60, 189-206.

Swarup, K., Das, V.K., Norman, A.W., 1991. Dose-dependent vitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced hypercalcemia and hyperphosphatemia in male cyprinoid *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Phys A* 100, 445-447.

Swarup, K., Norman, A.W., Srivastav, A.K., Srivastav, S.P., 1984. Dose-dependent vitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced hypercalcemia and hyperphosphatemia in male catfish *Clarias batrachus*. *Comp Biochem Phys B* 78, 553-555.

## T.

Tacon, A.G.J., Cowey, C.B., 1985. Protein and amino acid requirements, *Fish Energetics*. Springer, 155-183.

Tahmasebi-Kohyani, A., Keyvanshokoo, S., Nematollahi, A., Mahmoudi, N., Pasha-Zanoosi, H., 2011. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Shellfish Immunol* 30, 189-193.

Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Endo, M., Yamashita, H., Ukawa, M., 2008. Taurine is an essential nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture* 280, 198-205.

Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., Miyatake, H., Ukawa, M., 2011. Role of taurine deficiency in inducing green liver symptom and effect of dietary taurine supplementation in improving growth in juvenile red sea bream *Pagrus major* fed non-fishmeal diets based on soy protein concentrate. *Fisheries Sci* 77, 235-244.

Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hayashi, M., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., Ukawa, M., 2006a. Hemolytic suppression roles of taurine in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fishmeal diet based on soybean protein. *Fisheries Sci* 72, 546-555.

Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Endo, M., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H., Ukawa, M., 2006b. Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Sci* 72, 1191-1199.

Taylor, L., Curthoys, N.P., 2004. Glutamine metabolism: Role in acid-base balance. *Biochem Mol Biol Educ* 32, 291-304.

Thorpe, A., Ince, B.W., 1976. Plasma insulin levels in teleosts determined by a charcoal-separation radioimmunoassay technique. *Gen Comp Endocrinol* 30, 332-339.

Tibbetts, S.M., Milley, J.E., Lall, S.P., 2006. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 261, 1314-1327.

Timbrell, J.A., Seabra, V., Waterfield, C.J., 1995. The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen Pharmacol-Vasc S* 26, 453-462.

Tng, Y.Y.M., Wee, N.L.J., Ip, Y.K., Chew, S.F., 2008. Postprandial nitrogen metabolism and excretion in juvenile marble goby, *Oxyeleotris marmorata* (Bleeker, 1852). *Aquaculture* 284, 260-267.

Tolentino-Pablico, G., Bailly, N., Froese, R., Elloran, C., 2008. Seaweeds preferred by herbivorous fishes. *J Appl Phycol* 20, 933-938.

Torii, K., Uneyama, H., Nakamura, E., 2013. Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. *J Gastroenterol* 48, 442-451.

Tranulis, M.A., Christophersen, B., Borrebaek, B., 1997. Glucokinase in Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Brockmann Bodies. *Comp Biochem Phys B* 116, 367-370.

Tranulis, M.A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, Å., Borrebaek, B., 1996. A glucokinase-like enzyme in the liver of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Phys B* 114, 35-39.

## V.

Van den Thillart, G., van Raaij, M., 1995. Chapter 3 Endogenous fuels; non-invasive versus invasive approaches. En Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier, 33-63.

Vielma, J., Mäkinen, T., Ekholm, P., Koskela, J., 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. *Aquaculture* 183, 349-362.

Vielma, J., Ruohonen, K., Peisker, M., 2002. Dephytinization of two soy proteins increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 204, 145-156.

Vilhelmsson, O.T., Martin, S.A.M., Médale, F., Kaushik, S.J., Houlihan, D.F., 2004. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr* 92, 71-80.

## W.

Wamelink, M.M.C., Struys, E.A., Jakobs, C., 2008. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. *J Inherit Metab Dis* 31, 703-717.



Wang, C.A., Xu, Q.Y., Xu, H., Zhu, Q., Yang, J.L., Sun, D.J., 2011. Dietary L-alanyl-L-glutamine supplementation improves growth performance and physiological function of hybrid sturgeon *Acipenser schrenckii* x *A. baerii*. *J Appl Ichthyol* 27, 727-732.

Wang, F., Yang, Y.-H., Han, Z.-Z., Dong, H.-W., Yang, C.-H., Zou, Z.-Y., 2009. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult Int* 17, 143-157.

Wang, Q., He, G., Wang, X., Mai, K., Xu, W., Zhou, H., 2014. Dietary sulfur amino acid modulations of taurine biosynthesis in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 422–423, 141-145.

Watson, A.M., Barrows, F.T., Place, A.R., 2014. Effects of Graded Taurine Levels on Juvenile Cobia. *N Am J Aquacult* 76, 190-200.

Wei, J., Carroll, R., Harden, K., Wu, G., 2012. Comparisons of treatment means when factors do not interact in two-factorial studies. *Amino Acids* 42, 2031-2035.

Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., 2012. Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Mol Cell Endocrinol* 353, 128-137.

Wilson, R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124, 67-80.

Wu, G., 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv Nutr* 1, 31-37.

Wu, G., Bazer, F.W., Johnson, G.A., Knabe, D.A., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Li, X.L., Wang, J.J., 2011. Triennial Growth Symposium: Important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *J Anim Sci* 89, 2017-2030.

Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J., Yin, Y., 2013. Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids* 44, 1107-1113.

Wu, Y., Han, H., Qin, J., Wang, Y., 2014. Replacement of fishmeal by soy protein concentrate with taurine supplementation in diets for golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquac Nutr*, doi: 10.1111/anu.12161.

