

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

T
14
125



INFLUENCIA DE LA ENCAPSULACIÓN DE LA LISINA SOBRE LA
UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN Y
RECAMBIO PROTÉICO TISULAR
EN LA TRUCHA (*O. Mykyss*) Y LA CARPA (*C. carpio*)

TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

GRANADA

Nº Documento 019676104

Nº Copia 121222770

ANABELLA GARZÓN FERNÁNDEZ
GRANADA, 1995

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

PROU. T. 15/95

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 20-7-95
ENTRADA NUM. 1570

UNIVERSIDAD DE GRANADA
11 JUL 1995
COMISION DE DOCTORADO

**INFLUENCIA DE LA ENCAPSULACIÓN DE LA LISINA SOBRE LA
UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN Y
RECAMBIO PROTÉICO TISULAR
EN LA TRUCHA (*O. Mykyss*) Y LA CARPA (*C. carpio*)**

ANABELLA GARZÓN FERNÁNDEZ

TESIS DOCTORAL

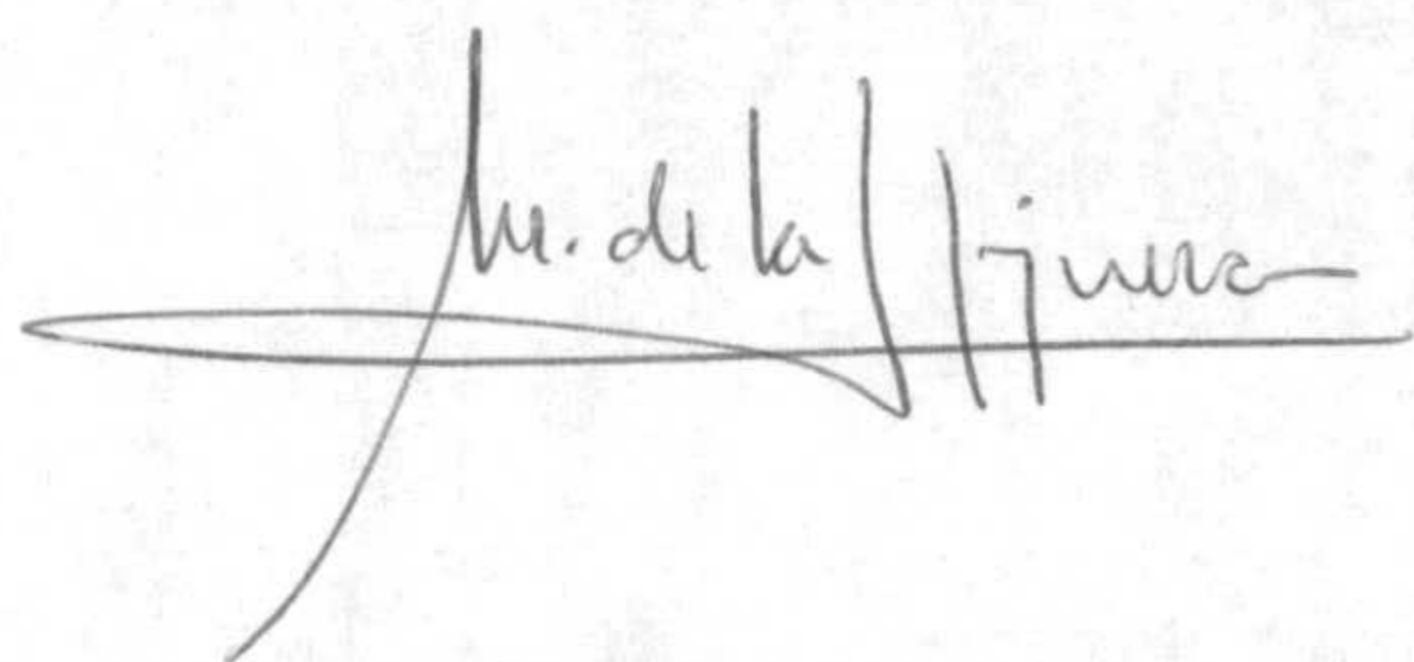
GRANADA
1995

**INFLUENCIA DE LA ENCAPSULACIÓN DE LA LISINA SOBRE LA
UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN Y
RECAMBIO PROTÉICO TISULAR
EN LA TRUCHA (*O. mykiss*) Y LA CARPA (*C. carpio*)**

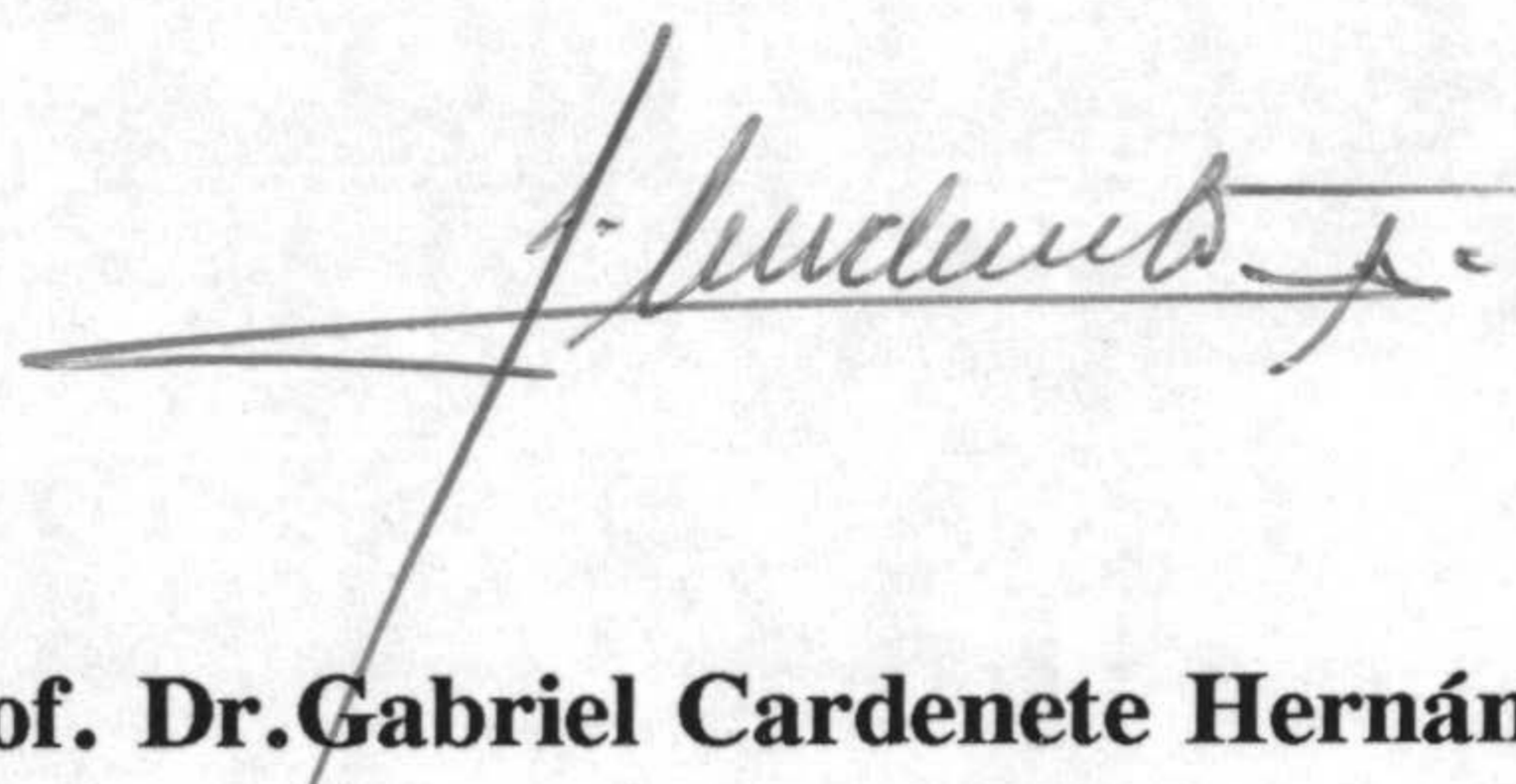
**Memoria para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas
presentada por la licenciada:**

D^a. Anabella Garzón Fernández

Los Directores del trabajo:



Prof. Dr. Manuel de la Higuera González

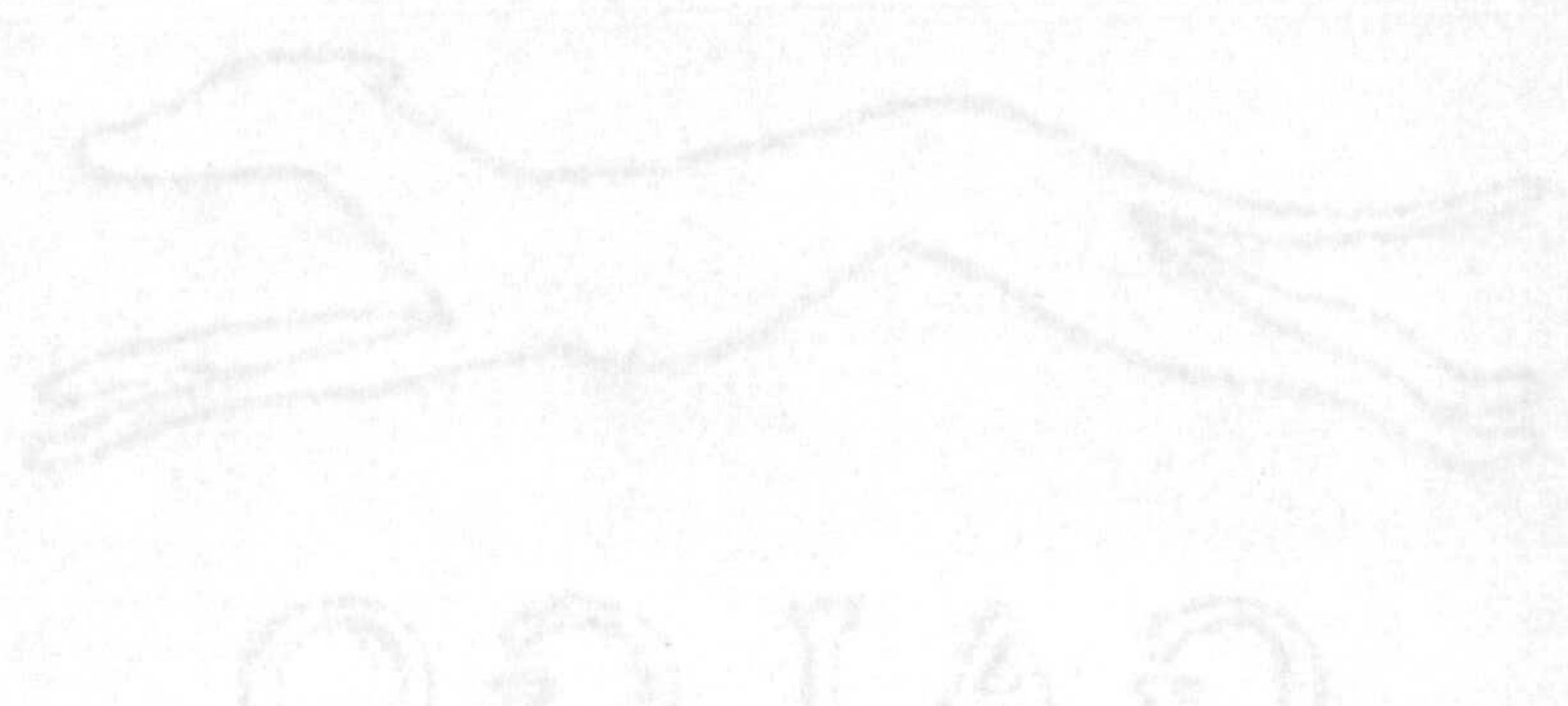


Prof. Dr. Gabriel Cardenete Hernández

La aspirante:



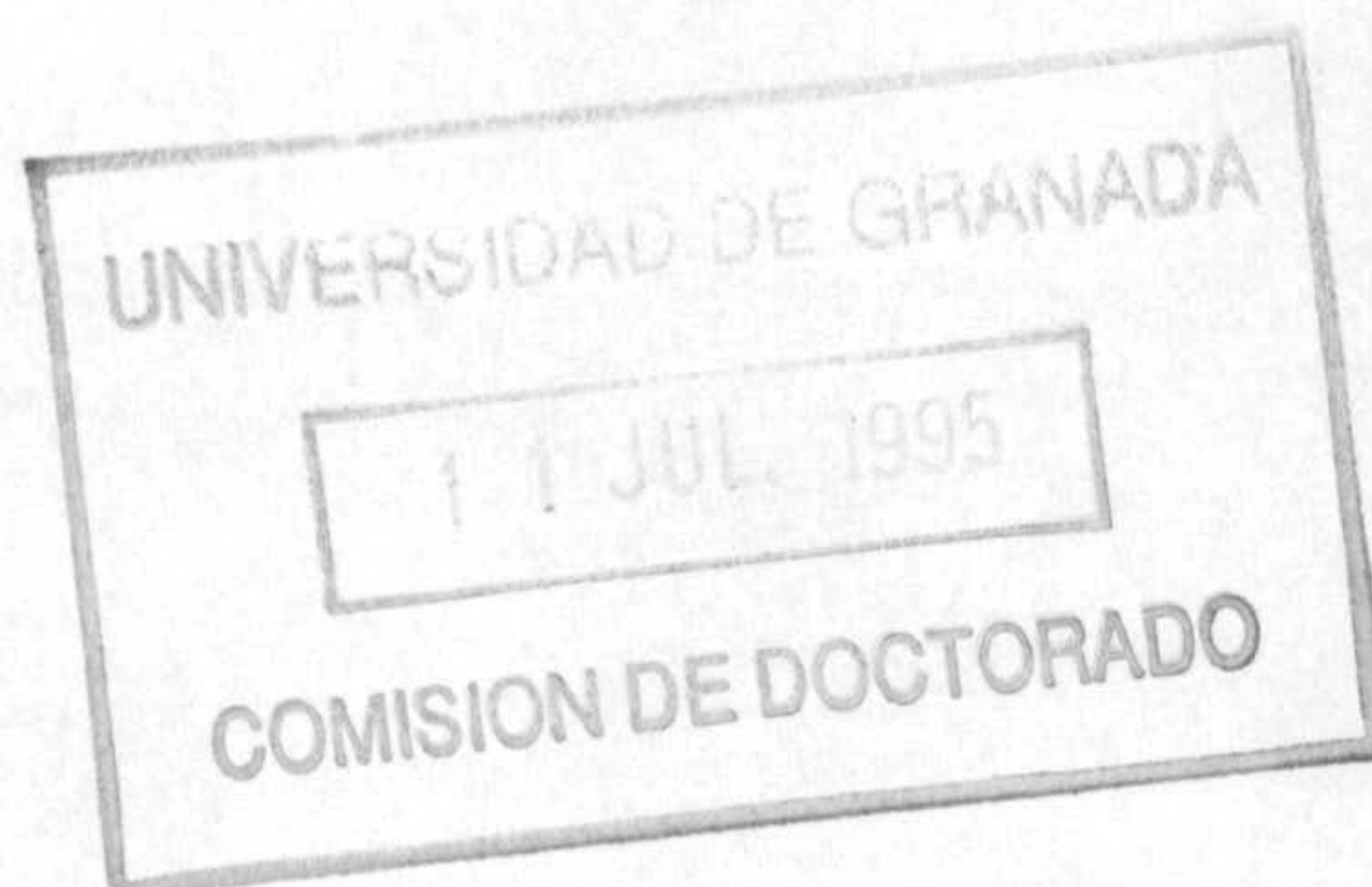
Lda. Anabella Garzón Fernández



Los trabajos de investigación que se exponen en la presente memoria titulada: "Influencia de la encapsulación de la lisina sobre la utilización nutritiva de la proteína de gluten y recambio protéico tisular en la trucha (*O. Mykiss*) y la carpa (*C. carpio*)" han sido realizados en el Departamento de Biología Animal y Ecología de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Prof. Dr. Manuel de la Higuera González y el Prof. Dr. D. Gabriel Cardenete Hernández.

El presente trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación de la CYCIT nº MAR-89-0412.1 titulado "Mejora de la biodisponibilidad de los aminoácidos a emplear en la suplementación de proteínas de baja calidad como estrategia en la formulación de dietas comerciales para peces" y por el nº AGF92-0712-CO2-01 titulado "Influencia de la dieta y de las condiciones ambientales sobre el crecimiento y el comportamiento alimentivo de la trucha en relación con variables funcionales circadianas".

Algunos de los resultados de esta memoria han sido presentados a la comunidad científica en el V Internat. Symp. Fish Nutrition and Feeding celebrado en Santiago de Chile (Chile) en 1992 y en el World Aquaculture '93 celebrado en Torremolinos (España) en 1993.



AGRADECIMIENTOS



GALLO
FARMIN

El trabajo recogido en estas páginas corresponde a varios años dedicada a las tareas de investigación en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal y Ecología; es obvio que esta Tesis no habría podido finalizarse sin el concurso de las personas que componen dicho Departamento. Les expreso mi más sincera gratitud a todos ellos. En particular, quiero agradecer:

- A D. Manuel de la Higuera González su labor continuada al frente de la unidad de Fisiología Animal; gracias a su esfuerzo y apoyo esta Tesis ha llegado a su fin. Le expreso mi sincero reconocimiento por su dedicación y ejemplo en los momentos mas difíciles de realización de este trabajo.

- a D. Gabriel Cardenete Fernández, por su ayuda y ánimo todo este tiempo. Quiero agradecerle que me iniciara en las tareas de investigación del departamento y su preocupación constante por mi formación científica.

- a D. Manuel García Gallego por sus constantes palabras de apoyo y por su amistad; su dedicación a las tareas investigadoras han sido ejemplo y estímulo para todos los becarios del Departamento.

- A D. Félix Hidalgo ,D^a. Ana Sanz Rus, D^a. Laura García Rejón, y D. Eugenio Martín por su amistad y apoyo en el transcurso de la realización de esta Tesis Doctoral.

- A los Dres. M^a del Carmen Hidalgo y Juan Peragón por su participación activa en algunos de los experimentos de esta Tesis

- A D^a. María José Sánchez Muros y D^a. María Dolores Suárez por su amistad. Les agradezco sinceramente su acogida en la Universidad de Almería y su generosidad al permitirme utilizar sus instalaciones.

- A Nani, Miguel Angel, Houda, Consuelo, Toñi y Esmeralda, por su compañerismo y afecto en los trabajos compartidos en el laboratorio que hemos tenido que realizar. Todos guardamos gratos recuerdos de las horas pasadas en el laboratorio.

- A D. Julio y D. Alberto Domezaín Fau, de Piscifactoría Sierra Nevada, S.A., por el suministro de las truchas utilizadas en estos ensayos.

- A D. Juan José Perez Regadera, de la Piscifactoría de Junta de Extremadura, por el suministro de las carpas.

Deseo dar las gracias a mis padres, a mis hermanos y a mi madrina por su confianza en mí y por sus constantes palabras de aliento; este trabajo no habría llegado a su final sin el continuado apoyo de todos ellos y sin el ejemplo ilusionante por el trabajo que siempre me ha dado mi padre.

Finalmente, quiero agradecerle a Antonio, mi marido, su paciencia y comprensión con mi trabajo.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS

A mis padres



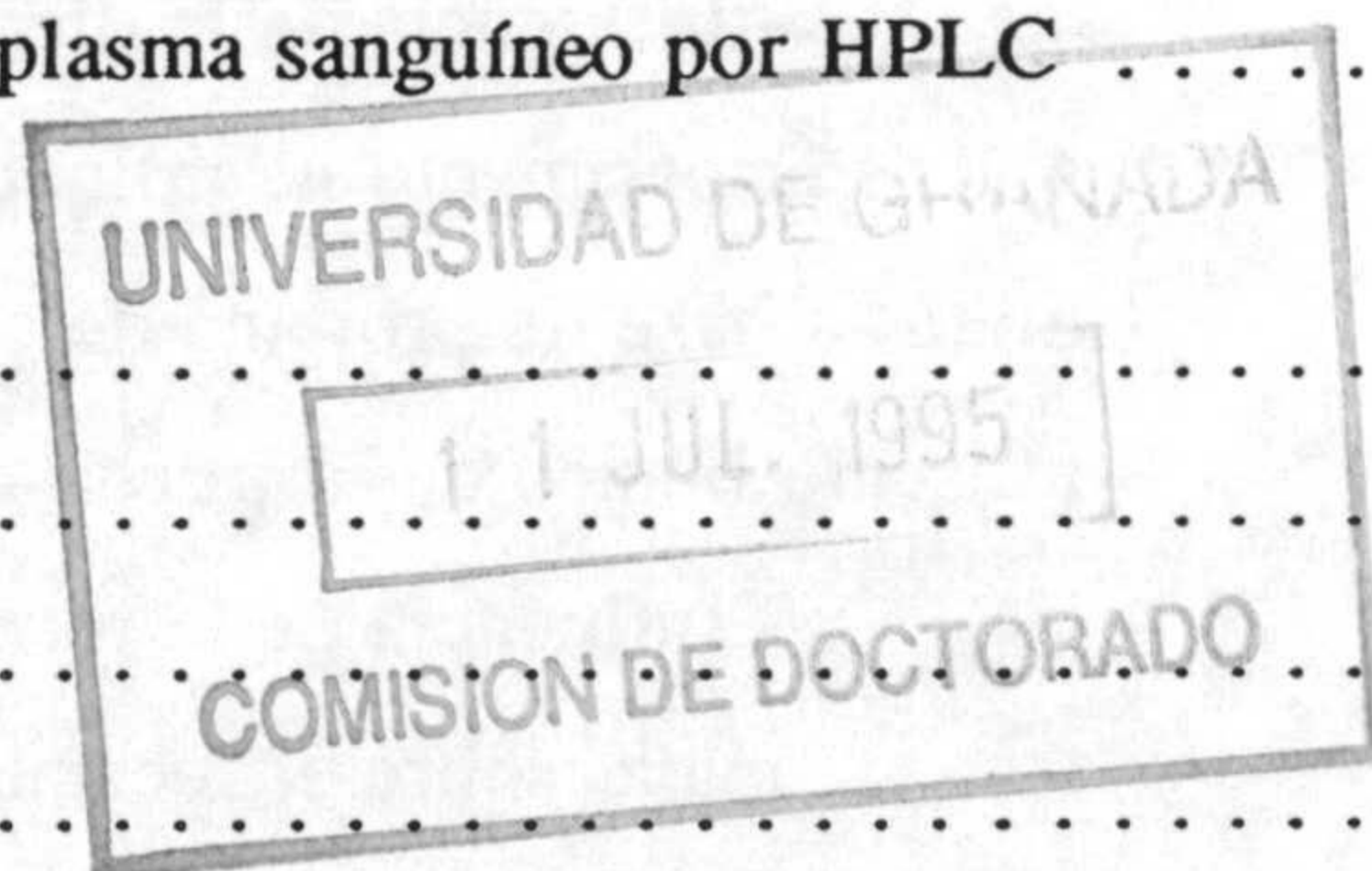
ODIAO
PARCHEMIA

ÍNDICE

1.OBJETO	1
2.REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1.NUTRICION PROTEICA	9
2.1.1.NECESIDADES EN PROTEÍNA DE LOS PECES	9
2.1.2.FACTORES QUE AFECTAN A LAS NECESIDADES PROTEICAS DE LOS PECES	11
2.1.2.1. Optima relación Proteína/Energía de la dieta	11
2.1.2.2. Factores fisiológicos: Edad	13
2.1.2.3. Factores relacionados con el medio:Temperatura	14
2.1.3. NECESIDADES DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES	16
2.1.3.1. Síntomas de deficiencia de aminoácidos	19
2.2. UTILIZACION DIGESTIVA DE LA PROTEÍNA	19
2.2.1. DIGESTIÓN DE LA PROTEÍNA	21
2.2.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LA PROTEÍNA	22
2.2.2.1. Edad	22
2.2.2.2. Composición de la dieta y régimen alimentario	22
2.2.2.3. Factores ambientales: Temperatura	23
2.3. ABSORCION INTESTINAL DE AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS EN PECES	25
2.3.1. MECANISMOS DE ABSORCIÓN CELULAR DE AMINOÁCIDOS Y DIPÉPTIDOS POR EL INTESTINO DE PECES.	25
2.3.2. ABSORCIÓN Y DIGESTIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS	26
2.4. REVISION DE LA DISPONIBILIDAD POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS	27
2.4.1. INTRODUCCIÓN	27
2.4.2.FACTORES RESPONSABLES DE LA VARIACIÓN EN LA DISPONIBILIDAD POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS.	28
2.4.2.1. Disponibilidad postprandial tras la ingesta de una proteína completa.	28
2.4.2.2. Disponibilidad postprandial tras la ingesta de una mezcla de aminoácidos.	29
2.4.2.3. Técnicas de retraso en la absorción de aminoácidos	30
2.4.2.4. Otros factores que influyen sobre la utilización de los aminoácidos ..	32
2.4.2.5. Patrón disponible de aminoácidos como medida de la calidad de la proteína dietaria.	33

2.5. METABOLISMO DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS EN PECES	37
2.5.1. PRINCIPALES VIAS METABÓLICAS DE LOS AMINOÁCIDOS EN PECES	37
2.5.2. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y EXCRECIÓN DE NITRÓGENO	38
2.5.3. EFECTO DE LA CANTIDAD/CALIDAD PROTEICA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS	40
2.5.4. DESTINO METABÓLICO DE LOS AMINOÁCIDOS: RECAMBIO PROTEICO	42
2.5.4.1. Síntesis de proteínas	42
2.5.4.2. Influencia de factores ambientales sobre la síntesis de proteína: Efecto de la temperatura.	44
2.5.4.3. Catabolismo de proteína corporal: Degradación	45
2.6. PROBLEMATICA DE LA NUTRICION PROTEICA EN PISCICULTURA: LA HARINA DE PESCADO COMO FUENTE DE PROTEICA	49
2.7. PROTEINAS ALTERNATIVAS A LA HARINA DE PESCADO	50
2.7.1. PROTEÍNAS DE ORIGEN VEGETAL	51
2.7.1.1. Gluten de maíz	51
2.7.1.2. Otras fuentes proteicas vegetales	52
2.7.1.3. Suplementación de fuentes proteicas con aminoácidos	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS:	55
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	57
3.1.1. OBJETIVO 1: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEINA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, EN DIETAS PARA TRUCHAS.	57
Experimento 1.1.: Utilización nutritiva de la proteína de gluten de maíz	57
Experimento 1.2.: Utilización digestiva de la proteína de la dieta	57
Experimento 1.3.: Dinámica postprandial de aminoácidos	58
Experimento 1.4.: Influencia de la suplementación con lisina libre o encapsulada de dietas a base de proteína gluten de maíz, como fuente proteica mayoritaria, sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la trucha.	58

3.1.2. OBJETIVO 2: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA EN DIETAS PARA CARPAS: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.	59
Experimento 2.1.: Utilización nutritiva de la proteína de gluten de maíz	59
Experimento 2.2.: Utilización digestiva de la proteína de la dieta	60
Experimento 2.3.: Dinámica postprandial de aminoácidos	60
Experimento 2.4.: Influencia de la suplementación de la proteína de gluten con lisina libre o encapsulada sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la carpa	61
3.2. ANIMALES Y MANTENIMIENTO	61
Acuario experimental	62
3.3. DIETAS EXPERIMENTALES	62
3.3.1. Microencapsulación: Fabricación de los microencapsulados	72
3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	75
3.4.1. Control de peso e ingesta	75
3.4.2. Toma y procesamiento de muestras	75
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	76
3.5.1. Análisis de composición	76
3.5.2. Determinación de cromo en dietas y heces	77
3.5.3. Determinación de aminoácidos en materias primas y dietas	77
3.5.4. Determinación de aminoácidos en plasma sanguíneo por HPLC	77
3.6. INDICES BIOLÓGICOS	81
3.6.1. Eficacia del alimento	81
3.6.2. Utilización digestiva	81
3.6.3. Utilización de la proteína	82
3.7. INDICES QUÍMICOS	83



3.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	84
3.8.1. Glutamato deshidrogenasa (GDH)	84
3.8.2. Complejo multicatalítico (MPC)	85
3.9. AMONIACO	87
3.10. DETERMINACIONES RELATIVAS AL TURNOVER: RECAMBIO PROTEICO	88
3.10.1. Medida in vivo de la tasa de síntesis y degradación proteica en tejidos de trucha arcoiris y carpa	88
3.10.2. Determinación del contenido de DNA y RNA tisulares	92
3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
4. RESULTADOS	97
4.1. OBJETIVO 1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, E INCORPORADA EN DIETAS PARA TRUCHAS	99
4.1.1. Experimento 1. Utilización nutritiva de la proteína de gluten de maíz	99
- Efecto de la composición de la dieta sobre la ingesta y el crecimiento	99
- Influencia de la dieta sobre la utilización de la proteína por la trucha	101
- Efecto de la composición de la dieta sobre la composición corporal de la trucha	102
4.1.2. Experimento 2. Utilización digestiva de la proteína de la dieta	103
4.1.3. Experimento 3. Dinámica postprandial de aminoácidos en plasma de truchas alimentadas con dietas a base de gluten suplementado con lisina libre o encapsulada	104
- Influencia de la dieta sobre la actividad GDH de trucha	106
4.1.4. Experimento 4. Influencia de la suplementación con lisina libre o encapsulada de dietas a base de proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la trucha	107
- Influencia de la forma de suplementación con lisina de la proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del hígado en la trucha	107
- Influencia de la forma de suplementación con lisina de la proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del músculo blanco en la trucha	109

Influencia de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad del complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC) de la trucha	109
--	-----

4.2. OBJETIVO 2. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, E INCORPORADA EN DIETAS PARA CARPAS	112
---	-----

4.2.1. Experimento 1. Utilización nutritiva de la proteína de gluten de maíz	112
--	-----

- Efecto de la composición de la dieta y de la temperatura sobre la ingesta y el crecimiento	112
--	-----

a) Carpas mantenidas a 18 °C	112
--	-----

- Utilización nutritiva de la proteína de las dietas (CEC y VPH)13	
--	--

b) Carpas mantenidas a 25 °C	115
--	-----

- Utilización nutritiva de la proteína de las dietas (CEC y VPH)15	
--	--

c) Diferencias de cada dieta respecto a la temperatura	117
--	-----

- Efecto de la composición de la dieta sobre la composición corporal de la carpa18	
--	--

4.2.2. Experimento 2. Utilización digestiva de la proteína de la dieta	118
--	-----

4.2.3. Experimento 3. Dinámica postprandial de aminoácidos en plasma de carpas alimentadas con dietas a base de gluten suplementado con lisina libre o encapsulada	120
--	-----

- Influencia de la dieta sobre la actividad GDH de carpa	121
--	-----

4.2.4. Experimento 4. Influencia de la suplementación con lisina libre o encapsulada de dietas a base de proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la carpa	126
--	-----

Carpas mantenidas a 18 °C

a) Influencia de la dieta sobre el recambio proteico hepático de carpas mantenidas a 18 °C	126
--	-----

b) Influencia de la calidad proteica sobre el recambio proteico en el músculo blanco de carpa a 18°C	128
--	-----

Carpas mantenidas a 25 °C

a) Influencia de la dieta sobre el recambio proteico hepático de carpas mantenidas a 25 °C	129
--	-----

b) Influencia de la forma de suplementación de la proteína de gluten sobre el recambio proteico en el músculo blanco de carpas mantenidas a 25°C	128
--	-----

Diferencias debidas a la temperatura para un mismo tipo de dieta	133
--	-----

c) Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad del complejo multicatalítico (MPC)	133
Actividad PGPH	133
Actividad CT-L	134
Actividad T-L	134
5. DISCUSIÓN	139
5.1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, EN DIETAS PARA TRUCHAS	141
5.2.1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, EN DIETAS PARA CARPAS MANTENIDAS A 18 °C	144
5.2.2. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, EN DIETAS PARA CARPAS MANTENIDAS A 25 °C	146
5.3. INFLUENCIA DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA DIETA Y DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH) EN HÍGADO DE TRUCHA Y CARPA	148
5.4.1. DINÁMICA POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA DE TRUCHA	150
5.4.2. DINÁMICA POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA DE CARPA	153
5.5. INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE PROTEÍNA DE GLUTEN CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA SOBRE EL RECAMBIO PROTEICO EN HÍGADO Y MÚSCULO BLANCO DE LA TRUCHA Y DE LA CARPA	158
5.5.1. Influencia de la temperatura sobre el recambio proteico hepático y muscular de la carpa	158
5.5.2. Recambio proteico hepático y muscular en trucha y carpa	160
5.5.3. Influencia de la deficiencia de lisina sobre el recambio proteico hepático y muscular de trucha y carpa	161

5.5.4. Influencia de la suplementación de la proteína de gluten de maíz con lisina libre o microencapsulada sobre las actividades proteásicas del complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC), en la trucha y en la carpa	169
6. CONCLUSIONES	177
7. REFERENCIAS	183

OBJETO

Como respuesta a la problemática del sector pesquero, en las dos últimas décadas se ha incentivado enormemente el interés científico y técnico por el desarrollo de la acuicultura. La disminución del acceso y rendimiento de los caladeros habituales no sólo atenta a la oferta de pescado para consumo humano directo, sino que esa menor disponibilidad también afecta a la producción de harinas de pescado destinadas a la fabricación de piensos, siendo la piscicultura especialmente exigente en cuanto a la inclusión de esta fuente proteica en dietas comerciales. Esta circunstancia viene impulsando a la valoración de la calidad nutritiva de fuentes proteicas alternativas que mantengan altas tasas de crecimiento y rentabilidad. Una alta proporción de los gastos de producción es debida a la alimentación y, a su vez, la proteína es el nutriente que más condiciona el precio final de la fórmula. A la problemática de la disponibilidad de harina de pescado se suma su elevado precio; sin embargo, su calidad nutritiva, como aporte de aminoácidos esenciales en cantidad y proporciones adecuadas y suministro de otros nutrientes esenciales, además de sus características organolépticas, justifica su inclusión en dietas para peces. La sustitución de harinas de pescado por otras fuentes proteicas es, por tanto, difícil pero no deja de ser un reto de extraordinario interés nutritivo, estratégico y económico.

Existen una serie de criterios para seleccionar fuentes proteicas de posible inclusión en dietas comerciales para peces. Si el porcentaje de proteína óptimo, que demanda la mayoría de las especies de interés económico, ronda el 50%, parece obvio que el conjunto de los ingredientes proteicos deba superar ampliamente esa concentración, para dar cabida en la fórmula a otros componentes habituales. El principal criterio, desde el punto de vista nutritivo, es el aporte de aminoácidos esenciales en cantidades y proporciones que sustenten máximo crecimiento. Ambas características, cantidad y calidad de la proteína de la dieta, están, a su vez, relacionadas y, dentro de ciertos límites, una deficiencia en calidad puede compensarse con un mayor aporte proteico. La cantidad de proteína debe minimizarse en función del aporte energético de la dieta y, en este sentido, la grasa y los hidratos de carbono ejercen un cierto papel de ahorro proteico. Pero la cantidad de aminoácidos disponibles para crecimiento depende no sólo del contenido proteico de la dieta y de la aceptabilidad que ésta tenga sino de su utilización digestiva. Una proteína puede suministrarse en cantidades teóricamente adecuadas y con un patrón aminoacídico óptimo pero si su digestibilidad es baja, la disponibilidad postprandial de aminoácidos no será suficiente para producir crecimientos máximos.

Los criterios de calidad proteica, independientemente de su utilización digestiva, son variados en su expresión, pero coinciden básicamente en la valoración del aporte de aminoácidos esenciales en relación a las necesidades del animal. Aunando los distintos criterios de calidad, se puede establecer el planteamiento general de que la utilización de la proteína de la dieta para crecimiento depende, en último término, de la disponibilidad (cuantitativa y cualitativa) de un patrón adecuado de aminoácidos, esenciales y no esenciales,

en los lugares de síntesis proteica. Además, el tiempo en que ese patrón permanece disponible puede ser controlado a nivel de estrategia alimentaria y tecnologías especiales que modulen la utilización y disponibilidad temporal de la proteína y aminoácidos de la dieta.

La elevada concentración de proteína en dietas para peces dificulta el uso de fuentes proteicas no animales, debido a su bajo contenido proteico. Por otra parte, los subproductos de origen animal, por su baja calidad nutritiva, difícilmente sustituyen a la harina de pescado. Cada vez es más frecuente en el mercado la presencia de concentrados proteicos de origen vegetal, la mayoría con desequilibrios en su composición aminoacídica que los hacen más o menos deficientes en aminoácidos esenciales, siendo la lisina y la metionina los más frecuentemente limitantes. Su empleo, en fórmulas para peces, resulta atractivo por ser potencialmente abundantes, baratos y de producción menos incierta que las harinas de pescado. La respuesta lógica a dichas deficiencias, por ser la habitual en nutrición animal, es la suplementación de la proteína deficiente con los correspondientes aminoácidos. Una primera dificultad en la suplementación con aminoácidos libres es que, para muchas especies de peces, las tasas de crecimiento obtenidas con dietas que contienen aminoácidos libres, para suplementar una proteína deficiente y aquellas empleadas en la determinación de necesidades de aminoácidos esenciales, son generalmente inferiores a las obtenidas con dietas de composición aminoacídica similar pero en forma de proteína.

Una posible explicación, al menos para peces de alimentación lenta o con dietas húmedas, es la disolución y pérdida en el medio de los aminoácidos libres de la dieta. Sin embargo, la explicación por la que hemos optado para plantear nuestra hipótesis de trabajo es la más rápida y masiva absorción intestinal de los aminoácidos libres de la dieta, que precede a la de los procedentes de la digestión proteica. Esa más temprana disponibilidad plasmática crearía una notable desproporción en las cantidades relativas de los aminoácidos del "pool" endógeno, especialmente cuando se trata de la suplementación proteica con aquellos aminoácidos en que es deficitaria. El exceso de aminoácidos, respecto al patrón de uso para crecimiento y mantenimiento corporal, conduce a su catabolismo, para mantener el equilibrio homeostático del "pool", todo lo cual resulta en una merma significativa del patrón aminoacídico para síntesis proteica, en términos cuantitativos y cualitativos, ambos estrechamente interrelacionados.

Cuando se trata de la adición de aminoácidos libres, para suplementar proteínas deficientes y así mejorar su calidad nutritiva para crecimiento, la citada prematura disponibilidad del aminoácido suplementado provocaría su catabolismo, con lo que, al absorberse los aminoácidos procedentes de la digestión proteica, la deficiencia persiste, en mayor o menor grado.

La utilización para crecimiento de dietas suplementadas con aminoácidos libres no tiene el mismo efecto en distintas especies. Además de las características anatómo-fisiológicas del pez, p.e. la presencia o no de un estómago regulador del paso de alimento, con un papel

de almacenamiento y una clara acción digestiva sobre la dieta, puede condicionar el momento en que los aminoácidos de la dieta, libres o productos de la digestión proteica, alcancen el epitelio intestinal y sean significativamente absorbidos. Es el caso de especies con un claro régimen carnívoro y con presencia de un verdadero estómago, frente a especies de alimentación omnívoro-herbívora en las que el estómago no regula el paso de alimento, el tubo digestivo es más largo y mayor la frecuencia de alimentación. Por otra parte, la temperatura, asociada o no al régimen de alimentación, debe influir sobre procesos activos y de permeabilidad de membrana como para condicionar velocidad de digestión proteica y absorción de aminoácidos.

Un primer objetivo de este trabajo es la valoración de la captación digestiva y aparición postprandial de la lisina empleada en la suplementación de proteína de gluten de maíz, tras la ingestión de dietas que incluyen o no lisina libre, para establecer una diferente disponibilidad en el tiempo que justifique la menor utilización de dietas a base de aminoácidos libres, de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo. Estos primeros ensayos contemplan, además, la valoración de dietas en las que la lisina suplementada está cubierta por cápsulas de diferente composición, con el objeto de que este aminoácido no se libere hasta que las cubiertas sean digeridas, retrasando así la absorción de la lisina suplementada. La demostración de la validez de esta estrategia será, por tanto, la base de diseños experimentales dirigidos a valorar no sólo la utilización nutritiva de la dieta para crecimiento, sino la influencia de la disponibilidad de aminoácidos sobre el turnover proteico (hepático y muscular) y la vía final común del catabolismo de los aminoácidos (actividad GDH).

Es indudable que una mejora de la disponibilidad temporal del aminoácido (s) suplementado (s), en términos de coincidencia con los precedentes de la digestión proteica en los lugares de síntesis de proteínas, mejoraría el patrón específico requerido por el animal para crecimiento óptimo. La demostración de esta posibilidad abriría un amplio horizonte en el campo de las fuentes proteicas alternativas, aportando soluciones generales a la problemática existente en torno a sus limitaciones de inclusión en dietas comerciales. Aportar soluciones, en base a la hipótesis general de nuestro trabajo, ya planteada, creemos que sobradamente justifica la realización de este trabajo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



2.1. NUTRICIÓN PROTEICA:

La proteína es uno de los componentes que más interés y problemática presentan en el diseño y formulación de dietas para peces y crustáceos. Desde un punto de vista práctico, al ser la proteína el componente que más afecta al costo final de la fórmula dietaria, muchos autores consideran las dietas de alta concentración proteica una limitación a la rentabilidad del cultivo de estos animales (Pandian y Vivekanandan, 1985; Knights, 1985). Todo diseño de dietas, para producción animal intensiva, debe procurar el máximo ajuste económico y nutritivo de la fórmula. Es por ello que uno de los principales objetivos sea minimizar el aporte proteico, en calidad y precio, optimizando la retención proteica / crecimiento, lo que supone establecer necesidades y valorar fuentes de proteína de inclusión alternativa según precio y disponibilidad de mercado.

Las necesidades proteicas, consideradas como la mínima cantidad de proteína necesaria para conseguir un máximo crecimiento, son, realmente, la suma de las necesidades de aminoácidos esenciales y no esenciales, constituyendo, en conjunto, un patrón específico y cuantitativamente adecuado a una síntesis proteica eficaz, en unas coordenadas de tiempo que son función del diseño y administración de la dieta. Paralelamente a intentar conseguir las mejores condiciones de síntesis proteica, se debe minimizar el destino energético de los aminoácidos a través de un ajuste, a la baja, de la relación proteína/energía, en la que lípidos e hidratos de carbono juegan un papel fundamental (De la Higuera y Cardenete, 1993).

2.1.1. NECESIDADES EN PROTEÍNA DE LOS PECES

En un régimen de producción, la proteína que el pez ingiere en su dieta es utilizada con fines de mantenimiento de sus funciones vitales y crecimiento o síntesis de nuevas estructuras corporales. De las funciones de mantenimiento, la síntesis de proteínas funcionales y el mantenimiento de procesos biológicos básicos, no pueden modificarse sin consecuencias negativas; sin embargo, otros destinos distintos del crecimiento, como la utilización energética y gluconeogénica de los aminoácidos, hasta cierto punto pueden y deben ser controlados. El uso relativo de los aminoácidos con diversos fines, dependerá no sólo de la calidad y cantidad de la proteína dietaria, sino del ajuste de ese delicado balance que constituye la relación proteína/energía.

Las necesidades proteicas para crecimiento se definen como la mínima cantidad de este nutriente que sustenta un crecimiento óptimo. Para su determinación se han venido empleando dietas, con mayor o menor acierto, que, básicamente, incluyen proteínas de alta calidad o una combinación de proteína y aminoácidos que, presumiblemente, cubren las necesidades esenciales de la especie en estudio. En líneas generales, los ensayos se llevan a cabo con animales jóvenes, en crecimiento activo y durante un periodo suficientemente largo como para que los efectos de la dieta sobre el crecimiento se definan claramente. La relación

causa-efecto entre contenido proteico y ganancia de peso o, incluso, sobre índices de conversión de alimento, se manifiesta frecuentemente de forma hiperbólica. Las necesidades proteicas quedan fijadas, para respuestas en meseta, por la intersección entre la línea de dicha meseta y la prolongación de la porción lineal inicial de la curva; siendo deseable que el ajuste de las líneas sea bueno desde el punto de vista estadístico.

A pesar de los diferentes diseños experimentales, en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se han obtenido datos de necesidades relativamente próximos, en torno al 35-50 % de la dieta, que dependen del estado de desarrollo. Y para la carpa entre el 30 y el 40%. En la Tabla 2.1 presento algunos de ellos.

Tabla.2.1. Necesidades de proteína, para la trucha arco iris y carpa, expresadas como porcentaje de la dieta en sustancia seca.

Necesidades (% Prot)	Temperatura °C	Referencia Bibliográfica
Trucha: 45	10	Halver et al., 1974
40-45	9-12	Zeitoun et al., 1973
40	16-27	Satia, 1974
40	15	Cho et al., 1976
42	8-18	Austreng y Refstie, 1979
44-48	-	Tiews et al., 1976
50	-	Zeitoun et al., 1976
44	-	Austreng, 1978
36-49	-	Takeuchi et al., 1978
50	-	Lall y Bishop, 1979
35	-	Watanabe et al., 1979
Carpa: 35	23-28	Jauncey, 1981
38	23	Jauncey, 1981
38	23	Ogino y Saito, 1970

En general, los valores de las necesidades de proteína, obtenidas para algunas especies de peces, oscilan entre el 35 y el 55% de proteína. Pero hay que tener en cuenta que el nivel óptimo de proteína en la dieta se ve condicionado por una serie de factores, que estudiaremos

en profundidad más adelante, relacionados con el animal (factores fisiológicos), las condiciones de cultivo (régimen de alimentación, ingesta, etc) y la propia dieta. En relación a la composición de la dieta hay que prestar especial atención al aporte de energía no proteica, que permita valorar secuencias de dietas de distinta relación proteína/energía y, por supuesto, a la calidad de la proteína ensayada (proteínas purificadas o semipurificadas, solas o en combinación, o con adición de algunos aminoácidos libres). Todo ello ha provocado la obtención de distintos valores de necesidades para una misma especie de pez y hacen difícil la obtención de valores comparables (Cowey y Luquet, 1983; Tacon y Cowey, 1985).

Actualmente, y en función de datos corregidos por sucesivos ajustes de la relación P/E y otros factores que afectan a las necesidades proteicas se ha pasado de unas necesidades del 40-45 % y 30-38 % para la trucha y carpa respectivamente, a valores del 33-42% y 30-35% (Watanabe et al., 1989) respectivamente. Más adelante insistiremos en la importancia y consecuencia de establecer una adecuada relación Proteína / Energía.

2.1.2. FACTORES QUE AFECTAN A LAS NECESIDADES PROTEICAS DE LOS PECES:

Además de las influencias obvias que la especie en sí y la calidad de la proteína dietaria ejercen sobre las necesidades proteicas, existen una serie de factores capaces de modificar dichas necesidades para una determinada especie. Estos factores se relacionan con la dieta (relación Proteína/Energía, régimen de alimentación) características fisiológicas del animal (edad/tamaño, reproducción) y determinadas condiciones del medio (temperatura, salinidad, etc).