## X.

Xiao, Y.P., Wu, T.X., Sun, J.M., Yang, L., Hong, Q.H., Chen, A.G., Yang, C.M., 2012. Response to dietary L-glutamine supplementation in weaned piglets: A serum metabolomic comparison and hepatic metabolic regulation analysis. *J Anim Sci* 90, 4421-4430.

## Y.

Yamada, K., Noguchi, T., 1999. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochemical J* 337, 1-11.

Yamamoto, T., Suzuki, N., Furuita, H., Sugita, T., Tanaka, N., Goto, T., 2007. Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Sci* 73, 123-131.

Yan, L., Qiu-Zhou, X., 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 256, 389-394.

YCharts, 2012. YCharts. [en xarxa]. <<http://ycharts.com>> (Consulta, octubre 2012)

Yokogoshi, H., Mochizuki, H., Nanami, K., Hida, Y., Miyachi, F., Oda, H., 1999. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *J Nutr* 129, 1705-1712.

Yokoyama, M., Takeuchi, T., Park, G., Nakazoe, J., 2001. Hepatic cysteinesulphinate decarboxylase activity in fish. *Aquac Res* 32, 216-220.

Yuan, X., Zhou, Y., Liang, X.F., Guo, X., Fang, L., Li, J., Liu, L., Li, B., 2015. Effect of dietary glutathione supplementation on the biological value of rapeseed meal to juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquac Nutr* 21, 73-84.

Yun, B., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Qi, G., Luo, Y., 2012. Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture* 324–325, 85-91.

Zheng, Q., Wen, X., Han, C., Li, H., Xie, X., 2012. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, hematology, antioxidant enzymes activity and expression for juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Fish Physiol Biochem* 38, 1059-1069.

Zhu, Y., Ding, Q., Chan, J., Chen, P., Wang, C., 2015. The effects of concurrent supplementation of dietary phytase, citric acid and vitamin D3 on growth and mineral utilization in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 436, 143-150.

Zhu, Y., Qiu, X., Ding, Q., Duan, M., Wang, C., 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 430, 1-8.



## **7. ANNEX**

---



## 7. ANNEX

Composició dels ingredients utilitzats en la preparació de les dietes experimentals.  
Facilitada per l'empresa proveïdora SPAROS Lda. (Portugal).

	<b>Soycomil FG</b>	<b>Gluten de blat</b>	<b>Gluten de blat de moro</b>
Humitat	5.77	7.28	9.63
Proteïna crua	67.68	84.31	57.60
Greix	0.68	1.65	1.60
Fibra	3.50	0	1.50
Midó	0	7.40	13.60
Cendres	0	0.90	1.80
Energia	20.60	22.30	19.00
Lys	3.20	1.44	0.90
Met+Cys	1.50	2.65	2.20
Fòsfor total	0.72	0.11	0.49

Els valors es representen com a percentatge de pes fresc.

Fitxa tècnica del concentrat proteic de soja utilitzat per a la preparació de les dietes experimentals. Facilitada per SPAROS Lda. (Portugal).



### Soycomil FG

Soycomil FG is a high quality soy protein concentrate specially designed for the aquaculture industry. The unique Soycomil production process makes the soy protein highly digestible by inactivating the anti-nutritional factors and removing the soluble carbohydrates. Soycomil FG has no negative effect on faecal dry matter content. The low ash and phosphorus content, the absence of biogenic amines and the excellent pelleting characteristics make Soycomil FG an ideal raw material for shrimp and salomid diets. Soycomil FG is a finely ground powder.

#### Specification

Crude Protein (dry matter)	67%
Moisture	7%
Trypsin Inhibitor Activity	3.5 mg / g
Antigen Activity (glycinin)	50 mg / kg
Enteroto's	< 100 cfu / g
Salmonella	negative / 25 g

#### Typical composition (as is)

Crude Protein	65%
Moisture	5%
Crude Ash	7%
Crude Fat	1%
Crude Fiber	4%
Nitrogen Free Extract:	
Soluble	2%
Insoluble	16%
	-----
	100%
PDI (in water)	5%
Trypsin Inhibitor Activity	3 mg / g
Antigen Activity (glycinin)	20 mg / kg
TPC	< 50.000 cfu / g
Particle size	99% < 75 Micron

#### Method of Analysis

Crude Protein	NEN 3198 (72/199/EG, L179)
Moisture	NEN 3754 (71/393/EG, L279)
Trypsin Inhibitor Activity	NEN-EN-ISO 14902:2001
Antigens	TNO Sandwich ELISA
Enteroto's	VRBG-agar medium ISO 7402
Salmonella	ELISA

**Packaging:** 25 kg bags / 1,000 kg bags / bulk  
**Shelf life:** 2 years after production date when stored in a cool dry place  
**Storage:** Storage below 25°C and below 60% relative humidity promotes longer shelf life

## Nutritional information Soycomil FG

<b>Amino Acids</b>			<b>Minerals</b>		
	g/100 g protein	% (as is)		mg/100 g	%
Lys	6.5	4.23	Ca	350	0.35
Met	1.4	0.91	P	800	0.8
Met&Cys	2.9	1.89	Available P	240	0.24
Thr	4.2	2.73	K	2200	2.2
Ile	4.9	3.19	Na	11	0.011
Trp	1.2	0.78	Mg	335	0.335
Arg	7.6	4.94	Cl	100	0.1
Phe	5.3	3.45			<b>ppm</b>
Val	5.2	3.38	Fe	15	150
His	2.8	1.82	Zn	3.5	35
Leu	8.0	5.20			<b>ppb</b>
			Cu (µg)	1.2	12
			Heavy metals	< 0.2	