2.1.2.1. Optima relación proteína/energía de la dieta

Como ya se comentó, la cantidad óptima de proteína en la dieta viene dada, además de por la calidad proteica, por el equilibrio entre proteína y energía. El rendimiento proteico está estrechamente relacionado con un óptimo balance de Proteína / Energía, que pretende minimizar el destino energético y gluconeogénico de los aminoácidos, aumentando simultáneamente los índices de retención proteica y, por tanto, mayores tasas de crecimiento (Cowey, 1979, 1981).

En los peces, el destino energético de la proteína dietaria alcanza niveles importantes, lo que condiciona un bajo rendimiento en la retención neta de nitrógeno (30-40%), (Brett y Groves, 1979; Cowey y Sargent, 1979). Los posibles sustitutos energéticos no proteicos, para reducir el gasto calórico o uso energético de la proteína dietaria, son los hidratos de carbono (dextrinas y almidón) y los triglicéridos (Ogino et al., 1975; Andrews et al., 1978; Cho y Kaushik, 1985). Se sabe que la capacidad de los peces para utilizar los

carbohidratos es menor que en animales terrestres (Cowey y Luquet, 1983), y que su utilización difiere entre las distintas especies (Kaushik y Gomes, 1988).

En Salmónidos, los hidratos de carbono pueden sustituir en parte a la fracción proteica aportando energía, pero son peor utilizados que la grasa y que la proteína (Murai et al., 1980; Hilton y Slinger, 1981); además de su baja digestibilidad, afectan la absorción de otros componentes de la dieta (Spannhof y Plantikow, 1983). En los últimos años se han ensayado distintos tratamientos tecnológicos sobre las fuentes de hidratos de carbono que han mejorado su disponibilidad para la trucha (Bergot, 1979a,b; Kaushik et al., 1988, 1989). Es conocido que cualquier mejora de la energía digestible de la dieta permite incrementar la eficacia de la retención proteica (Kaushik y Oliva-Teles, 1985).

En peces omnívoros como la carpa, la actividad intestinal de la amilasa es más alta que en peces carnívoros, por ello utilizan mejor los hidratos de carbono, pudiendo alcanzar niveles en la dieta entre 30-40% (Takeuchi et al., 1979a; Satoh, 1991), a la vez que la óptima relación P/E es menor (Cho, 1983; Takeuchi et al., 1979b). En la carpa la digestibilidad del almidón gelatinizado es alta y no le afecta el nivel en la dieta, incluso lo utiliza más eficientemente que la dextrina o la glucosa (Furuichi y Yone, 1982).

La mejor utilización digestiva y metabólica de los lípidos hace que sean la fuente energética alternativa de elección en la formulación de dietas para peces, ya que aumentan las tasas de conversión de alimento e índices de retención proteica para crecimiento (de la Higuera et al., 1977; Watanabe, 1977; Takeuchi et al., 1978, 1979; Cardenete et al., 1986) y producen, paralelamente, una menor excreción de amoníaco (Atherton y Aitken, 1970; García et al., 1981; Cardenete, 1983), así como una disminución del consumo de oxígeno (Cho et al., 1982).

A pesar de ello, la proteína debe aportar entre el 45-70% de la energía total de las dietas para peces, debido al uso preferente de la proteína frente a los hidratos de carbono y la grasa (Tacon y Cowey, 1985). De la mayoría de los estudios realizados se puede deducir:

- a.- La relación P/E es superior en dietas para peces respecto a las de otros vertebrados de interés económico.
- b.- Existen diferencias entre las óptimas relaciones P/E, para distintas especies de peces, siendo normalmente superiores en los carnívoros más estrictos.
- c.- La relación P/E óptima varía, entre otras causas, con la edad, tamaño y régimen de producción.
- d.- Existe una relación inversa entre rentabilidad, o eficacia de conversión proteica, y relación P/E dietaria.
- e.- Los peces obtienen más energía de la proteína que otros animales, al ahorrarse el coste energético de sintetizar, concentrar y excretar compuestos nitrogenados más complejos.
- f.- Los peces regulan su ingesta calórica, dentro de ciertos límites. El concepto de relación

P/E debe restringirse a dietas adecuadas en proteína y energía.

g.- Lo que parecen ser altas necesidades proteicas son, realmente, bajas necesidades calóricas.

Dado que los peces, comen para satisfacer sus necesidades energéticas, es muy importante que las dietas tengan niveles adecuados de proteína y energía; al mismo tiempo que un adecuado equilibrio entre proteína, grasa e hidratos de carbono en la dieta (Cowey y Sargent, 1979; Austreng y Refstie, 1979; De la Higuera y Cardenete, 1987). Un exceso de energía no proteica (E digestible / E proteica) detiene la ingesta antes de que se consuma suficiente cantidad de proteína, (Page y Andrews, 1973; Peter, 1979). Dietas con un nivel de proteína por encima de las necesidades y un bajo contenido en energía no proteica, se traducen en un mayor gasto energético y gluconeogénico de los aminoácidos (Cowey, 1979), provocando bajos índices de crecimiento y, por tanto, baja rentabilidad económica (Cowey, 1981). En la Tabla 2.2 se indican algunos valores que, para la relación P/E, han sido obtenidos, para la trucha y carpa, en distintas condiciones de investigación.

Tabla 2.2. Valores óptimos de Proteína / Energía, en dietas para truchas y carpas.

Temperatura °C	Peso (g)	P/E (g Prot./ Mj)	Referencia
Trucha: 12	5	27.1-34.3 B	Lee y Putnam, 1973
11-14	15	24 B	Takeuchi et al., 1978
7-15	1-90	26.6-33.3 B	Cho, 1983
Carpa: 7-15		20-25 D	Cho, 1983
24		21-23 D	Takeuchi et al., 1979

En cualquier caso, es deseable prolongar la valoración de necesidades con estudios de estimación de la óptima relación proteína/energía, donde se evalúen dietas de distinto contenido energético para cada nivel proteico, al objeto de tener una mayor aproximación a las necesidades proteicas reales de una especie determinada.

2.1.2.2. Factores fisiológicos: Edad

Las necesidades de proteína son edad/tamaño dependientes, los individuos más jóvenes necesitan mayor concentración de proteínas en la dieta que los de mayor tamaño (Satia, 1974; Cho et al., 1985; Vergara, 1992). Este efecto se relaciona con la disminución de la capacidad de síntesis proteica corporal a lo largo del desarrollo, que supone una progresiva menor velocidad de crecimiento (Fauconneau, 1985; Houlihan et al., 1986; Peragón, 1993).

A lo largo de la vida del pez, se producen cambios ontogenéticos que determinan las distintas necesidades proteicas. Estos cambios están relacionados con la variación de la

morfología y fisiología del tracto digestivo, aspectos del metabolismo intermediario, tasa de síntesis proteica y tasa de crecimiento corporal (Murai et al., 1989).

Las necesidades proteicas disminuyen con la edad o tamaño de los peces, dedicando éstos una menor cantidad de proteína para el crecimiento, (Murai et al., 1989). Con la menor edad y tamaño del pez, la mayoría de la proteína será utilizada para la síntesis de nuevas estructuras proteicas, en definitiva, para el crecimiento.

La trucha requiere aproximadamente entre el 40-50% de proteína en su dieta, dependiendo de su estado de desarrollo, para óptimo crecimiento y utilización proteica (Satia, 1974; Zeitoun et al., 1976; Tiews et al., 1976). La concentración de proteína en dietas para la mayoría de los salmónidos varía según el estado de desarrollo: del 45-50% para alevines, los juveniles requieren alrededor del 40 % y, al año, las necesidades bajan hasta situarse en torno al 35 % (Hilton y Slinger, 1981; NCR, 1981).

Por último, comentar que la selección de razas puede dar lugar a una modificación de las necesidades proteicas de una determinada especie, para crecimiento y rentabilidad óptimos. Estudios con distintas familias de trucha arcoiris han demostrado diferencias significativas en cuanto a crecimiento y utilización nutritiva de dietas de distinto contenido proteico (Austreng y Refstie, 1979; Ming, 1985).

2.1.2.3. Factores relacionados con el medio: Temperatura

Ya desde los primeros estadios de desarrollo, la temperatura afecta a la utilización de los nutrientes. La utilización de las reservas del huevo, así como el desarrollo embrionario, están influenciados por la temperatura (Heming, 1982; Kamler y Kato, 1983); de hecho, la duración del desarrollo embrionario se mide en términos de grados/día. En la mayoría de las especies, la actividad metabólica de las primeras fases de desarrollo se correlaciona directamente con la temperatura y, en consecuencia, las reservas se consumen más rápidamente, dando como resultado alevines de menor peso (Heming et al., 1982).

Los peces, al igual que otros vertebrados, regulan su ingesta calórica a través de mecanismos fisiológicos poco conocidos, que involucran al hipotálamo (Savage y Roberts, 1975). La ingesta voluntaria de alimento se afecta considerablemente por la temperatura que, a su vez, modifica directamente la actividad metabólica de estos animales por su condición de poiquiloterms. Por otra parte, existen datos demostrativos de que la ingesta total aumenta con la temperatura; sin embargo, hay poca información disponible acerca de las necesidades nutritivas de los peces en función de este parámetro ambiental.

En cuanto a las necesidades energéticas, Cho y Slinger (1980) demostraron el aumento de las necesidades calóricas de mantenimiento con la temperatura. Previamente, se había observado que el primer efecto de un aumento de la temperatura es una mayor ingesta (Brett

et al., 1969), que se acompaña de una mayor velocidad de tránsito intestinal (Possompes et al., 1975), cuyo efecto negativo sobre la utilización digestiva de la dieta no ha sido demostrado (Cho, 1979). Por el contrario, Choubert et al. (1982) encontraron un aumento de la eficacia digestiva, para la energía y proteína de la dieta, cuando la temperatura aumentó de 10 a 18 °C y, posteriormente, Cho et al. (1982) observaron un pequeño aumento de la relación energía retenida/energía digestible (de 49 a 53%) al aumentar la temperatura de 10 a 15 °C.

En relación a las necesidades de proteína total, los primeros estudios, realizados en el salmón (*O.tshawytscha*), demostraron un aumento de las necesidades con la temperatura, de un 40% a 7°C a un 50% a 15°C, (DeLong et al., 1958; Millikin, 1983) que no ha sido observado en especies próximas como la trucha arcoiris (*O.mykiss*), en ensayos que abarcan desde los 9 a los 18 °C (Slinger et al., 1977; Cho y Slinger, 1978, NCR, 1981). No obstante, las necesidades absolutas de proteína aumentan con la temperatura como consecuencia de una mayor ingesta. La temperatura (15 y 20 °C) tampoco modifica las necesidades de proteína de la lubina (50% de la dieta), cuando se consideran el incremento de peso y la conversión del alimento como respuesta. Sin embargo, si se atiende a los datos de utilización nutritiva de nutrientes y energía, una dieta con el 40% de proteína puede ser adecuada para ambas temperaturas, según Hidalgo y Alliot (1988).

Cho et al., 1985; Tacon y Cowey, 1985 están a favor de la invariabilidad de las necesidades proteicas con la temperatura, y se podrían citar ensayos en los que no se observan cambios en la relación deposición de proteína/síntesis proteica, turnover proteico corporal o catabolismo oxidativo en relación a la temperatura (Fauconneau, 1985). De acuerdo con Cowey y Luquet (1983) no existe una clara indicación de que la relación proteína/energía de la dieta deba ser alterada frente a variaciones en la temperatura del agua. En cualquier caso, y teniendo en cuenta el papel energético de los lípidos, hay que considerar en la fórmula, en relación a la temperatura ambiental, su distinta utilización digestiva en función del punto de fusión (Takeuchi et al., 1979; Austreng et al. 1980) y el papel que, en relación a la temperatura, juegan los ácidos grasos condicionando su esencialidad como mecanismo adaptativo a distintas condiciones ambientales. No obstante, Cho et al., 1982, no encuentra diferencias en el coeficiente de digestibilidad aparente de la grasa a distintas temperaturas.

Futuras investigaciones deberían plantearse la conveniencia de profundizar en el conocimiento de la interacción temperatura-necesidades nutritivas y temperatura-utilización metabólica de nutrientes, pues no se disponen de datos tan básicos como, por ejemplo, máxima conversión de alimento e índices de crecimiento para distintas temperaturas. Además, se sabe que cada especie tiene una temperatura óptima de crecimiento y utilización nutritiva de la dieta, pero se desconoce si razas, manipulaciones cromosómicas o, simplemente, adaptaciones a diferentes regiones, tienen temperaturas óptimas distintas.

2.1.3. NECESIDADES DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES

Cuando hablamos de requerimientos proteicos, nos estamos refiriendo, en esencia, a la suma de las necesidades de cada uno de los aminoácidos esenciales, junto a un aporte nitrogenado no esencial que, normalmente, queda cubierto por los aminoácidos no esenciales, presentes en las fuentes proteicas empleadas en la formulación de la dieta (De la Higuera, 1987).

La esencialidad de un aminoácido significa que no puede ser sintetizado por el organismo y, en consecuencia, debe ser aportado en la dieta. La determinación de ese carácter de esencialidad se ha basado en ensayos en los que se valora la influencia que, sobre el crecimiento y conversión de alimento, tiene la ingesta prolongada de una dieta deficiente en un determinado aminoácido. La ausencia de un aminoácido esencial se traduce en una detención del crecimiento. Por este procedimiento se ha establecido la esencialidad de los siguientes 10 aminoácidos para los peces: Arg, His, Ileu, Leu, Lys, Met, Phe, Treo, Trp y Val, (ver revisiones de Wilson, 1985; Tacon y Cowey, 1985).

El ajuste de una dieta a las necesidades de aminoácidos y proteína, de una determinada especie de pez, hace necesaria la determinación experimental de las necesidades cuantitativas de cada uno de los diez aminoácidos esenciales y las posibles interacciones y antagonismos entre ellos.

Las necesidades cuantitativas se han venido estableciendo mediante la obtención de curvas dosis-respuesta (al igual que las necesidades de proteína) y aunque hay métodos alternativos, basados en las concentraciones plasmáticas del aminoácido en estudio (y otros criterios que después comentaremos), las necesidades siguen basandose en la respuesta de ganancia de peso frente a concentraciones crecientes (dosis) del aminoácido en las dietas experimentales. La mínima concentración de un determinado aminoácido, que sustenta máximo crecimiento, equivale al concepto de necesidades cuantitativas de ese aminoácido.

También se ha asumido como aproximación a las necesidades cuantitativas de aminoácidos esenciales, la composición de la proteína corporal del animal (Runsey y Ketola, 1975; Ogino, 1980). Asimismo, la incorporación diaria de cada aminoácido esencial al tejido del pez, durante el crecimiento, se ha empleado como método de aproximación al patrón de aminoácidos requerido (Ogino, 1980). Más tarde, Ketola (1982) propuso utilizar la composición en aminoácidos del huevo de la especie estudiada, como base para la formulación de una dieta patrón para iniciar estudios de necesidades nutritivas de aminoácidos esenciales.

Datos de composición corporal o tisular de aminoácidos pueden servir de aproximación a las necesidades de aminoácidos. Arai (1981) propone la proporción aminoácido esencial/suma de aminoácidos esenciales del cuerpo de la especie de que se trate.

Ogino (1980) determinó las necesidades de la trucha arcoiris y carpa común, en base a la incorporación corporal diaria de cada aminoácido esencial. De acuerdo con este método, las necesidades de la trucha y la carpa serían, respectivamente: 4.1, 4.4 de leucina; 2.3, 2.4 isoleucina; 2.9, 3.1 valina; 3.3, 3.4 treonina; 2.9, 3.1 fenilalanina; 2.0, 2.1 tirosina; 1.6, 1.8 metionina; 0.8, 0.9 cistina; 0.6, 0.5 triptófano; 3.8, 3.5 arginina; 1.4, 1.6 histidina y 5.3, 5.3 lisina, en % de la proteína, cuando las dietas contienen el 40% de proteína, del 80% de digestibilidad y se suministran en una proporción del 3% del peso corporal.

En los últimos años, varios investigadores han revisado los datos bibliográficos en cuanto a necesidades de aminoácidos se refiere, criticando la determinación de las necesidades basadas en los estudios de crecimiento y afirmando que existe poca precisión a la hora de interpretar las curvas dosis-respuesta (Cowey y Luquet, 1983; Cowey y Tacon, 1983; Wilson, 1985; Tacon y Cowey, 1985). Cuando se emplea como criterio alternativo al incremento de peso, la concentración del aminoácido en plasma y/o músculo, dichas concentraciones aumentan bruscamente cuando la del aminoácido en dieta excede las demandas del organismo. El punto de inflexión de la correspondiente curva dosis-respuesta indica, por tanto, el nivel de necesidades. Este método no sería aplicable en todos los casos y, en consecuencia, la ganancia de peso sigue siendo el parámetro más fiable y objetivo, no exento de crítica, en la estimación de las necesidades cuantitativas de aminoácidos esenciales. La Tabla 2.3. ofrece una relación de necesidades de aminoácidos expresadas en g/100 g de proteína dietaria para la trucha y la carpa.

Tabla 2.3.: Necesidades de aminoácidos esenciales para trucha (Ogino, 1980) y carpa (Nose, 1979)

AAE	%Prot. dieta Trucha	%Prot. dieta Carpa
Arg	3.5	4.3
His	1.6	2.1
Iso	2.4	2.6
Leu	4.4	3.3
Lys	5.3	5.7
Met	1.8	3.1
Phe	3.1	6.5
Tre	3.4	3.9
Trp	0.5	0.8
Val	3.1	3.6

Al igual que ocurría con la proteína, los distintos diseños experimentales empleados, han propiciado que distintos autores den valores diferentes de necesidades, para un determinado aminoácido, en una misma especie. No obstante, según la sugerencia de Luquet y Kaushik (1981), cuando se expresan las necesidades en mg/100 g de pez/día, las diferencias se atenúan extraordinariamente, sugiriendo una gran similitud en las necesidades absolutas de aminoácidos de distintas especies de peces (Tabla 2.4).

Tabla 2.4.: Necesidades de la trucha y pez gato para algunos aminoácidos esenciales, expresados como porcentaje de la dieta y mg/100g/día, tomado de Cowey y Luquet, 1983.

Aminoácido	% Dieta Trucha	% Dieta Pez gato	mg/100g/día Trucha	mg/100g/día Pez gato
Triptófano	0.24	0.12	4.7	3.6
Metionina	1.00	0.56	20	20
Lisina	2.18	1.50	43	45
Arginina	1.80	1.03	28	31

Un aspecto práctico de notable interés, cuando se trata de ajustar la proteína de la dieta a las necesidades de una especie, es la capacidad de algunos aminoácidos esenciales de ser sustituidos parcialmente por aminoácidos no esenciales. Esto permite no desestimar una fuente proteica por ser deficiente en un aminoácido de esencialidad parcial, sin considerar la suma del no esencial que lo sustituye. Este es el caso de los azufrados metionina y cistina y de los aromáticos fenilalanina y tirosina. La posibilidad de sustitución de metionina por cistina, alcanza valores próximos al 50% en distintas especies de peces: en bagre (Harding et al. 1977), la trucha arcoiris (Kim et al. 1992), en salmón (NRC 1983) y tilapia (Santiago y Lovell, 1988) y lubina (Thebault, 1983). En el caso de los aromáticos, la esencialidad de la fenilalanina puede sustituirse parcialmente por tirosina con porcentajes parecidos en el pez gato (Robinson et al. 1980), en tilapia (Santiago y Lovell, 1988), en serrano (Borlongan, 1992) y en carpa india (Ravi y Devaraj, 1991). Por otra parte, el posible efecto tóxico de altas concentraciones dietarias de tirosina, demostrado en otros animales (Harper et al. 1970), no se ha demostrado en peces, al menos en el bagre (Robinson et al. 1980).

La evidencia experimental en otros animales apunta a la posible existencia de antagonismos entre lisina y arginina y entre leucina, isoleucina y valina. El antagonismo arginina-lisina, demostrado en animales terrestres (Maynard y Loosli, 1969), consiste en que un exceso de lisina provoca un retraso del crecimiento que se restaura por adición de arginina y que, por otra parte, un exceso de arginina induce detención del crecimiento en dietas

limitantes en lisina. Este antagonismo no ha llegado a demostrarse en peces (Robinson et al. 1981; Kim et al. 1983). Sin embargo, investigaciones posteriores parecen aportar evidencias bioquímicas de la existencia de dicho antagonismo en la trucha arcoiris (Kaushik y Fauconneau, 1984). Los primeros estudios sobre antagonismos entre los aminoácidos de cadena ramificada se deben a Chance et al. (1964), quienes establecieron, para el salmón *O. tshawytscha*, necesidades de 1.6% de leucina y 1.3% de valina en la dieta. Los autores concluyeron que altas concentraciones dietarias de leucina aumentan las necesidades de isoleucina y a la inversa. Wilson et al. (1980), en el pez gato, observaron que estos antagonismos se reflejan en los niveles plasmáticos de aminoácidos aromáticos. Hughes y Rumsey (1983) sugieren, en estudios con la trucha de lago, que la isoleucina es, de los tres, el primer aminoácido limitante que facilita la síntesis proteica y que la leucina, en altas concentraciones, deprime, por inhibición competitiva, el transporte a los tejidos, o la absorción intestinal de isoleucina, o bien facilita su catabolismo tras la absorción (Harper et al. 1970).

2.1.3.1. Síntomas de deficiencia de aminoácidos esenciales

Una deficiencia se manifiesta, generalmente, con pérdida de apetito, reducción del crecimiento, índices de conversión bajos y menor actividad. Algunos aminoácidos (metionina, lisina, triptófano) pueden presentar cuadros patológicos, más o menos específicos, que no siempre manifiestan la misma sintomatología en especies distintas.

La deficiencia de lisina puede afectar a la trucha arcoiris y se traduce en ulceraciones de la aleta caudal, con pérdida de las mismas (Ketola, 1983). La deficiencia en metionina llega a inducir cataratas en la trucha de lago (Poston et al. 1977) y trucha arcoiris (Page, 1978). Síntomas de deficiencia de triptófano han sido descritos en varias especies de peces. En la trucha arcoiris produce escoliosis (Shanks et al. 1962; Kloppel y Post, 1975; Poston y Rumsey, 1983; Walton et al. 1984), lordosis (Walton et al. 1984), hiperemia (Kloppel y Post, 1975), erosión de aletas caudales y cataratogénesis (Poston y Rumsey, 1983) y acúmulo anormal de calcio, magnesio, sodio y potasio en hígado y riñón (Walton et al. 1984).

2.2. UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LA PROTEÍNA:

2.2.1. Digestión de la proteína:

En capítulos anteriores hemos visto que son muchos los factores, tanto bióticos como abióticos, que afectan a las necesidades proteicas de los peces (Cowey y Luquet, 1983; Kaushik, 1986), pero se debe tener en cuenta que la proteína es útil al animal, sólo si puede ser digerida y absorbidos los productos de su degradación (aminoácidos y pequeños péptidos). Por tanto, para la puesta a punto de una alimentación artificial adecuada, es particularmente importante conocer no sólo los procesos de digestión y absorción proteica, sino su resultado para distintas fuentes proteicas, así como otras características cuantitativas

y cualitativas de la dieta, ya que van a condicionar la utilización nutritiva de la proteína para crecimiento y, en términos prácticos, la rentabilidad de la dieta.

Las enzimas digestivas son hidrolasas, es decir, sustancias que catalizan el desdoblamiento hidrolítico de los nutrientes. Por lo general, son de naturaleza proteica e hidrosolubles. Dependiendo de su actividad fisiológica se dividen en tres grupos: Enzimas proteolíticas o proteasas (desdobladoras de proteínas), Esterasas (desdobladoras de grasas) y Carbohidratasas (desdobladoras de carbohidratos).

El cálculo de la digestibilidad valora la utilización digestiva o eficiencia de asimilación de los nutrientes de la dieta. La cantidad absorbida se determina por diferencia entre la cantidad de nutriente ingerido y excretado, y expresada respecto a la cantidad ingerida, (en %) se denomina "Coeficiente de Digestibilidad Aparente", ya que incluye la excreción de nutriente de origen endógeno. El "Coeficiente de Digestibilidad Verdadera", por ejemplo de la proteína, supone la corrección del Coeficiente Aparente con las cantidades de origen endógeno (enzimas y mucoproteínas secretadas en el tracto digestivo, proteínas tisulares procedentes de la descamación de las células de la mucosa digestiva) que se restaría de la excreción fecal total o conjunta. La mayoría de las proteínas dietarias muestran unos altos coeficientes de digestibilidad en los peces, con valores entre 90 y 100% (Ogino y Chen, 1973; Kim, 1974; Nose, 1967; NCR, 1981; Kaushik, 1980; Cho et al., 1985; Kaushik, 1993). Ante casos de baja digestibilidad de la proteína, hay que considerar en primer lugar la posible acción de otros factores (inadecuado procesado de la materia prima, presencia de factores antinutritivos, inadecuada formulación de la dieta, etc.) antes que una baja capacidad de hidrólisis y absorción. Ogino y Chen (1973) observaron que la digestibilidad aparente disminuye cuando la ingesta de nitrógeno es baja, debido a una mayor proporción de nitrógeno fecal de origen endógeno y, por regla general, según Ash (1985), los procesos de digestión y absorción proteica son eficientes y no limitantes. La digestibilidad, dentro de ciertos límites, no se afecta por el nivel de proteína en la dieta (Nose, 1967; Austreng y Refstie, 1979; Jauncey, 1982).

La digestión proteica va a depender del equipamiento enzimático del pez, que varía con la edad (Tacon et al., 1983; Murai et al., 1989) y el estado fisiológico, influyendo también factores del medio y régimen alimentario (Rungruansak y Utne, 1981; Hofer et al., 1982). Las actividades enzimáticas digestivas dependen tanto de la cantidad de nutriente ingerido como de su calidad (Kitamikado y Tachino, 1960; Kaway e Ikeda, 1973; Hofer y Schiemer, 1981), de ahí que puedan, en principio, ser utilizadas como índices del grado de adaptación y aprovechamiento de la proteína dietaria. La morfología del tracto digestivo de los peces es muy variable, ilustrando la diversidad de regímenes alimentarios y modos de vida. Más adelante se comentará cómo pueden influir todos estos factores sobre la utilización proteica. Una primera clasificación de los peces, que será objeto y discusión de este trabajo, se puede realizar en función de si tienen o no un estómago morfológica y funcionalmente definido, lo que divide a estos animales en dos grandes grupos: gástricos y agastros.

2.2.1.1. Digestión en el estómago:

En los peces con estómago la digestión proteica comienza con la secreción de ácido clorhídrico y enzimas, por parte de un mismo grupo de células (Barrington, 1957). La principal enzima proteolítica es la pepsina, una endopeptidasa que actúa a pH ácido (2-5), (Kapoor et al., 1975; Ash, 1980; Twining et al., 1983), desdoblado la proteína en polipéptidos. La forma inactiva secretada es el pepsinógeno que se activa en medio ácido (pH=2) y mediante autocatálisis por la pepsina activada.

El estómago además de actuar de almacén de reserva, prepara el alimento para su ingreso en el intestino. Se ha puesto de manifiesto en la trucha arco iris (Austreng, 1978; Dabrowski y Dabrowska, 1981; Steffens, 1989) que la proteína es ya digerida por la pepsina en una proporción considerable y que ya se produce una cierta absorción de aminoácidos a nivel gástrico. Los ciprínidos, pese a la carencia de estómago y al relativamente rápido tránsito intestinal (7 horas en la carpa herbívora según Hickling, 1966), muestran una eficaz utilización digestiva de la proteína (Stroban y Van der Veen, 1981), lo que indicaría el carácter poco determinante de la secreción gástrica sobre la digestión proteica en estas especies. En los peces agastros la hidrólisis de la proteína se produce en medio alcalino, al no poseer secreciones peptídicas ni ácidas previas. Las enzimas intestinales son, por tanto, las únicas responsables de la degradación de la proteína en estos animales (Hofer et al., 1982).

La proteólisis en el estómago depende de una serie de factores: cantidad segregada de ácido y pepsina, actividad específica de la pepsina, tiempo de retención, ingesta del alimento, naturaleza de éste (dureza y pH), etc.; muchos de los cuales son interactivos. La ingesta de alimento (Barrington, 1957) y presumiblemente el tiempo de retención, se afectan por la temperatura, de tal forma que a temperaturas bajas disminuye la ingesta y se incrementa el tiempo de retención (Brett y Higgs, 1970).

2.2.1.2. Digestión proteica en el intestino:

Una vez el quimo pasa al intestino, se inicia la liberación de secreciones pancreáticas y de bilis procedente del hígado. En cuanto a las proteasas intestinales, se han encontrado actividades del tipo de la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y elastasa, en bastantes especies de peces. Estas enzimas son secretadas por el páncreas predominantemente, como zimógenos (Fange y Grove, 1979; Fraisse, et al, 1981), que serían activados en el intestino de manera análoga a como ocurre en vertebrados superiores (Cohen et al., 1981; Yoshinaka et al., 1981, 1982) mediante la acción de enteroquinasa y tripsina. El pH del fluido intestinal, tanto en peces con estómago, como en los agastros, es aproximadamente neutro o básico (Kapoor et al., 1975; Fange y Grove, 1979). Generalmente el pH se aproxima a la neutralidad en la parte anterior del intestino y se hace algo alcalino en la parte posterior (Hofer et al., 1982).

Tripsina y quimotripsina, rompen los polipéptidos en péptidos de cadena más corta. **La tripsina** es una endopeptidasa que cataliza la hidrólisis de las uniones peptídicas en las que el grupo carboxilo pertenece a la lisina o a la arginina. Y la **quimotripsina** ataca las uniones peptídicas en las que están implicados aminoácidos aromáticos (Tyr, Trp, Phe). A continuación intervienen las carboxipeptidasas, que actúan a nivel de las terminaciones carboxílicas, y aminopeptidasas que atacan a los aminoácidos terminales.

Las células del borde en cepillo del epitelio intestinal también segregan enzimas; entre ellas la más importante es la amilasa, que ataca el almidón produciendo maltosa. Las otras enzimas son aminopeptidasas (dipeptidasas y tripeptidasas) y carboxipeptidasas (Fange y Grove, 1979; Fraise et al; 1981).

Los ciegos pilóricos son considerados como una extensión funcional del intestino delgado, con un papel similar respecto a la digestión proteica. Los enzimas encontrados en ellos, se ha visto que son de origen pancreático (Bergot, 1979a,b).

2.2.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LA PROTEÍNA:

2.2.2.1. Edad:

La capacidad proteolítica del estómago aparece ya en los peces pequeños relativamente bien desarrollada. La actividad proteolítica y amilásica existente en el intestino y apéndices pilóricos de los peces jóvenes, es inicialmente escasa y se eleva a medida que avanza el crecimiento (a partir de 1-2 g), (Kaway e Ikeda, 1972), reduciéndose de nuevo con la edad, tanto en la trucha (Kitamikado y Tachino, 1960) como en otras especies (Morishita et al., 1964; Stroganov y Buzinova 1969). Kaway e Ikeda (1973) comprobaron que, en la trucha arco iris, la digestión de la proteína en la etapa juvenil depende más de la actividad de las enzimas tríplicas que de las pépsicas. La digestibilidad de la proteína de harina de pescado y de la caseína es menor en truchas de peso inferior a 10 g, que en las de 10-100 g, posiblemente debido a esa menor actividad enzimática en los peces más jóvenes y, esto a su vez, ser uno de los factores responsables de sus mayores necesidades en proteína (Murai, 1992). Resultados similares han obtenido Cardenete y Cho al comparar la digestibilidad de la proteína de distintas materias primas entre truchas de 30 y 100 g (comunicación personal).

2.2.2.2. Composición de la dieta y régimen alimentario:

La actividad proteásica depende en parte del contenido proteico de la dieta. El aumento de la fracción proteica en la ración incrementa la actividad proteásica en la carpa que disminuye al descender dicha fracción (Kaway e Ikeda, 1973). En la trucha se ha

observado la misma tendencia (Moyano et al., 1987; Das y Tripathi, 1991).

La morfología y longitud del tracto digestivo están relacionadas con el régimen alimentario del pez en su medio natural y pueden variar ampliamente de unas especies a otras y en el curso de la vida de una especie dada. Las especies herbívoras poseen un tubo digestivo relativamente más largo que el de las especies carnívoras, lo que incrementa la duración del tránsito intestinal. La menor actividad proteolítica queda compensada por el mayor tiempo de exposición del alimento a las enzimas digestivas, existe por tanto una mayor duración proteolítica efectiva; a su vez, la tripsina de ciprínidos posee una mayor afinidad por el sustrato que en peces con estómago; de esta forma compensan la ingesta de dietas más pobres en proteína (Ash, 1985). La tripsina de ciprínidos puede alcanzar su máxima actividad a concentraciones más bajas de proteína, además posee un pH óptimo de las enzimas proteolíticas mayor (pH=9) (Dabrowski, 1979), por tanto la capacidad de la actividad proteolítica es más eficiente en especies herbívoras que en carnívoras. Los carnívoros presentan un gran desarrollo de la superficie intestinal, con elevadas actividades proteolíticas (Barrington, 1957, Kuz'mina, 1978), superiores a las de los peces herbívoros (Hofer, 1982); lo cual aumenta el rendimiento de sus relativamente más cortos tubos digestivos. Por otro lado, en los peces herbívoros la actividad de las carbohidratasas es predominante, las actividades amilásicas son importantes, mientras que son débiles en los carnívoros (Shimeno et al., 1979). Esto es responsable, en parte, de que la digestibilidad en dietas con un 48% de almidón sea, en los salmónidos, de 38-55%, mientras que para la carpa es del 84% (Chiou y Ogino, 1975). La trucha tiene una mayor digestibilidad que la carpa al ingerir dietas con harina de carne (%), debido a la mayor actividad proteolítica de su digestivo (Pongmaneerat y Watanabe, 1991).

La cantidad y actividad de los enzimas depende también del tiempo transcurrido tras la alimentación (Plantikow, 1978), así como de la relación velocidad de tránsito del alimento/temperatura y sensibilidad frente a ciertas sustancias presentes en fuentes vegetales (Cohen et al., 1981; Krogdahl, 1989). El principal motivo de la menor digestibilidad de las fuentes de origen vegetal es la presencia de hidratos de carbono. Al aumentar el contenido de carbohidratos en la dieta disminuye la digestibilidad, fenómeno ocasionado en parte por el aumento en la velocidad de tránsito gastrointestinal.

La cantidad y frecuencia de alimentación parecen no afectar a la utilización digestiva de la proteína (Windell et al, 1978), ésta depende más bien de la energía metabolizable de la dieta (Huisman, 1976).

2.2.2.3. Factores ambientales: Temperatura

La temperatura del agua está considerada como el principal factor ambiental que afecta la utilización del alimento, a todos los niveles y en todas las etapas del crecimiento del pez (Kaushik, 1986). La temperatura afecta a la ingesta de alimento (Elliot, 1982; Cai y

Curtis, 1990), a las necesidades de mantenimiento (Nose, 1971; Cho y Slinger, 1980), a la tasa metabólica (Caulton, 1977; Ott et al., 1980), a toda la maquinaria enzimática (Owen y Wiggs, 1971; Hofer, 1979), a la función de las membranas, etc (Kaushik, 1986). A nivel digestivo, la velocidad de tránsito del alimento, la digestibilidad de los nutrientes y la actividad de las enzimas digestivas, están afectados por la temperatura del agua en la que vive el pez (Kaushik, 1986). La producción de enzimas está relacionada con la época del año, así como con la tasa de ingestión de alimento (Elliot, 1982). A nivel de adaptación de una especie al medio, las enzimas pueden presentar distintas formas con óptimos de temperatura específicos, son las llamadas isoenzimas (Somero, 1978).

Un organismo individualizado tiene la capacidad de producir formas enzimáticas distintas, en relación con las variaciones estacionales u ocasionales de temperatura. Estos cambios permiten a los organismos reajustar sus reacciones metabólicas de manera que compensen las variaciones de temperatura. Owen y Wiggs (1971) pusieron en evidencia una compensación del efecto de la temperatura sobre la actividad específica de la pepsina de la trucha de arroyo, *Salvelinus fontinalis*, de manera que ésta aumenta su actividad un 30% en los peces adaptados al frío. Igualmente, Hofer (1979) mostró que existía una adaptación de las proteasas digestivas a la temperatura, a los ciclos estacionales y al alimento, en dos peces de agua dulce (*Rutilus rutilus* y *Scardinius erythrophthalmus*). Por otra parte, no se observaron diferencias en la actividad específica de trisina y quimotripsina en las truchas aclimatadas a 10 y a 15 °C (McLeese y Stevens, 1982). Otros investigadores afirman que el aumento de temperatura provoca una elevación tanto de la secreción de enzimas como de la actividad enzimática (Schlottke, 1938,1939; Nordlie, 1966; Smith, 1967; Trofimova, 1973).

Asímismo, la temperatura afecta a la absorción de nutrientes a nivel intestinal, así como a la velocidad de tránsito del alimento a través del tracto digestivo (Hepher, 1988; Carneiro, 1992). La aclimatación a una subida de la temperatura implica un incremento en la absorción (Groot et al., 1983) y el metabolismo de los carbohidratos (Yamawaki, 1983). Asimismo, la evacuación gástrica y la velocidad de tránsito se incrementan con el aumento de la temperatura en la mayoría de teleosteos (Fange y Grove, 1979). Fauconneau et al. (1983) analizaron los efectos de la elevación de la temperatura de 10 a 18 °C, sobre la tasa de evacuación fraccional de los distintos compartimentos del tracto digestivo de la trucha arco iris, observando un aumento del tránsito al aumentar la temperatura. Tal incremento, y la consecuente disminución en el tiempo de exposición de los nutrientes a la acción de las enzimas digestivas o a la superficie de absorción en el tracto digestivo, afectaría a la utilización digestiva, pero al analizarla no se observaron diferencias en la digestibilidad de los nutrientes. Sin embargo, Choubert et al. (1982), trabajando bajo idénticas condiciones (10 y 18°C), observaron que la digestibilidad de la proteína, energía y materia seca mejoraban a 18°C. El efecto beneficioso que puede haber con la elevación de la temperatura sobre la retención de nitrógeno o energía es más atribuible al incremento en la ingesta de alimento, que a cualquier mejora a nivel digestivo o metabólico (Kaushik, 1981) ya que la digestibilidad fue prácticamente la misma en su experimento con truchas a 10 y 18 °C.

En la carpa, la digestibilidad de la totalidad de los nutrientes aumenta al aumentar la temperatura; sin embargo, la digestibilidad de la proteína no cambia o incluso disminuye ligeramente (Shcherbina y Kazlauskene, 1971). Cho y Slinger (1979) encontraron en la trucha arcoiris que los coeficientes de digestibilidad no cambiaron en un rango de temperatura de 9 a 15 °C pero aumentaron ligeramente a los 18 °C.

2.3. ABSORCIÓN INTESTINAL DE AMINOÁCIDOS Y PÉPTIDOS EN PECES:

2.3.1. Mecanismos de absorción celular de aminoácidos y dipeptidos por el intestino de peces:

Los estudios sobre mecanismos de absorción de aminoácidos en peces son escasos y no permiten exponer hipótesis sólidas y de aplicación general a las distintas especies (Smith, 1970; Smith, 1983; Bogé et al., 1979).

Buclon et al. (1964) observaron en la tenca, una diferente velocidad de absorción para los distintos aminoácidos y que la absorción de una mezcla de aminoácidos era más rápida que la de cualquiera de ellos tomado individualmente. También comprobaron Bogé et al. (1978) que la absorción de una mezcla de aminoácidos era más rápida que la de una cantidad idéntica de glicina sola. La absorción de aminoácidos parece llevarse a cabo por mecanismos de transporte específicos de determinados grupos de aminoácidos, en relación o no a una dependencia aniónica o catiónica (Buclon, 1974 y Storelli et al, 1989), este hecho se ve complicado, además, por el uso de distintos mecanismos absorptivos según el aminoácido, la existencia de más de un mecanismo para ciertos aminoácidos, así como por la existencia de interacciones competitivas (por ejemplo, las interacciones entre leucina, valina y metionina, encontradas por Robinson et al, 1984), influencias ambientales, etc. Sin embargo, la alta concentración intestinal de aminoácidos encontrada por Dabrowski (1983), le sugiere que la absorción de aminoácidos por transporte pasivo hacia los enterocitos es un fenómeno importante en peces (Dabrowska, 1984).

El estudio de los mecanismos de absorción aunque no esté exento de dificultades metodológicas (Dabrowski, 1983) es una materia muy interesante para contribuir a la evaluación de la proteína dietaria desde otros puntos de vista y, consecuentemente, para formular dietas-base a partir de los patrones de aminoácidos resultantes en plasma y tejidos, cuando el pez es alimentado con diferentes fuentes proteicas. Una vez hecho esto, se puede plantear la realización de una adecuada suplementación capaz de mejorar la disponibilidad del perfil de aminoácidos.

Hasta hace poco se creía que la proteína debía ser totalmente hidrolizada hasta aminoácidos para poder ser absorbida. Hoy se acepta que en vertebrados superiores, pequeños péptidos (dipeptidos y tripeptidos) pueden absorberse intactos a través de la

mucosa, por mecanismos distintos a aquellos que tienen lugar para la absorción de aminoácidos libres (Bogé et al., 1981a,b; Ash, 1980).

2.3.2. Absorción y digestión intracelular de proteínas:

Hoy día se acepta que existen regiones especializadas en el intestino que son responsables de la absorción masiva de proteínas y grandes péptidos. Varios autores (Yamamoto, 1966; Tanaka, 1971; Noaillac-Depeyre y Gas, 1976) coinciden en sugerir que la capacidad de absorber proteínas intactas se asocia con la ausencia o déficit de digestión gástrica (peces agastros y fases larvarias y juveniles). Más tarde se ha observado, que la capacidad de incorporar macromoléculas al enterocito, por absorción pinocitaria, parece no ser exclusiva de peces agastros (Teshima y Hara, 1983). Tras varios estudios en trucha, Bergot (1976) y Marcotte y de la Noüe (1984) opinan que, en caso de ser absorbidas intactas, las proteínas deberían sufrir una hidrólisis intramucosal o intraenterocitaria que se uniría a la intraluminal, favoreciendo la absorción de las proteínas ingeridas. Se ha visto que en carpa, la localización preferencial de este mecanismo se sitúa en las partes medias y más caudales del intestino (Stroband y Van der Veen, 1980). Sin embargo, existe una gran evidencia de que en ambas especies, la absorción del componente nitrogenado es claramente mayoritaria en la parte proximal del intestino (Scherbina y Sorvacev, 1969; Scherbina et al., 1976; Stroband y Van der Veen, 1980, 1981; Dabrowski, 1983; Plakas y Katayama, 1981). Ambos hechos limitan, ciertamente de manera drástica, la posible importancia cuantitativa de la absorción de proteínas intactas por pinocitosis, relativa a segmentos más caudales (Stroband y Van der Veen, 1980) en los peces sin estómago. Otros autores demostraron que en peces con estómago como la trucha (Austreng, 1978), pez gato (Pappas et al., 1973) y tilapia (Bowen, 1981) la absorción de proteínas tiene lugar principalmente en la primera mitad del digestivo.

Según Dabrowski y Dabrowska (1981), en la trucha arco iris, la proporción en que cada aminoácido individual es absorbido, en cada zona del intestino, depende del tipo de proteína dietaria; lo que sugiere que la estructura primaria de cada proteína afecta a su tasa de digestión (Ash, 1985) y, por tanto, a la disponibilidad de los aminoácidos que libera en cada momento o lugar del tracto digestivo.

Posteriormente, Dabrowski (1983) estudió en la carpa la diferente absorción de la proteína procedente de harina de pescado o de harina de soja, y encontró un distinto patrón de aminoácidos resultante de la más lenta absorción de la proteína de soja. Esta provocaba una concentración más baja de aminoácidos en el digestivo y una más baja absorción aparente, al compararla con lo que se producía en los animales alimentados con harina de pescado. La absorción aparente de los aminoácidos Lys, Arg, Tyr y Phe fue más alta en el 20% anterior del intestino de la carpa a las 3 horas después de la comida con harina de pescado. Las diferencias en el patrón de aminoácidos absorbidos serían debidas a que la proteína vegetal (soja) fue peor digerida y menos eficientemente absorbida que la animal

(harina de pescado). Estos resultados sugieren que bajo estas condiciones experimentales, el tiempo después de la comida debería ser analizado como esencial para una mejor interpretación del lugar y la intensidad de la absorción de aminoácidos.

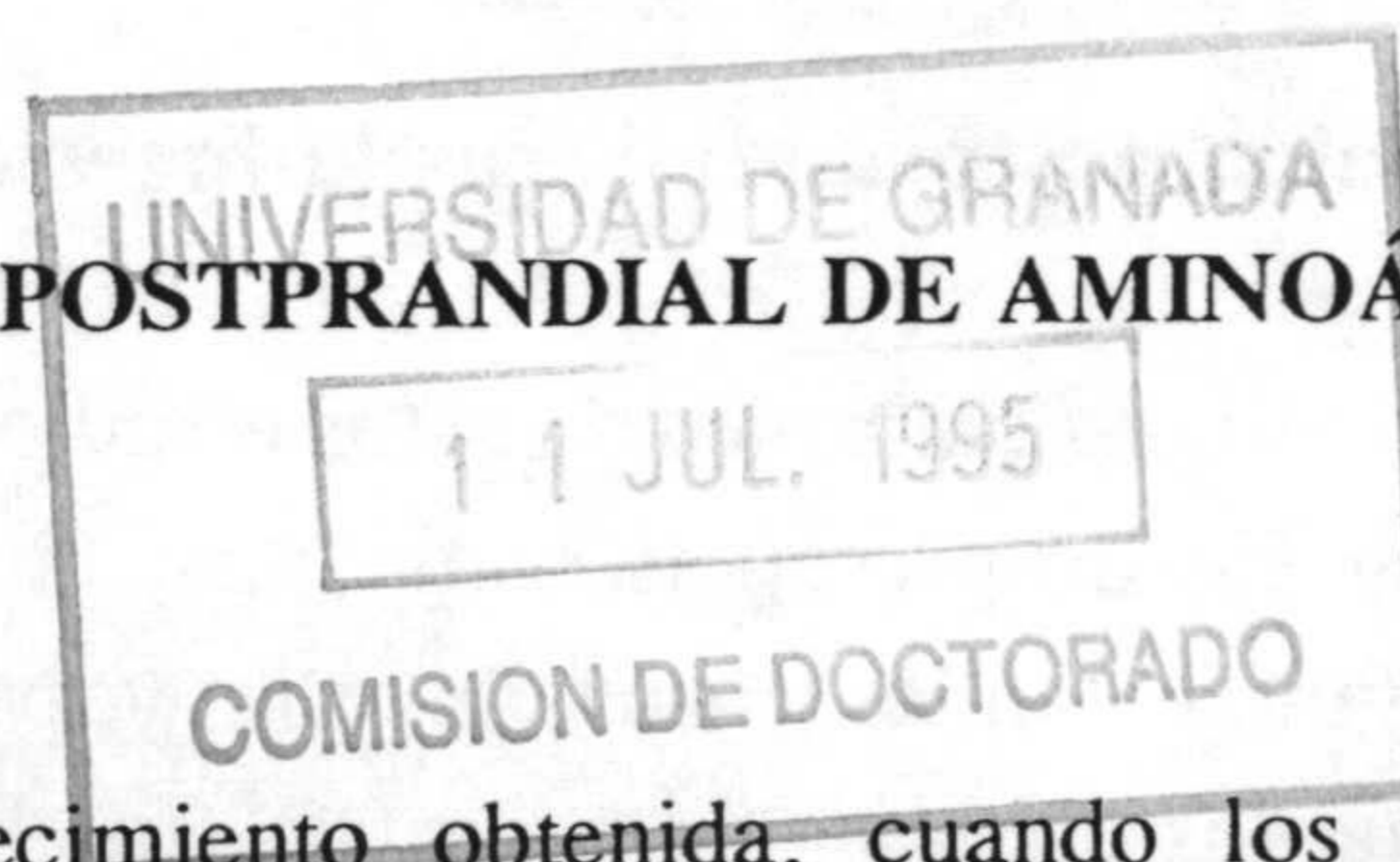
Scherbina y Sorvacev (1969) trabajando con carpas, encontraron diferencias en el porcentaje de absorción de los aminoácidos Lys y Arg para las dos fuentes vegetales empleadas (girasol y algodón). La carpa absorbía la mayor parte de los aminoácidos dietarios en el 64% anterior del digestivo, aunque podía llegar al 13% para ciertos aminoácidos como Arg, Phe y Met, procedentes de la proteína de girasol. La dieta a base de proteína de algodón dió una más baja absorción en términos generales.

Si la evacuación gástrica se considera un importante factor en la regulación de la digestión proteica y posterior absorción de aminoácidos, es importante conocer que también puede verse afectada por la temperatura (Grove et al., 1978; Schade, 1982), tamaño del pez (Grove et al., 1978; Bromley, 1987), régimen de alimentación, composición de la dieta, etc. La densidad calórica de la dieta, por ejemplo, ha demostrado su capacidad para retrasar directamente el vaciamiento gástrico (Jobling, 1980).

2.4. REVISION DE LA DISPONIBILIDAD POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS:

2.4.1. Introducción:

Es bien conocido que la tasa de crecimiento obtenida, cuando los peces son alimentados con dietas en las que parte de la proteína es sustituida por aminoácidos puros, es generalmente inferior a la de aquellos alimentados con dietas de la misma composición, pero con los aminoácidos formando parte de la proteína de la dieta. Tal respuesta se ha visto en carpa (Aoe et al., 1970; Plakas et al., 1980; Murai et al., 1981, 1984; Kaushik y Dabrowski, 1983), pez gato (Wilson et al., 1978), milk fish (Coloso et al., 1988), red drum (Moon y Gatlin, 1989), tilapia (Mazid et al., 1978) y trucha (Walton et al., 1986), siendo los resultados más marcados en peces agastros como la carpa y tilapia. Los resultados fueron atribuidos a diferencias en las tasas de absorción de los aminoácidos (Murai et al., 1987; Cowey y Walton, 1988), con una más pronta aparición de aminoácidos en plasma, así como niveles más altos (Yamada et al., 1981a) para las dietas con aminoácidos libres; siendo el exceso de aminoácidos catabolizado o, como se ha demostrado en la carpa, excretado directamente por orina (Murai et al., 1984). Al mismo tiempo, también puede influir una respuesta fisiológica gástrica al tipo de dieta; en ese sentido, Yamada et al. (1981a) observaron que la evacuación gástrica de la trucha era más rápida al ser alimentada con una mezcla de aminoácidos, en parte como consecuencia de la absorción gástrica de los mismos aminoácidos. En la carpa los resultados fueron más evidentes y se podría especular con que una alteración en el patrón postprandial de aminoácidos esenciales de ambas especies (Plakas et al., 1980; Murai et al., 1982) explicará las diferencias en la retención de nitrógeno (Aoe



et al., 1970) en ambas. Si eso es lo que ocurre, después de alimentar a los peces con dietas que contengan gran proporción de aminoácidos puros, lo mismo se debería esperar que ocurriera cuando una fuente de proteína de baja calidad es suplementada y/o equilibrada por adición de aminoácidos libres, cuando el crecimiento obtenido es inferior al que produce la dieta control, como ocurre en los ensayos de suplementación realizados por Ketola (1982).

2.4.2. Factores responsables de la variación en la dinámica postprandial de aminoácidos:

Varios son los grupos de investigadores que han observado cambios en la concentración de aminoácidos en el plasma, suero o sangre entera a distintos intervalos de tiempo después de la ingestión de la dieta. Las especies investigadas incluyen la trucha arcoiris (Nose, 1972; Schlisio y Nicolai, 1978; Yamada et al, 1981; Walton y Wilson, 1986), carpa (Murai et al, 1982; Plakas et al, 1980), tilapia (Yamada et al, 1982), pez gato (Wilson et al, 1985) anguila japonesa (Hayashi et al, 1982) y lubina (Thebault, 1985). Los resultados de estos estudios tienden a demostrar que existen diferencias entre especies, aunque en gran parte debidas a los distintos diseños experimentales y temperaturas utilizadas.

2.4.2.1. Dinámica postprandial tras la ingesta de proteína completa:

Los principales hallazgos de estos estudios demuestran que después de ser alimentados con dietas conteniendo proteínas completas, la concentración de aminoácidos en sangre de especies de agua caliente (carpa, tilapia y pez gato) alcanzaban niveles máximos más rápidamente que las especies de agua fría (trucha arcoiris) (Nose, 1972; Schlisio y Nicolai, 1978; Plakas et al., 1980; Walton y Wilson, 1986). Los tiempos requeridos, para restablecer las concentraciones iniciales, también eran más cortos en las especies de agua caliente (Schlisio y Nicolai, 1978; Plakas et al., 1980); estas diferencias son probablemente debidas al efecto de la temperatura sobre la velocidad y eficacia de los procesos digestivos. De esta forma, en carpas alimentadas con una dieta basada en caseína, la concentración de aminoácidos en plasma aumentó al nivel máximo 4 horas después de comer, volviendo a niveles de ayuno a las 8-16 horas (Plakas et al, 1980). En pez gato (Wilson et al, 1985) y tilapia (Yamada et al, 1981), la concentración de aminoácidos en suero comenzó a aumentar a las 2 horas de la comida, manteniéndose alta hasta las 12 horas, para volver a los niveles de ayuno a las 24 horas. En contraste, truchas arcoiris alimentadas con dietas a base de harina de pescado (Nose, 1972) o caseína (Walton y Wilson, 1986), presentaron un nivel máximo de concentración de aminoácidos a las 12 horas después de la comida, en tanto que los niveles de ayuno no se restablecieron hasta las 48 horas. Ninguno de los dos estudios detectó el período de "retraso" de 12 horas antes de que la concentración empezase a aumentar, presentado por Yamada et al (1981). Este último autor utilizó una técnica de alimentación forzada que podría haber causado una reacción de stress que provocaría el período de retardo (Ash, 1985), así como el largo periodo de ayuno previo (1 semana), pueden haber influido en los resultados (Walton y Wilson, 1986). No todos los aminoácidos se

comportaron igual después de ser ingeridos, sino que, en general, las concentraciones de todos los aminoácidos esenciales tendieron a aumentar hasta un valor máximo y a partir de ahí descendieron lentamente hasta los niveles de ayuno. Las concentraciones de algunos aminoácidos no esenciales alcanzaron un nivel máximo a la vez que los aminoácidos esenciales, pero tendiendo a alcanzar los niveles de ayuno antes que éstos, exhibiendo, además, grandes fluctuaciones (Yamada et al., 1982).

2.4.2.2. Dinámica postprandial tras la ingesta de mezclas de aminoácidos:

Al suministrar a peces dietas que contienen una mezcla de aminoácidos en vez de una proteína completa, se observa una más rápida aparición de los aminoácidos en plasma, con concentraciones máximas más altas que las máximas obtenidas con peces que ingieren una dieta de proteína entera.

En carpas alimentadas con una dieta a base de proteína completa (caseína), la concentración máxima se alcanzó a las 4 horas, salvo en el caso de la Arg, que lo hizo a las 2 horas (Plakas et al, 1980). Cuando se les alimentó con una dieta a base de aminoácidos puros, la mayoría de ellos alcanzó los niveles máximos entre las 2 y las 4 horas, aunque Arg, Lys, His, Met y Phe, lo hicieron a las 2 horas. Murai et al. (1982) en carpas y con una dieta de caseína-gelatina obtuvo la máxima concentración de aminoácidos totales en plasma entre las 3 y 4 horas, y cuando la dieta consistió en una mezcla de gelatina y aminoácidos la concentración mas alta en el total de aminoácidos se adelantó a 1-1.5 horas.

En la trucha arcoiris se observaron mayores diferencias, ya que la mayoría de los aminoácidos alcanzaron su nivel más alto a las 12 horas tras la comida de una dieta de aminoácidos, mientras que tardaron 24-36 horas con una dieta de proteína completa (caseína) según Yamada et al. (1981). Mientras que Murai y colaboradores (1987) obtuvieron en la trucha alimentada con caseína un nivel máximo a las 6 horas y, entre las 3-4 horas para una dieta con aminoácidos libres.

La diferente velocidad de captación de aminoácidos, cuando los peces ingieren dietas que los contienen en forma libre o como proteínas completas, puede ser una de las razones que expliquen la peor utilización para crecimiento de dietas con aminoácidos libres, en comparación con dietas formuladas a base de proteínas completas.

La utilización de dietas test de aminoácidos sintéticos varía entre las especies de peces. La dieta test de aminoácidos debe ser neutralizada con hidróxido sódico para su utilización por la carpa (Nose et al, 1974) y pez gato (Dupree y Halver, 1970; Wilson et al, 1977), pero no para otras especies. Además, la alimentación con dietas de aminoácidos sintéticos da lugar a tasas de crecimiento y eficiencia del alimento menores que con dietas control que contengan proteínas. Quizá la necesidad de ajuste del pH en dietas test de

aminoácidos para carpas y pez gato, pueda deberse a una mejora de la palatabilidad de las dietas.

2.4.2.3. Técnicas de retraso en la absorción de aminoácidos:

La sustitución de proteínas de alto valor biológico por proteínas de bajo valor biológico suplementadas con aminoácidos libres no mantienen el crecimiento en muchos peces (Cowey y Sargent, 1979; Thebault, 1985) y crustáceos (Deshimaru, 1982; Chen et al., 1992) debido a la absorción más rápida de los aminoácidos libres respecto a los aminoácidos que forman parte de las proteínas. Se ha intentado reducir la velocidad de absorción intestinal de los aminoácidos libres envolviéndolos en caseína (Murai et al, 1981), agar (Cho y Woodward, 1985) o mediante microencapsulación.

Murai y colaboradores (1981) fueron capaces de obtener crecimientos comparables en alevines de carpa alimentados con una dieta de gelatina suplementada con aminoácidos esenciales recubiertos de caseína y una dieta control de caseína-gelatina. Los peces alimentados con la dieta de aminoácidos cubiertos de caseína lograron mejorar en más de 4 veces el crecimiento y en 2 veces la eficiencia de los alimentados con una dieta de gelatina suplementada con el mismo nivel de aminoácidos no cubiertos. Estos investigadores sugieren que la mejora en el crecimiento habría que atribuirle al retraso de la absorción de los aminoácidos cubiertos con caseína, que se liberarían aproximadamente al mismo tiempo que los procedentes de la digestión de la proteína de la dieta, dando como resultado una mayor coincidencia de todos ellos y, por tanto, del "pool" de aminoácidos adecuado para una síntesis proteica óptima.

El apoyo a esta hipótesis se obtuvo por comparación de los cambios postprandiales en aminoácidos libres como Trp y Leu en plasma, después de la ingesta de dietas que contenían caseína con aminoácidos cubiertos y no cubiertos (Murai et al, 1982b). La mejora en la tasa de crecimiento obtenida por revestimiento con caseína de los aminoácidos libres de la dieta (Murai et al., 1981, 1982) fue atribuida a la mejora en el patrón disponible de ciertos aminoácidos en plasma, como resultado de minimizar la variación en las tasas de absorción de algunos aminoácidos, dando lugar a una simultánea disponibilidad de aminoácidos para la síntesis proteica. Estos resultados muestran la importancia de un balance adecuado de aminoácidos, para asegurar una eficiencia óptima de la proteína.

En contraste con los resultados obtenidos por Murai et al. (1982), Cowey y Walton (1988), mediante incorporación a la dieta de aminoácidos o proteína marcados, observaron que la aparición de aminoácidos en plasma podía retrasarse al recubrirlos con albúmina, acercándose los tiempos de disponibilidad plasmática a los de los aminoácidos procedentes de la digestión de la proteína entera de la dieta. El tiempo de permanencia de los aminoácidos marcados en plasma cuando se suministraban en forma libre, era mayor que cuando se daban en forma de proteínas marcadas. Mientras que la radiactividad en las

proteínas de la sangre permanecía más tiempo (24 h) cuando la dieta contenía proteína marcada que cuando se adicionaban aminoácidos marcados libres (12 h). Los aminoácidos marcados procedentes de la dieta con aminoácidos recubiertos con albúmina también permanecieron más tiempo (24 h), mostrando tasas de absorción más lentas que facilitaron la utilización de los aminoácidos para la síntesis proteica.

Teshima et al. (1986) encontró que el crecimiento de larvas de langostino (*P.japonicus*) alimentadas con dietas microparticuladas suplementadas con arginina libre era comparable al obtenido con alimento vivo, pudo ser que por el uso de carragenato como aglutinante de la dieta produjera el mismo efecto que un microencapsulado. Hew y Cuzon (1982) mostraron que la suplementación de lisina a dietas de caseína-gelatina tenía un efecto positivo en el crecimiento de juveniles de langostino, sin embargo la misma dieta con arginina no tuvo el mismo efecto. Pero Teshima et al. (1992) con la adición de metionina a dietas de soja-gelatina no mejoró el crecimiento de juveniles de langostino suponiendo que era debido a una baja palatabilidad de dichas dietas. Deshimaru (1981) tampoco obtuvo mejoras en el crecimiento de éstos animales al suplementar dietas de caseína-albúmina con arginina.

La **microencapsulación** se define como el proceso por el cual los componentes de la dieta, ya sean líquidos o partículas se encierran en paredes finas y se liberan bajo condiciones macro o microambientales específicas (Meyers, 1979). La microencapsulación de alimento es una técnica muy reciente que ofrece resultados prometedores y grandes ventajas (estabilidad y flotabilidad en el agua, composición conocida, tamaño de partícula adecuado, fácil fabricación y almacenamiento) tanto para alimentación larvaria como para suplementos nutricionales para juveniles y adultos.

La microencapsulación de alimento, basándose en los métodos descritos por Chang y colaboradores (1966) fue llevado a cabo por Meyers en 1971 y mejorada posteriormente por Jones y colaboradores en 1984. De las técnicas existentes para la elaboración de partículas inertes, destinadas a la alimentación en acuicultura, el método basado en el entrecruzamiento de la proteína dietaria con el agente polimerizante, para formar una cubierta de naturaleza proteica, es el mayormente empleado (Jones et al., 1987; Langdon, 1989). Además de las cubiertas proteicas, se ha demostrado que es posible también la encapsulación de carbohidratos en combinación con proteínas (Levy y Andry, 1991; Kreeger y Langdon, 1994).

Las dietas microencapsuladas se han experimentado ya en alimentación de larvas de bivalvos (Jones et al., 1976; Langdon, 1989), crustáceos (Jones et al., 1984, 1979a,b, 1987; Teshima et al., 1982), peces de agua dulce (Luczynski et al., 1986; Appelbaum y Van Damme, 1988) y en peces marinos (Kanazawa et al., 1982; Appelbaum 1985, Fernández, 1994). Las primeras microcapsulas utilizadas en la alimentación larvaria de peces fueron de nylon y proteína, pero no dieron buenos resultados al ser poco digeribles (Kanazawa et al.

1982). Más tarde, Jones et al., (1987) y Kurmaly et al. (1989) han demostrado que microcapsulas con cubierta proteica sí pueden ser digeridas por larvas de crustáceos, mostrando un desarrollo del crecimiento normales.

Además de la elaboración de partículas inertes para la alimentación larvaria ya sea como único alimento o bien mezcladas con alimentación natural (rotíferos, fitoplancton, etc), una línea de investigación más cercana a nuestros estudios sería la suplementación de aminoácidos "protegidos" en dietas para estados larvarios.

Chen y colaboradores (1992) alimentaron langostinos (*Penaeus monodon*) con dietas a base de caseína suplementada con arginina, usando celulosa-acetato-ftalato y glicerolmonoesterato (cápsulas lipídicas) como formas de microencapsulación del aminoácido arginina. Con ello, consiguieron un incremento de peso mayor que aquellos animales alimentados con dietas sin el suplemento de arginina o ésta suplementada en forma libre.

Otra posibilidad para retrasar la absorción de los aminoácidos libres de la dieta podría ser mediante la **reacción plasteínica**, mediante la cual un aminoácido es covalentemente ligado a un péptido o a una proteína, para ser liberado cuando la proteína sea digerida. La baja tasa de crecimiento que se obtuvo en tilapia alimentada con dieta a base de aminoácidos libres (Mazid et al., 1978) pudo ser mejorada cuando la suplementación de la proteína de soja de la dieta se hizo con metionina ligada a proteína de soja (plasteína de soja) en relación a la suplementación con metionina pura (Teshina et al., 1992). Similares resultados han sido obtenidos por Teshima et al. (1990) en juveniles de tilapia y en langostino (*Penaeus japonicus*) (Teshina et al., 1992). Sin embargo en carpa no hubo diferencias entre usar soja con metionina cristalina o Met-PLS (Teshima et al., 1990).

2.4.2.4. Otros factores que influyen sobre la utilización de los aminoácidos:

Varios investigadores han tratado de conocer el por qué la carpa presenta una pobre utilización nutritiva de dietas que cubren la necesidades esenciales con aminoácidos sintéticos individuales. Una observación importante fue que la tasa y frecuencia de alimentación parecen influenciar la utilización de la dieta para crecimiento. Aún cuando Aoe et al (1970), no consiguieron tasas de crecimiento aceptables al alimentar carpas con dietas que contienen aminoácidos libres debidamente neutralizados, con ingestas del 3% a una frecuencia de 4 veces/día. Sin embargo, Nose et al. (1974) sí obtuvieron una mejora considerable de la conversión del alimento con una dieta similar aunque suministrada a una frecuencia de 6 veces/día e ingerida a saciedad.

Yamada et al. (1981) obtuvieron crecimientos equivalentes con dieta a base de aminoácidos, en carpas de 1 g de peso, cuando la tasa de alimentación fue de hasta un 10% del peso corporal y administrada en 18 veces/día. Estos investigadores habían demostrado previamente que los aminoácidos procedentes de una dieta que los contiene en forma libre,

se absorben más rápidamente que cuando la dieta contiene caseína como fuente de aminoácidos (Plakas y Katayama, 1981). Además observaron que los aminoácidos eran retirados del plasma más rápidamente cuando la carpa ingeriere una dieta con aminoácidos libres, que cuando se alimenta con una dieta a base de caseína (Plakas et al, 1980). Por ello, el incremento en la frecuencia de alimentación puede mejorar el crecimiento al mantener un suministro continuo de aminoácidos a los lugares de síntesis proteica. Incrementar la frecuencia supone mantener en el tiempo una mayor disponibilidad de aminoácidos que asegure su mejor utilización con fines anabólicos, un menor catabolismo y, en consecuencia, una menor excreción de nitrógeno aminoacídico, al menos en condiciones de mantenimiento (Kaushik y Gomes, 1988).

La influencia positiva de una mayor frecuencia de alimentación sobre la utilización de los aminoácidos libres de la dieta deberá ser más evidente en peces sin estómago y de aguas templadas, tales como la carpa, tilapia y otros, en relación a especies con estómago y de aguas frías, como los salmónidos; en parte por la diferente relación entre los tiempos de absorción de aminoácidos libres/proteicos, respectivamente: 2.5/4.5 horas para la carpa (Plakas et al., 1980), 2/4 horas para tilapia (Yamada et al., 1982) y 12/24-36 horas para la trucha (Yamada et al., 1981a).

Murai et al (1984) sugieren que la pobre utilización de los aminoácidos por la carpa podría deberse a su mayor excreción renal, reduciendo por tanto su utilización para crecimiento. Esto podría explicar también por qué Murai et al (1981) obtuvieron mejoras en la tasa de crecimiento para carpas con dietas de caseína con aminoácidos suplementados y por qué Cho y Woodward (1985) obtuvieron crecimientos comparables en truchas arcoiris con dietas que contenían aminoácidos cubiertos con agar, suponiendo que estas sustancias actuarían aglutinando los aminoácidos.

2.4.2.5. Patrón disponible de aminoácidos como medida de la calidad de la proteína dietaria.

Hay poca diferencia en la composición de aminoácidos proteicos corporales totales entre especies, o entre peces enteros o eviscerados (Njaa y Utne, 1982). En contraste, se han observado importantes variaciones en la concentración de aminoácidos libres tanto en la sangre como en los tejidos, dependientes de factores como: historia dietaria, tiempo transcurrido entre la comida y la toma de muestras, etc... Existen numerosos estudios sobre la concentración de aminoácidos en plasma y en músculo blanco pero, por lo general, hay pocos sobre otros tejidos en las distintas especies de peces, con la excepción de la trucha arcoiris, en donde han sido estudiadas las concentraciones de aminoácidos libres en plasma, eritrocitos, hígado, riñón, piel, corazón, músculo y cerebro (Walton y Cowey, 1982; Gras et al 1978, 1982; Shirai et al, 1983; Ogata y Arai, 1985; Walton y Wilson, 1986).

En los últimos años, ha aumentado el interés en el estudio de la concentración de aminoácidos en los tejidos de peces después de la comida, como medida de la calidad de la proteína de la dieta. En la trucha arcoiris la concentración total de aminoácidos en hígado tendió a mantenerse bastante estable durante todo el período posterior a la comida (Walton y Wilson, 1986). No se observó correlación entre los AAE del hígado y sus concentraciones respectivas en la dieta (Nose, 1972; Plakas et al, 1980; Wilson et al, 1985; Walton y Wilson, 1986). Cowey (1975) estudió el efecto de los cambios en el contenido de proteína de la dieta sobre los niveles de aminoácidos en los tejidos, y pudo observar que la incorporación de aminoácidos marcados de la dieta a la proteína corporal e hígado, no estaba afectada por el contenido proteico de la dieta. Respecto al músculo, mientras que unos autores observaron que el patrón de aminoácidos no estaba correlacionado con el perfil de aminoácidos dietarios (Ogata, 1986) otros autores encontraron alguna relación, al menos para alguno de los aminoácidos (Nose et al., 1978; Dabrowska, 1984). La ausencia de picos de AAE y AANE libres en el músculo, durante las 2 primeras horas después de la comida, fué también observada en la trucha, en agua dulce, por Kaushik y Luquet, 1977. El patrón de aminoácidos libres en el músculo parece ser relativamente estable y poco afectado por el tiempo transcurrido después de la comida. Por el contrario, las concentraciones de AAE en plasma mostraron, en la trucha, una correlación positiva con las correspondientes de la dieta (Nose, 1972; Kaushik, 1979; Plakas et al, 1980; Murai et al., 1982, 1987; Dabrowski, 1982; Wilson et al, 1985; Walton y Wilson, 1986; Ogata, 1986). De hecho, mientras que el coeficiente de correlación entre el patrón de aminoácidos esenciales dietarios y el de la sangre, plasma, eritrocitos o hepatopancreas de carpas era alto después de la comida, el patrón del músculo esquelético no mostró ninguna correlación con el de las dietas experimentales (Ogata, 1986). Por otro lado, las concentraciones de aminoácidos no esenciales en plasma, no mostraron tampoco una correlación positiva con los de la dieta (Nose, 1972; Plakas et al., 1980; Dabrowski, 1982; Yamada et al., 1982) presumiblemente debido a interconversiones y a su metabolismo corporal (Walton y Wilson, 1986).

Existe una cierta controversia entre si es mejor tomar muestras de sangre completa o plasma sanguíneo, ya que en peces, algunos autores le otorgan a los eritrocitos un papel en el transporte de ciertos aminoácidos y amoniaco (Ogata, 1985; Ogata y Murai, 1988; Cowey y Walton, 1988), pero esta función no está del todo clara. Además, el grado de fluctuación de aminoácidos libres en el plasma tras la ingesta, parece ser más claro y amplio que el de la sangre o hepatopancreas. Por ello, el análisis del plasma parece ser tan bueno como el de la sangre y hepatopáncreas, para la evaluación de la calidad de la proteína dietaria (Ogata, 1986). Por otra parte, al analizar los cambios postprandiales en los aminoácidos libres de plasma recogido de tres regiones del sistema circulatorio de la trucha (porta, hepática y complejo vena-arteria) se observó una secuencia postprandial similar que refleja el patrón dietario (Murai et al., 1987).

En anguilas japonesas alimentadas con dietas de 65 % de proteína (Ogata et al., 1985), el nivel de aminoácidos esenciales en plasma también estuvo positivamente correlacionado

con el nivel de proteína de la dieta y la ingesta proteica, mientras que el nivel de aminoácidos no esenciales estuvo más correlacionado con el nivel de depósito de proteína que con aquellos de la dieta o ingesta.

Dabrowska (1984), afirma que la secuencia de fluctuación de los aminoácidos depende de la especie, temperatura, calidad y cantidad de la dieta ingerida y el tiempo de la toma de muestras después de la comida. Especialmente este último factor puede afectar en gran medida al perfil tisular de aminoácidos libres en cada momento. Cuando se lleva a cabo un estudio sobre dinámica de aminoácidos libres es necesario que la historia nutricional del experimento se estudie en profundidad. Está claro que existe una correlación entre los aminoácidos libres en los tejidos y los aminoácidos de la dieta. Sin embargo, como sugieren Fujita et al. (1981), que los aminoácidos libres no reflejan directamente la composición de aminoácidos o el nivel de ingesta proteica, sino más bien indican indirectamente el patrón de metabolismo total en los tejidos y su respuesta a la calidad y cantidad de la proteína consumida.

Otros estudios que apoyan una relación significativa entre la ingesta cuantitativa o, cualitativa de proteína/aminoácidos, a distintos niveles, incluyen por ejemplo la correlación entre el nivel total de aminoácidos en plasma (esenciales y no esenciales) y las concentraciones de proteína dietaria (Cowey et al., 1977), o las correlaciones similares entre los aminoácidos de la dieta y los correspondientes de hígado y músculo (Yokoyama y Nakazoe, 1991). Respecto a la relación AAE/AANE, Cowey et al. (1977) observaron una cierta conservación de AAE cuando disminuye la concentración de proteína dietaria. Además, considerando los aminoácidos individuales, se puede observar una relación positiva entre el aumento en los niveles de dicho aminoácido en la dieta y su concentración en el plasma o músculo, cuando se exceden los requerimientos en este aminoácido; circunstancia que se ha utilizado para apoyar la valoración de las necesidades de ciertos aminoácidos esenciales (Wilson et al., 1978; Kaushik, 1979; Walton et al., 1986).

Si los peces se alimentan con una dieta nutricionalmente completa, excepto para uno de los aminoácidos esenciales, entonces ocurren varias respuestas bioquímicas. Brookes et al. (1972) y Lewis et al. (1977) argumentaron que en animales alimentados con dietas que contienen niveles de un aminoácido esencial por debajo de los requerimientos, una alta proporción de ese aminoácido se utilizaría para síntesis proteica, por lo que su concentración tisular y su utilización metabólica sería baja. Por otra parte, en los animales que ingieren niveles de aminoácidos esenciales por encima de sus necesidades, las concentraciones tisulares y niveles de oxidación aumentarían, ya que el exceso de aminoácidos sería desviado por otras vías distintas a la síntesis proteica. Estos modelos de respuesta se han observado al determinar las concentraciones séricas de Met, Lys y Thr en el pez gato (Wilson et al., 1977, 1978; Hardin et al., 1977) y a nivel muscular para la Arg en la trucha (Kaushik, 1979). Sin embargo, esta tendencia no se observó para las concentraciones séricas de His, Arg, Phe, Leu y Val (Wilson et al., 1980) ni para la Lys en otro estudio realizado en el pez

gato (Robinson et al., 1980. 1981), ni cuando se consideran los niveles plasmáticos o hepáticos de Arg, Lys y Trp en la trucha (Walton et al., 1984a, b, 1986).

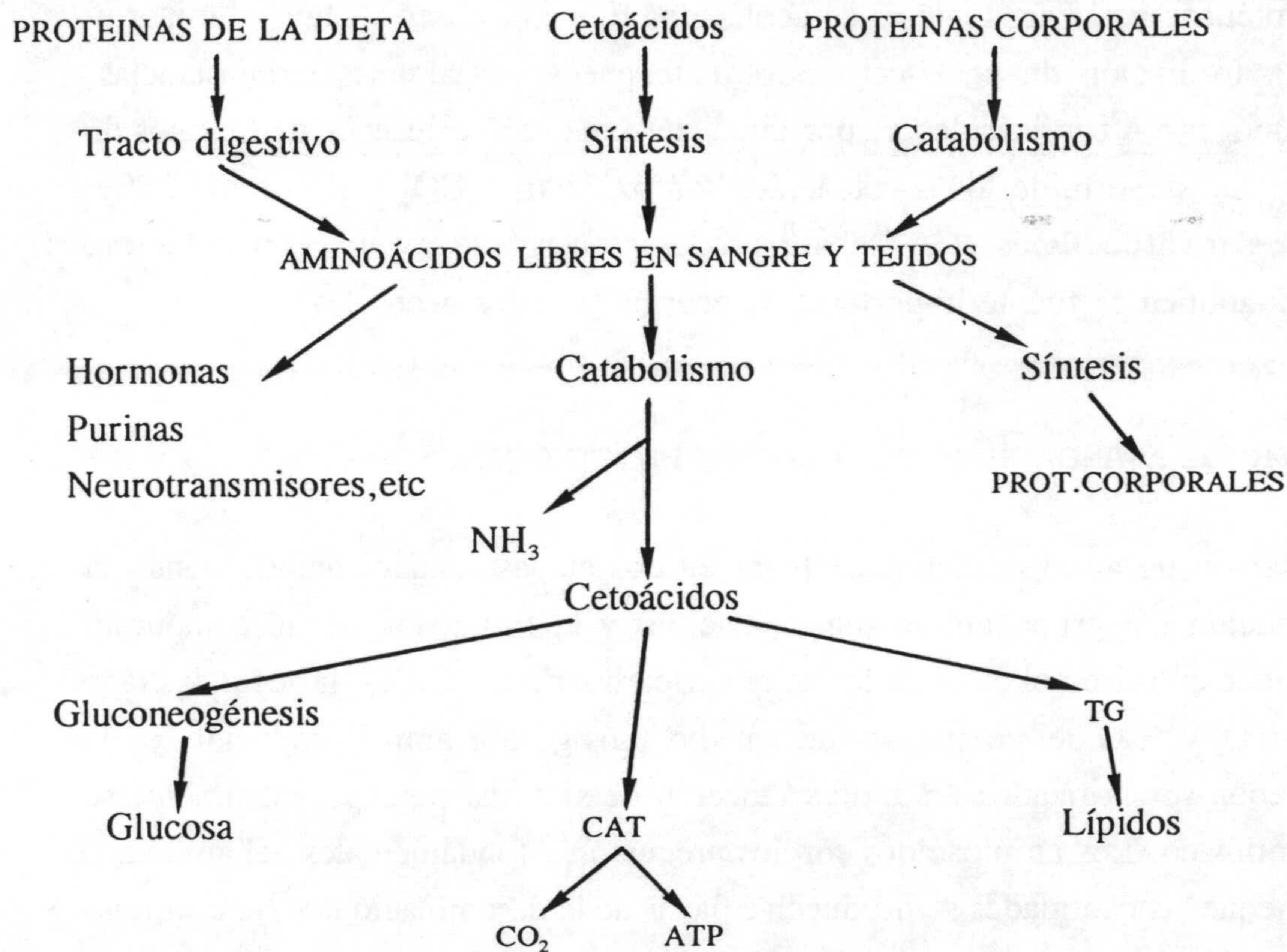
La regulación de la absorción de aminoácidos y, por tanto, su posterior disponibilidad postprandial, debería aplicarse a la revisión de las necesidades de aminoácidos esenciales. El uso de dietas con aminoácidos protegidos, es presumible que mejore su utilización para crecimiento, lo que demostraría la posible sobreestimación de los datos de necesidades de aminoácidos esenciales, al menos en algunas especies y circunstancias. En este sentido, Cho et al. (1992) re-evaluaron las necesidades de Arg usando dietas en las que cada aminoácido de la mezcla era incluido en agar, para retrasar su absorción. El resultado obtenido fue de 4.2 g Arg/16 g N, situado dentro del rango de valores obtenidos hasta entonces para la trucha por distintos autores: 3.0-4.5 g Arg/16 g N (Kaushik, 1979; Ogino, 1980; Kim et al., 1983; Chiu, 1984; Walton et al., 1986; Kaushik et al., 1978); sin embargo fue sustancialmente más bajo que el estimado por Ketola (1983), con un valor de 6.0 g Arg/16 g N, para el salmón chinook y generalmente aplicado a salmónidos. Sin embargo, una prueba más directa de esta hipótesis ha sido obtenida por nuestro grupo en la dorada: la determinación de las necesidades de Met, con dietas a base de soja que incluyen distintos niveles de este aminoácido, libre o microencapsulado, ha arrojado datos más favorables cuando el aminoácido está incluido en una cubierta de albúmina, que retrasa su absorción interna resultando valores de necesidades inferiores que al usar dietas con Met libre (Sierra, resultados no publicados).

Carrillo et al. (1980) midieron los ritmos diurnos de aminoácidos en plasma en el pez dorado y observaron que todos los aminoácidos excepto Val, Lys, y Tyr cambiaban su concentración a lo largo del día. La concentración de Ser, Arg, Asp, Met, Glu, Ile y His dependían del fotoperíodo, alcanzándose la concentración máxima al llegar el período de oscuridad. Por tanto, factores ambientales, como la luz, también deben ser tenidos en cuenta a la hora de estudiar la dinámica de aminoácidos en plasma en relación al tipo y calidad de la dieta.

2.5. METABOLISMO DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS EN PECES:

El metabolismo regula el aporte de la energía necesaria para los procesos vitales, compensa las pérdidas por el desgaste y excreción y controla el desarrollo y el crecimiento.

2.5.1. PRINCIPALES VÍAS METABÓLICAS DE LOS AMINOÁCIDOS EN LOS PECES:



La mayoría de los aminoácidos corporales están formando parte de las proteínas. Los relativamente pequeños "pools" de aminoácidos libres derivan de dos fuentes principales: la dieta y el catabolismo de las proteínas corporales que están en un "turn-over" constante. Los peces parecen depender más de las fuentes dietarias que los mamíferos, ya que el catabolismo de proteínas tisulares aporta, en los peces, alrededor del 50% de los aminoácidos de los "pools" precursores (Cowey y Luquet, 1983; Fauconneau y Arnal, 1985), comparado con valores medios del 70 al 80% en mamíferos (Millward et al., 1976). Esto hace que las necesidades proteicas de peces y mamíferos, sean respectivamente, de aproximadamente el 50% (ver revisión de la Higuera y Cardenete, 1993) y 20-30%, para completar el total de las necesidades aminoacídicas para síntesis proteica corporal. Por otra parte, mientras que los aminoácidos esenciales deben suministrarse en la dieta para cubrir las necesidades de crecimiento, los aminoácidos no esenciales pueden producirse por reacciones de síntesis, mediante la transferencia de grupos amino a esqueletos hidrocarbonados derivados del metabolismo intermediario.

Los aminoácidos se utilizan principalmente para la síntesis de proteínas estructurales y en menor grado para la síntesis de otras proteínas y compuestos de importancia bioquímica (Hormonas, purinas, neurotransmisores, cofactores, etc.). Los aminoácidos procedentes del intestino son transportados por medio del sistema porta hepático al hígado, centro principal del catabolismo, que controla sus concentraciones y ajusta coordinadamente su propio metabolismo, influyendo así sobre las concentraciones en la sangre y otros tejidos (Munro, 1976). Especialmente después de la comida, el aporte de aminoácidos a los tejidos supera sus capacidades biosintéticas y el excedente es catabolizado. El primer paso incluye eliminar el grupo amino y la formación de un α -cetoácido. Este puede, en algunas circunstancias, convertirse en glucógeno o triglicéridos y, por tanto, terminar como reserva de hidratos de carbono y lípidos. La mayoría de los α -cetoácidos son oxidados a CO_2 y H_2O a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) para producir energía (Cowey, 1980; Walton, 1987). Esta vía catabólica es fuente importante de energía para los peces.

2.5.2. CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y EXCRECIÓN DE NITRÓGENO

La degradación de aminoácidos tiene lugar en dos etapas fundamentales, siendo la primera la eliminación del grupo amino (desaminación) y la formación de un compuesto intermedio que puede entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT); la segunda etapa es la oxidación a CO_2 y H_2O del compuesto intermedio. Los grupos amino producidos en la primera etapa pueden ser utilizados en alguna reacción de síntesis, pero principalmente se excretan como amoniaco. Los aminoácidos son los precursores fundamentales del amoniaco excretado, otras pequeñas cantidades se producen a partir de la desaminación de otras aminas y nucleóidos.

Excreción de amoniaco:

Los teleósteos son amoniotélicos, es decir, el producto final de la degradación de aminoácidos es amoniaco, en vez de urea como en los mamíferos o ácido úrico en las aves. El amoniaco en forma de NH_3 es muy tóxico, pero a pH fisiológico el 99% del amoniaco está presente en la forma iónica NH_4^+ , menos tóxica. Dadas, sin embargo, sus altas concentraciones, la forma ionizada puede, a su vez, tener efectos tóxicos cuando las concentraciones de amonio total sobrepasan las 50 ppm (Meade, 1985, Moyano y Cardenete, 1988).

La principal excreción de nitrógeno proteico (60-90%) tiene lugar a través de las branquias, perdiéndose el resto a través de la orina, heces y piel. Entre el 60 y 90% del nitrógeno excretado lo hace en forma de amoniaco; el resto como urea, ácido úrico,

aminoácidos, trimetilamina, óxido de trimetilamina, creatina y creatinina. La excreción de amoniaco por las branquias tiene lugar por tres mecanismos principales: difusión no iónica de NH_3 , difusión iónica de NH_4^+ y por intercambio $\text{Na}^+ - \text{NH}_4^+$ (Evans, 1984).

La excreción de amoniaco está relacionada con el contenido proteico de la dieta, siendo los aminoácidos que exceden a los requeridos para la síntesis proteica rápidamente catabolizados después de la comida (Brett y Zala, 1975; Van Waarde, 1983). Beamish y Thomas (1984) relacionaron la excreción de nitrógeno total de la trucha arcoiris con la ingesta de nitrógeno. Sin embargo, no existe tal correlación entre la excreción de urea y la ingesta de nitrógeno (Brett y Zala, 1975; Kaushik et al, 1984).

Desaminación de aminoácidos:

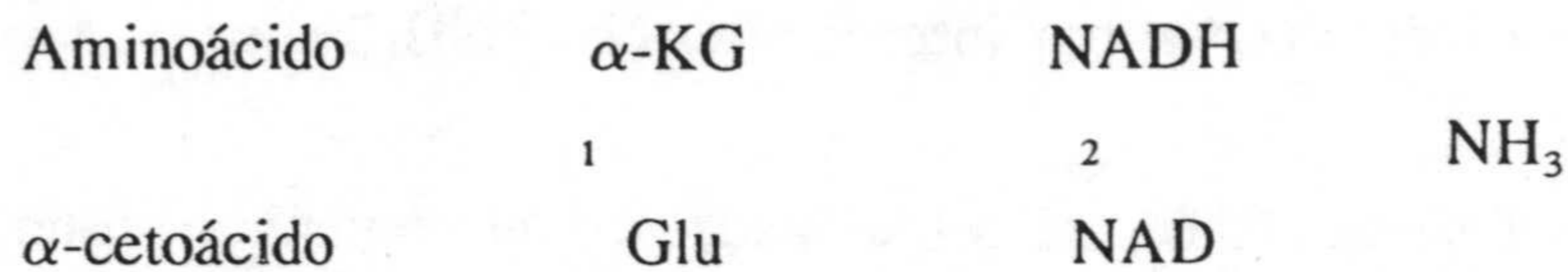
Los mecanismos productores de amoniaco pueden dividirse en dos tipos fundamentales:

- a) Desaminación directa del aminoácido mediante enzimas específicas
- b) Transferencia del grupo amino del aminoácido a un aceptor común que es posteriormente desaminado. (Brett y Groves, 1979; van Waarde, 1983; Cardenete y Moyano, 1988).

- a) La desaminación directa puede ser catalizada por varias enzimas, de las cuales la glutamato deshidrogenasa parece tener el papel más importante (van Waarde, 1983).
- b) Se han propuesto dos esquemas posibles para la transferencia de los grupos amino a un aceptor común:
 - 1) el esquema de transdeaminación de Braunstein (1957)
 - 2) el ciclo de nucleótidos purínicos de Lowenstein (1972).

Aunque, este último no parece tener un papel importante en la producción de amoniaco en el hígado de peces (Walton y Cowey, 1977; van Waarde, 1983).

(1) Esquema de transdeaminación de Braunstein (1957):



Reacción neta: *Aminoácido* + NAD \rightarrow α -cetoácido + NADH + NH₃

1. Aminoácido transaminasa
2. Glutamato deshidrogenasa

La transdeaminación implica la transferencia del grupo amino al α -cetoglutarato, reacción que es catalizada por una aminotransferasa, resultando en la formación de otro cetoácido más glutamato, que es entonces desaminado por la acción de la glutamato deshidrogenasa mitocondrial. Algunas aminotransferasas son muy específicas, mientras que otras reaccionan con varios aminoácidos. Están presentes en la mayoría de los tejidos y se ha demostrado que en músculo, hígado y riñón, tienen la capacidad de desaminar todos los aminoácidos (van Waarde, 1983). Las dos aminotransferasas que con más frecuencia se miden en estudios en los que se presume una respuesta del metabolismo nitrogenado, en los peces, son: aspartato aminotransferasa (GOT) y alanina aminotransferasa (GPT).

Las reacciones enzimáticas del metabolismo de los aminoácidos están afectadas por los mismos factores que regulan otros tipos de reacciones: nivel del enzima, presencia o ausencia de cofactores, hormonas, concentración de sustrato, acceso y transporte del sustrato al enzima, etc. Así pues, con concentraciones bajas de sustrato, se daría preferencia a la síntesis de proteínas y el catabolismo sería bajo, mientras que al aumentar las concentraciones de sustrato (p.ej. después de comer) el catabolismo aumentaría automáticamente.

2.5.3. EFECTOS DE LA CANTIDAD/CALIDAD PROTEICA SOBRE EL METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS:

Los principales efectos de un alta ingesta proteica dietaria son: aumento de la concentración de aminoácidos corporales, excreción de amonio, síntesis de proteína, actividad de los enzimas gluconeogénicos y descenso en la actividad de los enzimas glucolíticos (Cowey et al., 1977a,b). El efecto sobre la actividad de los enzimas catabolizantes de aminoácidos es mínimo, lo que ha llevado a Rumsey (1981) a sugerir que ésta pérdida de adaptación es una de las principales razones del por qué los peces requieren altos niveles de

proteína dietaria. Dado que los niveles y actividad de los enzimas catabolizantes de aminoácidos no decrecen significativamente cuando los peces ingieren dietas de bajo contenido proteico, no habría, por consiguiente, una conservación de aminoácidos para compensar una reducción de su ingesta.

La tasa de excreción de amonio está directamente relacionada con la cantidad de proteína consumida y con la relación P/E de la dieta (Rychly, 1980; Paulson, 1980; García-Gallego et al., 1981; Beamish y Thomas, 1985). De hecho, García et al. (1981) han demostrado la posibilidad de emplear la excreción de amonio como índice de la proporción de proteína empleada para la biosíntesis o como fuente de energía, lo que es en definitiva un indicador de su calidad. Cuanto mayor es la ingestión de nitrógeno, más elevada es la excreción máxima y más prolongada la duración del pico de excreción postprandial (Kaushik, 1980).

Hay pocos estudios acerca del efecto de diferentes niveles de aminoácidos en la dieta sobre las actividades enzimáticas en hígado. En trucha arcoiris, la variación en los niveles de Trp, Lys y Arg no tuvo efecto sobre las actividades de la triptófano pirrolasa, lisina alfa-cetoglutarasa reductasa y arginasa (Walton et al., 1984a,b, 1986). De esta forma, la falta de efecto sobre las actividades enzimáticas, de diferentes niveles de AAE en la dieta, es comparable a la falta de efecto similar provocado por la concentración de proteína de la dieta.

Debe recordarse, que las concentraciones tisulares de aminoácidos tienden a ser más altas que las correspondientes a la K_m de las aminoacil-sintetasas y más bajas que los valores de K_m de los enzimas del catabolismo aminoacídico. Por tanto, cuando los niveles tisulares de aminoácidos se incrementan (p.e. con altas ingestas de proteína) las aminoacil-sintetasas han alcanzado una cinética de orden cero y la síntesis proteica presenta valores máximos (Lied y Braaten, 1984). Por otra parte, los enzimas responsables del catabolismo de los aminoácidos presentan una cinética de primer orden con actividades directamente relacionadas con las concentraciones de sustrato. Este diferente comportamiento, de ambos tipos de enzimas, significa que a bajas concentraciones de sustrato la síntesis proteica tiene preferencia, y a medida que las concentraciones de sustrato crecen el catabolismo de los aminoácidos aumenta automáticamente. Esto es lo que ocurre al alimentar peces con dietas de elevado contenido proteico o alta relación proteína/energía y con dietas de baja calidad proteica, cuando las disponibilidades de todos o casi todos los aminoácidos exceden la capacidad del proceso de síntesis (Walton y Cowey, 1982).

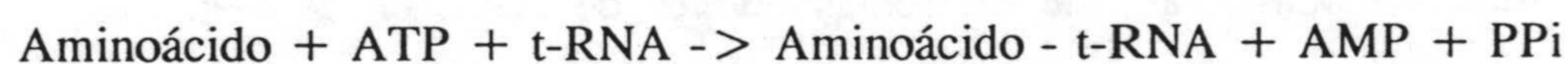
2.5.4. DESTINO METABOLICO DE LOS AMINOÁCIDOS: RECAMBIO PROTEICO

Las proteínas, como el resto de constituyentes celulares, están sujetas a un proceso simultáneo y dinámico de síntesis y degradación, cuyo balance global es su recambio continuo.

2.5.4.1. Síntesis de proteínas

Los aspectos concernientes a la síntesis de proteínas en los peces han sido revisados recientemente por Fauconneau (1985). El depósito de proteína durante el crecimiento (K_G) es el resultado de la síntesis (K_S) y degradación proteica (K_D). La síntesis total de proteínas corporales excede a su deposición, ya que muchas proteínas también se degradan. El porcentaje de una proteína dada que es renovada por unidad de tiempo, es conocido como tasa de reciclaje fraccional (turnover).

La primera etapa de la síntesis de proteínas es la activación del aminoácido con ATP y su enlace a un RNA de transferencia específico a través de la reacción de un enzima acil t-RNA sintetasa.



La síntesis de proteína ocurre a continuación en un complejo de ribosomas ligado a una molécula de RNA mensajero que porta el código de la proteína a sintetizar. La estructura completa se llama polirribosoma o polisoma.

Se han usado distintos métodos en peces para el estudio de la síntesis proteica que han proporcionado resultados útiles. Algunos resultados cualitativos han sido obtenidos inyectando aminoácidos radiactivos en peces y midiendo los niveles relativos de radiactividad en varias proteínas tisulares (Narayansingh y Eales, 1975; Peragón, 1993). Tales estudios han demostrado que la velocidad de proteínosíntesis es alta (10-20% de la proteína tisular/día) en hígado, branquias, intestino, riñón y bazo, pero debido al alto reciclaje (90%), hay poco crecimiento en esos tejidos. Las velocidades de síntesis son más bajas (0.1-2% día) en músculo rojo y blanco, pero como el reciclaje es también bajo, más del 50% de la proteína que se forma es integrada en el depósito proteico. En peces (carpín dorado y trucha), se ha observado que la síntesis proteica en hígado y branquias es mayor que en el músculo (Das y Krishnamoorthy, 1968; Haschemeyer et al., 1979; Smith, 1981). Sin embargo, algunos autores han encontrado que las diferencias en las tasas de síntesis proteica entre el músculo e hígado eran menos importantes (1.5 - 2.5 veces) en la carpa *Cyprinus carpio* L. (Castilla, 1974; Bouche, 1975).

El músculo blanco de los peces constituye entre el 40 y 60% del contenido proteico total y supone el 30-40% de la síntesis de proteína corporal (Fauconneau y Arnal, 1985; Houlihan et al., 1988), comparado con el 30-40% de síntesis, del conducto digestivo y el 8-14% del hígado (Fauconneau, 1980, 1985). Además, el músculo de los peces es el lugar de mayor acumulación de proteína, es decir, presenta una alta eficacia de depósito y se caracteriza, al mismo tiempo, por su menor actividad de degradación proteica (Fauconneau, 1985; Houlihan et al., 1986; Houlihan y Laurent, 1987; Houlihan et al., 1988). La K_s del músculo blanco es, por otra parte, la más sensible de las K_s tisulares al estado nutricional y la velocidad de crecimiento del pez (Fauconneau et al., 1985; Smith, 1981; Lied et al., 1985). Estas observaciones permiten creer que la medida de la K_s del músculo blanco es un buen indicador de la velocidad de crecimiento corporal (Smith, 1981; Fauconneau et al., 1990; Peragón, 1993).

Si analizamos el contenido de RNA celular, como estimación de la eficacia de síntesis de los distintos tejidos, las diferencias son escasas aunque significativas (Cowey y Luquet, 1983), siendo mayor en hígado que en músculo (Fauconneau, 1980; Smith, 1981). Una estrecha relación entre la razón RNA/proteína, crecimiento y velocidad de síntesis de proteína se ha observado en músculo blanco, para regímenes de alimentación constante, cosa que no ocurre tras una única comida (Houlihan et al., 1989).

Anteriormente hemos admitido que las proteínas de distinta calidad pueden condicionar el perfil de aminoácidos en plasma, reflejando la composición dietaria (Murai et al., 1986, 1989). Estos cambios en la calidad de la proteína de la dieta (p.e. balance Arg-Lys) alteran la síntesis proteica en el músculo de la trucha. Fauconneau (1985) ha demostrado alteraciones en la síntesis proteica del pez cuando usaba dietas deficientes o no balanceadas en aminoácidos esenciales.

Por ejemplo, se ha observado que en la trucha, la síntesis proteica muscular está afectada por cambios cualitativos en la dieta: cuando los peces son alimentados con una dieta no balanceada en aminoácidos, disminuye el crecimiento y la síntesis proteica. Esta sensibilidad de la síntesis proteica muscular al balance de aminoácidos ha permitido a algunos autores el uso de la síntesis proteica muscular "in vitro" como índice de la tasa de crecimiento, bajo distintas condiciones de alimentación (Lied et al., 1983; Rosenlund et al., 1983). Asimismo, la síntesis proteica del pez entero medido "in vivo", decrece cuando alimentamos a éste con una dieta deficiente o no balanceada en aminoácidos, comparada con una dieta control (Fauconneau, revisión en Nutrition and feeding in Fish, 1985). Por tanto, la síntesis proteica del animal entero puede ser usada como índice de la sensibilidad a una dieta. El análisis de los cambios en la síntesis proteica, tanto en el animal completo como en músculo, sirve para estimar la calidad y valor biológico de un alimento. Estos cambios

analizados en conjunto, aportan información para la estimación de los requerimientos proteicos del pez (Fauconneau, 1985).

2.5.4.2. Influencia de factores ambientales sobre la síntesis de proteína: Efecto de la temperatura:

La temperatura es uno de los factores más importantes que gobiernan la síntesis proteica en los tejidos. Al ser los peces poiquiloterms, la tasa metabólica está relacionada con la temperatura ambiente. La síntesis proteica se ve influenciada por la temperatura, con un rango de valores de Q_{10} de 2 a 20, dependiendo de la especie, tejido o rango de temperatura (Haschemeyer et al., 1979; Smith et al., 1980; Fauconneau, 1984). En general para cada aumento de 10 °C hay un aumento de actividad enzimática y metabólica de 2,5 veces (Fauconneau, 1985; Hawkins et al., 1987) si bien, en músculo el patrón de cambio en función de la temperatura no está claro.

La influencia de la temperatura sobre los enzimas del metabolismo intermediario no está clara en peces y parece depender del enzima o de la especie de que se trate. Por ejemplo, la actividad aspartato aminotransferasa en hígado de trucha aumenta con el aumento de la temperatura (Jürss, 1979). Por otra parte, en la carpa, la actividad específica de la aspartato y alanina aminotransferasas disminuyó cuando carpas adaptadas a temperaturas de 7, 15 ó 20 °C, fueron transferidas a aguas con 8 grados más de temperatura; sin embargo, si carpas aclimatadas a 25 °C se pasaban a 33 °C, la actividad aumentaba (Lacombe, 1973). La arginasa en la trucha mostró una compensación termal al aumentar la temperatura (Vellas et al., 1982). Por el contrario, otros enzimas como la glutamato deshidrogenasa, glutamasa y uricasa no mostraron ese efecto (Kaushik, 1986).

A partir de los datos obtenidos por Kaushik (1981) y Fauconneau y Arnal (1985) se evidencia que un incremento de la temperatura, estimula la ingesta, síntesis proteica, degradación y reutilización proteicas a niveles intracelulares. Los pesos relativos de distintos órganos o tejidos en la trucha se vieron afectados por la temperatura del agua (Fauconneau y Arnal, 1985). El turnover proteico en hígado y digestivo aumentó con el incremento de la temperatura, pero las variaciones en el animal entero y turnover proteico muscular fueron bajos y probablemente se vieron enmascaradas por el gran cambio en el depósito proteico producido por el incremento de la temperatura ambiental (Fauconneau y Arnal, 1985).

Algunos peces poseen ciertos mecanismos de adaptación para compensar los cambios de temperatura, (Loughna y Goldspink, 1985) por ejemplo, exhibir niveles más altos de síntesis de proteínas a bajas temperaturas, de lo que cabría esperar a partir de los niveles encontrados en peces que viven a temperaturas más altas (Haschemeyer, 1985, Fauconneau

et al., 1981; Fauconneau, 1985). Los resultados muestran que la aclimatación al frío está asociada a mayores tasas en la síntesis proteica en el músculo blanco y rojo de la carpa aclimatada a 8 y 28°C (Watt et al., 1988). Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos implicados. Según Kaushik (1981), el efecto beneficioso del aumento de la temperatura, sobre la retención de nitrógeno y energía, es más atribuible al aumento de la ingesta que a cualquier mejora significativa a nivel digestivo y metabólico, ya que las pérdidas de nitrógeno o energía (fecal, branquial o urinaria) fueron prácticamente las mismas a 10 y a 18 °C en la trucha arcoiris.

Por su parte, Lied y Rosenlund (1984) observaron también que el contenido muscular de ADN se afectaba poco por la temperatura, mientras que el contenido de ARN (en relación a la síntesis de proteínas) aumenta cuando disminuye la temperatura.

2.5.4.3. Catabolismo de proteína corporal: Degradación

Las proteínas corporales están constantemente en estado de reciclaje (turnover), es decir, existe síntesis y degradación continua de las mismas. Las alteraciones en el nivel de reciclaje pueden conseguirse, bien por aumento en el nivel de síntesis o disminución en los niveles de degradación, o viceversa.

No se conoce una técnica segura para medir la degradación de proteínas en peces. Sin embargo, se puede obtener una estimación a partir de la diferencia entre la velocidad de síntesis y el crecimiento (deposición). En algunos mamíferos se ha obtenido una medida de la degradación de proteína miofibrilar, midiendo la excreción de la 3-metil-histidina, que es un componente específico de tales proteínas (Munro, 1976). Pero éste método no es válido en peces, ya que la 3-metil-histidina parece ser que es metabolizada en estos animales (Fauconneau, 1985).

Existe un número de enzimas, habitualmente localizadas en los lisosomas, capaces de metabolizar proteínas tisulares, entre ellas, las catepsinas A, B, C y D, proteinasas ácidas, neutras y alcalinas. Estos enzimas se han detectado en los tejidos de los peces (Creach, 1972; Mikodan et al, 1983; Bonete et al, 1984). La actividad de las catepsinas es más alta en hígado, riñón y bazo que en músculo rojo o blanco (Creach, 1972). Sin embargo, los mecanismos de control de la degradación están menos claros. Somero y Doyle (1973), sugirieron que las actividades de los enzimas proteolíticos, dentro de los tejidos, no son limitantes del proceso, es decir, operan muy por debajo de sus máximas actividades. Por el contrario, sugieren que la velocidad del catabolismo de proteínas se decide por el grado de susceptibilidad de la proteína "in situ". Por lo tanto, cambios en el pH, medio iónico, presencia o ausencia de sustratos o cofactores, podrían alterar la estructura terciaria o

cuaternaria de las proteínas, haciéndolas más o menos susceptibles a la acción de las proteasas.

Las células tienen también sistemas proteolíticos extralisosomales implicados en el catabolismo de proteínas (Hershko y Ciechanover, 1982). La presencia de unas proteasas de alto peso molecular fue descubierta por varios autores en varios extractos de tejido: en el cristalino (Blow et al, 1975) y pituitaria bovina (Wilk et al., 1979), en músculos de peces (Mikodan et al., 1963; Hase et al., 1980; Folco et al., 1988), hígado de ratón (Rivett, 1989) y en músculo esquelético de rata (Dahlmann et al., 1985). Sus funciones fisiológicas y su mecanismo de control en las células "in vivo" son aun desconocidas. Se han investigado varias proteasas no lisosomales en músculo de peces (Hase et al., 1980; Busconi et al, 1984; Folco et al, 1984). Se ha estudiado en carpa y en white croaker la estructura de una proteína purificada, la proteasa alcalina, cuyas características multicatalíticas son similares a las descritas en mamíferos. Estos trabajos demostraron que el complejo estaba ampliamente distribuido en los tejidos animales. Hoy está bien establecido que el MPC está presente en todas las células eucarióticas (Dahlmann et al., 1985; Rivett, 1989) y que constituye entre el 0.5-1 % de la proteína de homogenados de tejido (Hendil, 1988). Y que es un factor importante en el turnover proteico intracelular, aunque aún no se han obtenido evidencias de ello "in vivo".

Una nueva forma, aparentemente bastante sensible, para la medida de la degradación proteica, además de la típica excreción de metil-histidina, proteólisis lisosomal o degradación de proteínas marcadas, parece ser la determinación de estas proteasas citoplásmicas extralisosomales. Se trata del complejo proteasa multicatalítico (MPC), un enzima de actividad endopeptidasa que degrada sustratos proteicos.

El complejo multicatalítico proteasa (MPC):

El complejo multicatalítico proteasa (MPC) primeramente descrito en pituitaria bovina (Orlowski y Wilk, 1981, 1988; Wilk y Orlowski, 1980, 1983) es una inusual proteasa de alto peso molecular (700 Kd) compuesta de una serie de subunidades de bajo peso molecular no identificadas. El complejo exhibe tres actividades endopeptidasas distintas, que rompen uniones peptídicas por el enlace carboxílico de residuos de aminoácidos hidrófobos, ácidos o básicos (Wilk y Orlowski, 1980; Dahlmann et al, 1985). Hay evidencias de que esta actividad al menos se manifiesta en dos sitios catalíticos distintos que pueden ser activados selectivamente o inhibidos por varios tratamientos (Rivett, 1989; Folco et al., 1992). Esto puede ser útil para mejorar la eficacia biológica del enzima, desde que todas las actividades pueden actuar coordinadamente en la degradación de sustratos proteicos. Las tres actividades se refieren a: actividad similar a la quimotripsina (CT-L) rompe residuos hidrofóbicos,

actividad similar a la tripsina (T-L) rompe residuos básicos y actividad peptidil-glutamil peptido hidrolizante (PGPH) rompe residuos glutámicos y aromáticos. Cada una de estas actividades está asociada a distinto componente del complejo (Orlowski y Wilk, 1981; Wilk y Orlowski, 1983). La proteína representaba un complejo multienzimático con tres actividades asociadas a distintos componentes del sistema, por ello se le denominó como complejo proteasa multicatalítico (Orlowski y Wilk, 1981;1988; Wilk y Orlowski, 1983; Dahlmann et al., 1985). El MPC constituye el mayor sistema proteolítico extralisosomal (Orlowski y Michaud, 1989). Aparentemente está implicado en vías de proteólisis intracelular (degradación de proteínas) Ubiquitina-dependiente y Ubiquitina-independiente. (Rechsteiner, 1987; Eytan et al., 1989; Driscoll y Goldberg, 1990).

La MPC principalmente se localiza en la fracción soluble de homogenados celulares (Dresdner et al., 1982). En músculo esquelético se localiza en los espacios intermiofibrilares y células endoteliales vasculares (Tanaka et al., 1988).

Una propiedad consistente de la MPC de varias fuentes es la activación por bajas concentraciones de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) y Ácidos Grasos (Orlowski y Wilk, 1981; Dahlmann et al., 1985) parece estar asociado a cambios conformacionales (Saitoh et al., 1989) llegando a la conclusión de que el complejo está latente y que su activación es necesaria para que se exprese toda su actividad. Aunque hay evidencias de que la expresión de la PGPH puede ser reprimida por la presencia de pequeñas cantidades de proteínas contaminantes, esto podría explicar la aparente latencia observada en varios estudios y también por la β -caseína, lisozima y albúmina de suero bovino.

Degrada proteínas como la hemoglobina, caseína, albúmina bovina, lisozima, con un pH óptimo entre 7.5-9.5 (Rivett, 1985). La fosforilación de la proteína es otro factor que puede acelerar o enlentecer la degradación proteica (Orlowski y Michaud, 1989).

El principal componente responsable de la degradación de proteínas es la PGPH (Orlowski y Michaud, 1989) y es fuertemente activada por bajas concentraciones de SDS y ácidos grasos. Una inhibición irreversible de la CT-L conlleva a la activación de la T-L, indicando una interacción entre los componentes del complejo. El MPC presenta características de la clase de las serina-proteasas. La conservación de la integridad del MPC es necesaria para la expresión de su actividad proteolítica, por tanto es una unidad funcional con distintas actividades.

Estudios sobre el enzima de pituitaria bovina mostraron que los tres componentes proteolíticos son inhibidos por bajas concentraciones de cationes monovalentes Na^+ y K^+ (Wilk et al., 1979; Wilk y Orlowski, 1980). La actividad de la MPC parece estar bajo

regulación de metales iónicos (Orlowski, 1990). Es activada también por la subida de Ca^{++} . El uso de inhibidores de la proteólisis lisosomal muestra que la degradación proteica citoplasmática juega su principal papel en el turnover proteico intracelular.

Se están realizando innumerables esfuerzos por parte de muchos investigadores para la identificación de factores determinantes del turnover proteico intracelular: identificar los enzimas que intervienen en la degradación, su estructura, mecanismo de acción y especificidad, así como los determinantes estructurales y las modificaciones de la proteína que puedan influir en la tasa de degradación. La proteólisis intracelular debe ser un proceso altamente controlado y regulado. Puede esperarse que afecte al ordenado funcionamiento del metabolismo celular, ya que puede causar daños graves si no es debidamente controlado. La función exacta del MPC es desconocida aún, pero su distribución omnipresente y la alta concentración del MPC en las células sugiere que debe tener un papel central en la degradación proteica intracelular. Este sistema proteolítico extralisosomal funcionaría en armonía con oligoendopeptidasas citoplasmáticas y exopeptidasas que degradarían las proteínas hasta aminoácidos. La acción del MPC debe estar perfectamente regulada en las células para prevenir una acción incontrolada sobre las proteínas intracelulares. De hecho, se ha propuesto que la MPC está presente en las células en forma inactiva (Tanaka et al., 1988; McGuire et al., 1988)

La significación fisiológica y la base bioquímica de su actuación no están claras, desde que la preparación de enzimas difiere considerablemente en la respuesta a similares tratamientos (Orlowski, 1990). El enzima debe responder de distinta manera a distintos efectos fisiológicos dependiendo de los requerimientos de la célula o su localización. La MPC puede encontrarse en citoplasma, núcleos y membranas, probablemente tomando distintas funciones (Tanaka et al., 1988; 1989). Arrigo et al. (1988) y Falkenburg et al. (1988) han encontrado que la MPC es idéntica a los prosomas, a partículas que intervienen en la represión del mRNA, en el proceso de tRNA (Castaño et al., 1986) y síntesis de tRNA aminoacil. La reciente conclusión de que MPC está implicado en ATP-proteólisis dependiente (Tanaka et al., 1988; McGuire et al., 1988; Matthews et al., 1989) reafirma la idea de que juega un papel importante en el turnover proteico intracelular. También se ha visto que el nivel del enzima es mucho más alto en gónadas que en cualquier otro tejido, intestino, estómago y músculo ($\mu\text{g}/\text{g}$ tejido), por lo que se ha sugerido que puede tener importancia en el desarrollo embrionario.

2.6. PROBLEMATICA DE LA NUTRICION PROTEICA EN PISCICULTURA: LA HARINA DE PESCADO COMO FUENTE DE PROTEINA.

La harina de pescado es la materia prima que, tradicionalmente, viene suministrando la mayor parte de la proteína de los piensos para peces. Su elevado contenido protéico, su composición equilibrada en aminoácidos esenciales y su buena digestibilidad, le confieren una excelente calidad nutritiva, lo que unido a su buena palatabilidad y aporte de ácidos grasos esenciales y minerales, aseguran una óptima utilización nutritiva y elevadas tasas de crecimiento. Por ello, los niveles de inclusión en las dietas para peces son altos, oscilando en el caso de salmónidos entre el 20 y el 60% de la dieta (Murai, 1992).

Hasta comienzos de los años setenta las harinas de pescado mantuvieron en el mercado calidades altas, buena disponibilidad y precios muy competitivos; sin embargo, la coincidencia de una serie de factores desató una crisis en el sector con un aumento tan espectacular de los precios, que disparó los costes de los piensos e hizo cundir la alarma entre las empresas dedicadas a la piscicultura, poniendo en evidencia que todo el futuro potencial de la piscicultura estaba demasiado ligado a las harinas de pescado y, por consiguiente, a la pesca.

De la producción total de harinas de pescado, más del 10% es utilizado en la fabricación de piensos para acuicultura; en 1988 más de 650.000 Tm se utilizaron en la fabricación de dietas para acuicultura intensiva o semi-intensiva (Pike et al, 1990). Aunque la producción de harinas de pescado se ha estabilizado en los últimos años, su precio aún oscila notablemente y, lo más importante, todavía persisten los factores desencadenantes de la anterior crisis: restricciones impuestas a la pesca, sobreexplotación y agotamiento de caladeros, posibilidad de cambios en las corrientes oceánicas, desvío de las capturas hacia consumo humano al mejorar las tecnologías en el procesado del pescado, incremento de la demanda por el desarrollo de actividades zootécnicas, entre ellas la acuicultura, etc. Todo ello, incide en que las perspectivas para el futuro no sean demasiado optimistas: la "International Fish Meal Manufacturers Association", prevee un descenso en la producción de al menos el 5%, para finales de la década, mientras que la demanda para acuicultura se duplicará (McCoy, 1990), al mismo tiempo que también aumentará su demanda para otras actividades; consideremos el explosivo desarrollo de la industria avícola, que tuvo lugar en China y que aún persiste.

Parece claro, pues, que han pasado los días de alimentos baratos para la acuicultura y que se hace necesario encontrar otras fuentes de proteína que limiten la dependencia que sufren los piensos para peces de la harina de pescado, al tiempo que permitan fórmulas-

pienso más abiertas y que, manteniendo la calidad nutritiva, no fluctúen tanto en sus precios. La búsqueda de estas nuevas fuentes no es tarea fácil, entre los criterios a considerar, de cara a la elección de una materia prima como fuente proteica, cabría destacar, según de la Higuera y Cardenete (1987), los siguientes:

- Contenido proteico elevado que permita una sustitución sustancial de la harina de pescado, sin afectar a los niveles de inclusión del resto de componentes de la dieta.
- Calidad nutritiva de la proteína, sobre todo en lo relativo a la composición en aminoácidos esenciales y digestibilidad además de una buena palatabilidad para los peces.
- Posible presencia de factores antinutritivos en la materia prima a evaluar y estudio de un posible método para su eliminación.
- Aporte de ácidos grasos esenciales (especialmente poliinsaturados), vitaminas del grupo B, minerales (ácido fosfórico y fosfatos) asimilables.
- Posible existencia de un factor de crecimiento (Kaushik, 1990).

No obstante, cualquier fuente proteica, salvo excepciones de concentrados proteicos, aporta a la dieta otros nutrientes al margen de la propia proteína y, por tanto, se requiere una evaluación global de la materia prima, en lugar de realizar exclusivamente la evaluación de su calidad proteica.

Al margen de las consideraciones puramente nutricionales, existen dos factores a tener en cuenta a la hora de utilizar fuentes proteicas alternativas a la harina de pescado: la continuidad en el suministro y el precio. No obstante, y aunque lo deseable sería que las nuevas fuentes de proteína tuvieran al menos el mismo precio que la harina de pescado, el abaratamiento de los precios puede quedar como un objetivo secundario si se consigue la continuidad en el suministro y mayor independencia de la harina de pescado, es decir, de la pesca.

2.7. PROTEINAS ALTERNATIVAS A LA DE HARINA DE PESCADO

Hasta la fecha se han llevado a cabo gran número de trabajos en los que se han evaluado numerosas fuentes proteicas, incluyéndolas en proporciones variables en piensos para peces. Para un conocimiento más amplio de los experimentos llevados a cabo con proteínas de diversos orígenes, remitimos a revisiones más exhaustivas (Tacon y Jackson, 1985; de la Higuera y Cardenete, 1993).

Las fuentes proteicas susceptibles de ser usadas como alternativas a la harina de pescado son:

- Proteínas de origen animal: desperdicios de matadero, ensilados de peces, derivados lácteos y otras menos convencionales como harinas de krill, lombriz y oligoquetos.
- Proteínas de origen vegetal, donde se incluyen una amplia gama de harinas de semillas vegetales.
- Proteínas de organismos unicelulares como levaduras, algas y bacterias.
- Fuentes de nitrógeno no proteico, como la urea y el ácido úrico.

Nos limitaremos a considerar las posibilidades nutritivas de las fuentes proteicas de origen vegetal, centrándonos más profundamente en el gluten de maíz, que es la fuente proteica utilizada en los ensayos de este trabajo.

2.7.1. Proteínas de origen vegetal

Estas materias primas están adquiriendo cada vez mayor importancia en la fabricación de piensos para peces. Su competitividad frente a las harinas de pescado estriba fundamentalmente en: a) su mayor producción, no limitada por la productividad natural del medio y b) en que muchas de ellas son subproductos agroindustriales y, por consiguiente, los precios pueden llegar a ser muy competitivos.

Sin embargo, las fuentes proteicas vegetales se consideran de peor calidad que las de origen animal por varios motivos. En primer lugar, su contenido en proteína es, como media, bastante inferior al de las harinas de pescado. Por otra parte, se les ha atribuido una digestibilidad mas baja, consecuencia muchas veces de la presencia de factores antinutritivos, (Richarson et al., 1985) y deficiencias en aminoácidos esenciales (lisina y metionina generalmente) (Murai, 1992). No obstante, hay que precisar en cada caso la digestibilidad real y el papel que puedan jugar distintos procesos tecnológicos en cuanto a mejora de su utilización nutritiva (Tacon et al., 1983; Tacon y Jackson, 1985; Kaushik, 1990) y la posibilidad de complementación con otras proteínas, aminoácidos libres o protegidos, para retrasar su absorción.

2.7.1.1. Gluten de maíz:

El gluten de maíz está constituido por dos proteínas insolubles, la gluteína y la glicina, presentes en los cereales. Se obtiene por hidratación de estas proteínas y eliminación del almidón y sustancias solubles de la harina. A nivel industrial, el gluten de maíz se recupera como subproducto durante la obtención del almidón, siendo sus usos principales la fabricación de adhesivos, alimentos para diabéticos, fuente de ácido glutámico (24% de la proteína), alimentación animal, como fuente de proteína y pigmentos. También se usa en la fabricación de glutamato monosódico, que es un potenciador del sabor muy utilizado en la

industria alimentaria (Smith, 1958).

Debido a su alto contenido en proteína (hasta un 72%), se le considera un concentrado proteico y, aunque se ha empleado con éxito en aves, suplementado con lisina, su uso no está demasiado extendido en acuicultura, aunque produce excelentes resultados en las dietas para salmónidos (Fauconneau, 1988), si bien, siempre en niveles inferiores al 30% (Alexis et al., 1985; Moyano et al., 1992). La asimilación de la proteína de gluten de maíz parece ser parcial, debido a que en su composición entran algunas albúminas que dificultan el ataque enzimático (Coll, 1986).

Una de las principales limitaciones es precisamente su bajo contenido en lisina, recomendándose su suplementación con este aminoácido limitante, cuando se incluya a niveles más altos en la dieta. La digestibilidad de la proteína de glúten, en las especies empleadas en nuestro experimento, es buena: 91-95% en la carpa (Ogino y Chen, 1973; Pongmaneerat y Watanabe, 1991) y 93% en la trucha (Cho y Slinger, 1979). Los factores antinutritivos que pueda contener (inhibidor de la proteasa, ac. fítico, factores estrogénicos y aflatoxina) pueden mitigarse fácilmente (con calor, suplementación, extracción con solventes y evitar el crecimiento de hongos).

2.7.1.2. Otras fuentes proteicas vegetales:

La harina de soja ha sido la fuente proteica vegetal más estudiada y empleada en dietas para peces, fundamentalmente en razón a su relativamente elevado contenido proteico y buen perfil aminoacídico. Hasta la fecha ha destacado, pues, como el sustituto vegetal por excelencia de las harinas de pescado y es por ello, por lo que sus precios evolucionan paralelamente a los de éstas. No obstante, tal y como ya se ha mencionado, todo ello depende de someter a la soja a un tratamiento tecnológico adecuado que elimine los factores antinutritivos presentes en la semilla (Kaushik, 1990; Murai, 1992). No es igualmente efectiva tampoco en todas las especies de peces. Así, carpa, trucha y salmón parece que utilizan progresivamente peor altos niveles de inclusión en las dietas de esta fuente de proteína (Moyano, 1990; Murai, 1992). Pese a todo, la harina de soja, adecuadamente tratada y suplementada con aminoácidos (metionina), puede utilizarse como fuente proteica mayoritaria, llegando a sustituir cantidades importantes (hasta 50%) de la proteína de harina de pescado (Viola et al., 1982).

Algunas otras harinas vegetales presentan un potencial similar a la de soja, aún cuando su valor nutritivo esté menos estudiado y, por tanto, su uso menos extendido. Este es el caso de las harinas de variedades dulces de semilla de altramuz (bajas en alcaloides), que han producido resultados equiparables, e incluso mejores, a los de la soja, en carpa

(Viola et al., 1989) y en trucha (de la Higuera et al., 1988; Hughes, 1988; Gomes y Kaushik, 1989).

Algo similar sucede con las variedades de colza con bajos niveles de glucosinolatos, si bien en este caso quizá su potencial sea menor (20% de inclusión en la dieta), puede que debido a su alto contenido en fibra que disminuye la digestibilidad (Hilton y Slinger, 1981), o a su mayor desequilibrio en aminoácidos esenciales.

La harina de semilla de algodón, previa extracción de su aceite, se emplea comunmente a niveles medios de inclusión en muchas de las dietas para carpas (Anwar et al., 1982) y también se ha incorporado con cierto éxito a las dietas de salmones (Fowler, 1980).

Muchas otras proteínas vegetales se han ensayado con resultados muy variables en cuanto a su capacidad para mantener altos índices de crecimiento. Entre éstas se pueden citar los concentrados proteicos vegetales como el de soja, hojas de alfalfa, plantas de centeno e, incluso, patata. Los problemas para su utilización en los piensos estriban, fundamentalmente, en una baja palatabilidad, mantener los desequilibrios en aminoácidos de las proteínas de las que proceden y, a veces, su precio que no es muy competitivo, debido al coste de los procesos necesarios para su obtención.

2.7.1.3. Suplementación de fuentes proteicas con aminoácidos:

Varios investigadores han demostrado las posibilidades de la suplementación de proteínas deficientes con aminoácidos libres, para su aplicación en dietas prácticas para peces. Rumsey y Ketola (1975) encontraron que la suplementación de una dieta que contenía harina de soja como única fuente proteica, con una mezcla de aminoácidos, hasta lograr una dieta cuyo contenido en aminoácidos simuló la composición del huevo de la trucha o de la proteína muscular del pez, mejoró sensiblemente el crecimiento de la trucha arcoiris. Sin embargo, la adicción de Met, Lys, His y Leu individualmente o en varias combinaciones, siempre cubriendo las necesidades teóricas de la trucha, no tuvo efecto. Similares resultados se observaron en el salmón atlántico (*Salmo salar*) (Ketola, 1982). Otros investigadores han obtenido también mejoras del crecimiento mediante la suplementación de proteínas con aminoácidos esenciales en dietas prácticas para la trucha arcoiris (Tiews et al, 1976; Dabrowska y Wojno, 1977) y carpa común (Murai et al, 1982a, 1986; Viola et al, 1982).

En el pez gato, los primeros ensayos fueron incapaces de demostrar la utilidad de la suplementación aminoacídica (Andrews y Page, 1974; Andrews et al, 1977); sin embargo, estudios posteriores han demostrado la utilización de la lisina empleada en la suplementación de dietas de harina de cacahuete (Robinson et al, 1980b) y de la metionina suplementada en

dietas a base de harina de soja (Murai et al, 1982a). La adición de aminoácidos no esenciales (glutámico, alanina, etc.) o la de ácidos orgánicos (cítrico), muestra en salmónidos un efecto positivo sobre la utilización de la proteína (Hughes, 1985; Fauconneau, 1988; Moyano et al., 1992), probablemente debido a la utilización de sus cadenas carbonadas en la producción de energía.

Existe bastante controversia actualmente en cuanto a las posibilidades reales de utilización de aminoácidos esenciales libres añadidos a la dieta, por las distintas especies de peces. Se admite de manera general que los salmónidos absorben y utilizan bien los aminoácidos dietarios libres (Ketola, 1982; Murai et al., 1987), mientras que otras especies, como la carpa, muestran una menor capacidad (Kaushik y Dabrowski, 1983). En cualquier caso, parece mas oportuno para obtener en la dieta el perfil aminoacídico deseado, recurrir a mezclas de proteínas antes que a la adición de aminoácidos, al menos cuando éstos se añaden de forma libre; ya que si los aminoácidos añadidos no se protegen adecuadamente, parece existir una asincronía entre las tasas de absorción y utilización de éstos y las de los aminoácidos procedentes de la digestión de las proteínas, con la consiguiente falta de disponibilidad simultánea necesaria para la síntesis proteica (Cowey y Walton, 1988).

En resumen, el objetivo de la investigación en este campo sería, desde una perspectiva amplia, disponer de una gama suficientemente extensa de fuentes de proteína por su calidad intrínseca o la posibilidad de una suplementación eficaz que mejore su capacidad para mantener un crecimiento óptimo. El objeto de disponer de una valoración de tales posibilidades limitaría la dependencia que actualmente sufre la piscicultura del suministro de harinas de pescado, asegurando piensos de buena calidad, de composición estable y libres de fluctuaciones excesivas en sus precios.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Para dar respuesta al objeto de este trabajo, se realizaron una serie de ensayos cuyos diseños experimentales concretos, en cuanto a animales, dietas, duración y parámetros e índices a determinar, se indican a continuación.

OBJETIVO 1: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA, E INCORPORADA EN DIETAS PARA TRUCHAS.

Experimento 1.1: Utilización nutritiva de la proteína de gluten de maíz

Se diseñaron seis dietas experimentales cuya proteína procede mayoritariamente de harina de pescado (control) o gluten de maíz suplementado con lisina (libre o encapsulada). Con este experimento se pretende valorar la influencia de cuatro formas de suplementación (libre y tres tipos de capsulas) sobre la utilización nutritiva de la proteína de gluten y su eficacia para crecimiento.

Animales: Truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de 7 g. de peso medio inicial, alojadas en cubas de 60 l., lotes triplicados de 55 animales por lote, con un total de 18 lotes.

Dietas experimentales: la formulación de las seis dietas se realizó atendiendo a las necesidades reconocidas para esta especie y fase concreta de desarrollo (Austreng y Refstie (1979); NCR, 1981) y diferentes únicamente en la forma del aporte de lisina (libre o encapsulada). La composición general de las dietas experimentales se relaciona en la Tabla 3.4.

Duración: tras la previa adaptación de los animales a las condiciones del acuario durante dos semanas, el experimento sobre el efecto del crecimiento tuvo una duración de dos meses.

Toma de muestras y parámetros controlados: Los parámetros controlados durante el experimento fueron: ingesta diaria de alimento y ganancia de peso a intervalos de 15 días. Al inicio y final de los ensayos se tomaron muestras para análisis de composición corporal. Los índices calculados fueron: índice de eficacia alimentaria (IEA), coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC), valor productivo de la proteína (PPV). Al final del experimento se tomaron muestras para realizar medidas de la actividad del enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) y estudiar la influencia de la disponibilidad de aminoácidos sobre su catabolismo.

Experimento 2.2: Utilización digestiva de la proteína de la dieta

Al final del periodo experimental se recogieron muestras de heces de los distintos lotes experimentales, para hacer una valoración de la digestibilidad de la proteína. Para ello, los animales se alojaron en unas cubas especialmente diseñadas para recogida de heces.

Animales: Truchas procedentes del experimento anterior (1.1) en número de 55 animales por lote y por triplicado.

Dietas experimentales: Las mismas dietas diseñadas para el experimento 1.1.

Duración: Durante los últimos 15 días del experimento 1.1.

Toma de muestras y parámetros controlados: Muestras de heces recogidas diariamente y muestras de cada dieta se analizaron para determinar la digestibilidad de la proteína de la dieta, mediante el cálculo indirecto del coeficiente de digestibilidad aparente (CDA), empleando Cr_2O_3 como indicador inerte.

Experimento 1.3: Dinámica postprandial de aminoácidos

Con este experimento se pretende conocer las posibles diferencias en el tiempo de las concentraciones de lisina, aminoácidos esenciales y totales, en plasma de trucha, que pudieran deberse a la suplementación de la proteína con lisina libre o encapsulada con tres tipos de cubierta.

Animales: Finalizado el experimento de valoración nutritiva de la dieta (1.1), se seleccionaron al azar tres lotes de truchas por cada dieta experimental.

Dietas experimentales: Las mismas dietas diseñadas para el experimento 1.1.

Duración: 1 semana.

Toma de muestras y parámetros controlados: Previo ayuno de 48 horas, y tras la ingesta de las dietas correspondientes, se realizaron tomas de muestras de sangre, cada 2 horas, durante un periodo total de 24 horas.

Experimento 1.4: Influencia de la suplementación con lisina libre o encapsulada de dietas a base de proteína gluten de maíz, como fuente proteica mayoritaria, sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la trucha.

Con este experimento se pretende valorar la influencia de la disponibilidad de aminoácidos sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la trucha, mediante medida de la tasa de síntesis y degradación proteica *in vivo*.

Animales: Finalizado el experimento 1.1, truchas de cada lote experimental se seleccionaron según peso, con el fin de obtener un lote homogéneo de 30 animales, para iniciar estos ensayos.

Dietas experimentales: de las 6 dietas del experimento 1.1, se eligieron 4 dietas para este

experimento: Control (C), dieta encapsulada (G-B), dieta con lisina libre (G-L) y dieta deficiente en lisina (G-D).

Duración: 21 días de experimento.

Toma de muestras y parámetros controlados:

Ingesta diaria, tasa de crecimiento y evolución del contenido proteico corporal hepático y muscular, (para la determinación de la tasa específica de crecimiento, K_G), tasa de incorporación a proteínas de L-[2- 3 H]-fenilalanina en hígado y músculo (para la determinación de la constante de síntesis proteica de ambas fracciones corporales, K_S), cantidad de ADN y ARN en músculo e hígado (para determinar eficacia de síntesis proteica) y actividad del complejo multicatalítico (MPC) en hígado, músculo blanco e intestino.

OBJETIVO 2: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA E INCORPORADA EN DIETAS PARA CARPAS: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Experimento 2.1: Utilización nutritiva de la proteína de gluten de maíz.

Las dietas experimentales se formularon empleando como fuente proteica mayoritaria la harina de pescado (control) o gluten de maíz suplementado con lisina (libre o encapsulada) que fueron ofrecidas a los distintos lotes experimentales de carpas. Con este experimento se pretende valorar la utilización nutritiva de las distintas dietas, así como las posibles diferencias que se puedan producir sobre el crecimiento, en función de la temperatura ambiental.

Animales: Se emplearon carpas (*Cyprinus carpio* L.) de 45 g de peso medio inicial distribuidas en 36 lotes de 30 animales cada uno y a razón de tres lotes por cada dieta experimental. La mitad de los lotes se mantuvo a 18 °C y el resto a 25 °C.

Dietas experimentales: Se diseñaron un total de seis dietas experimentales diferentes únicamente en la forma de aporte de lisina (libre o encapsulada con tres tipos de cubierta), adaptadas a las necesidades y niveles óptimos de proteína y grasa para esta especie. Las dietas se ofrecieron a lotes triplicados de animales, dos veces al día y "ad libitum". La composición general de las dietas experimentales se relaciona en la tabla 3.5.

Duración: 2 meses.

Toma de muestras y parámetros controlados: Los parámetros controlados durante el experimento fueron: ingesta diaria de alimento y ganancia de peso de los animales a intervalos de 15 días.

Se tomaron muestras al inicio y final de los ensayos para análisis de composición corporal. Los índices calculados fueron: índice de eficacia alimentaria (IEA), coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC) y valor productivo de la proteína (PPV). Al final del experimento se tomaron muestras de hígado para realizar medidas de la actividad del enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), para estudiar la influencia de la disponibilidad de aminoácidos sobre su catabolismo.

Experimento 2.2: Utilización digestiva de la proteína de la dieta

Al final del periodo experimental se recogieron muestras de heces de los distintos lotes de carpas alimentadas con cada una de las dietas, para analizar la digestibilidad de la proteína, así como la posible influencia de la temperatura. Para ello, los animales se alojaron en unas cubas especialmente diseñadas para la recogida de heces.

Animales: Los del experimento anterior (2.2).

Dietas experimentales: Las mismas diseñadas para el experimento 2.2.

Duración: 15 días.

Toma de muestras y parámetros controlados: Muestras de heces recogidas diariamente y muestras de cada dieta se analizaron para determinar la digestibilidad de la proteína de la dieta, mediante el cálculo indirecto del coeficiente de digestibilidad aparente (CDA), empleando Cr_2O_3 como marcador inerte.

Experimento 2.3: Dinámica postprandial de aminoácidos

Con estos ensayos se pretende conocer las posibles diferencias en el tiempo de las concentraciones de lisina, aminoácidos esenciales y totales en plasma de carpa, que pudieran deberse a la suplementación de la proteína con lisina libre o encapsulada con tres tipos de cubierta. Los objetivos se siguieron para cada temperatura a la que se mantuvieron los animales (18°C y 25°C).

Animales: Una vez finalizado el experimento de valoración nutritiva (2.2), se seleccionaron carpas para este grupo de ensayos.

Dietas experimentales: Las mismas dietas diseñadas para el experimento 2.2.

Duración: 1 semana.

Toma de muestras y parámetros controlados: Previo ayuno de 24 horas, y tras la ingesta de las dietas correspondientes, se realizaron tomas de muestras de sangre a los treinta minutos, a la hora y posteriormente, cada 2 horas durante un periodo total de 24 horas.

Experimento 2.4: Influencia de la suplementación de la proteína de gluten con lisina libre o encapsulada sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la carpa.

Con este experimento se pretende valorar la influencia de la disponibilidad de aminoácidos sobre el recambio proteico en hígado y músculo blanco de la carpa mediante medida de la tasa de síntesis y degradación proteica *in vivo*, así como la influencia de la temperatura de aclimatación (18°C y 25°C).

Animales: Finalizado el experimento 2.2, se seleccionaron según peso carpas alimentadas con cada una de las dietas con el fin de obtener lotes homogéneos de 20 animales, para iniciar estos ensayos.

Dietas experimentales: De las 3 dietas del experimento 2.2, que incluyen lisina encapsulada, se seleccionó el tipo de cápsula que dió mejores resultados quedando este experimento con 4 dietas: Control (C), dieta suplementada con lisina en la microcápsula tipo B (G-B), dieta suplementada con lisina libre (G-L) y dieta deficiente en lisina (G-D).

Duración: 21 días.

Toma de muestras y parámetros controlados:

Ingesta diaria, tasa de crecimiento y evolución del contenido proteico corporal hepático y muscular (para la determinación de la tasa específica de crecimiento, K_G), tasa de incorporación a proteínas L-[2- 3 H]-fenilalanina en hígado y músculo (para la determinación de la constante de síntesis proteica de ambas fracciones corporales, K_S), cantidad de ADN y ARN en músculo e hígado (para determinar eficacia de síntesis proteica) y actividad del complejo multicatalítico (MPC) en hígado, músculo blanco e intestino.

3.2. ANIMALES Y MANTENIMIENTO:

Se emplearon truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de un peso medio inicial de 7 g, procedentes de una piscifactoría local (Riofrío, Granada) y carpas comunes (*Cyprinus carpio* L.) de un peso medio inicial de 40 g, procedentes de una piscifactoría de Badajoz. Todos los animales empleados fueron seleccionadas previamente para la obtención de una muestra homogénea.

Una vez en el laboratorio se alojaron en cubas de fibra de vidrio de 360 l, donde se mantuvieron durante una semana a fin de recuperarse del posible estrés del traslado. Pasado este tiempo, los peces se anestesiaron con etilenglicol monoetileter y se distribuyeron al azar en 18 lotes de 55 animales cada uno, en el caso de las truchas y, en 36 lotes de 30 animales, en el caso de las carpas, y se alojaron en un acuario experimental, con cubas de fibra de vidrio de 65l de capacidad. Las dietas, asignadas al azar, se ensayaron en lotes triplicados de animales.

Se estableció un flujo continuo de agua de 1-1.5 l/kg/min, que fué previamente declorada mediante un filtro de carbón activo. La temperatura del agua se mantuvo a 15.0 ± 0.5 °C en el caso de truchas, durante todo el periodo experimental, por medio de un termostato introducido en las cubas y conectado a un sistema automático de calefacción y refrigeración del agua. En el caso de las carpas, inicialmente todos los animales se mantuvieron a 25°C y después de la semana de adaptación a las condiciones del acuario, se procedió al progresivo descenso de la temperatura del agua para la mitad de los lotes, de tal forma que en una semana y con un descenso de 1°C por día, se alcanzaron los 18°C deseados para el experimento con carpas a baja temperatura.

La oxigenación del agua se realizó mediante difusores de aire situados en cada una de las cubas, provistos de una llave que permitía regular el volumen de salida, y conectados a un soplante de aire (Siemens).

La iluminación de las instalaciones se realizó de forma artificial mediante un temporizador conectado al sistema de iluminación, estableciéndose un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad.

Acuario experimental:

El acuario experimental posee tanques de fibra de vidrio de 65 l de capacidad y cuyas dimensiones son 55 x 40 x 35 cm. Estos tanques se agrupan de 3 en 3, de tal modo que en cada una de estas unidades de 3 (una tripleta) se asignó una misma dieta al azar (lotes triplicados). La estructura de acuarios experimentales está basada en el sistema Guelph descrito por Cho et al (1975, 1982) para estudios de digestibilidad, por ello cada tanque presentan un fondo inclinado para permitir la recogida de las heces. Este sistema presenta una columna de sedimentación donde son recogidas las heces en unos botes de centrífuga de 250 ml (modificación al sistema Guelph), (Morales, 1993), centrifugando las heces en el mismo. La recogida de heces se realizó diariamente entre las 20:00 y las 9:00 horas. La limpieza de las unidades se realizaba diariamente dos horas después de la última comida, colocando después de ésta los botes para la recogida de las heces que se producirían durante la noche.

3.3. DIETAS EXPERIMENTALES

Las dietas experimentales fueron formuladas en base a los datos disponibles en bibliografía, en cuanto a necesidades y criterios generales de nutrición, para la trucha arcoiris y la carpa común, y fabricadas íntegramente en nuestro laboratorio.

Como paso previo a la formulación de dietas, se realizó el procesado de las distintas materias primas utilizadas como fuente de proteína, con la finalidad de conseguir un tamaño de partícula adecuado para la mezcla (no superior a 50 μ m), lo que se consiguió haciéndolas

pasar a través de un molino eléctrico de martillos y de una serie de tamices. Tras el procesamiento de las fuentes proteicas se realizó el análisis de su composición en macronutrientes, (tabla 3.1) así como su correspondiente aminograma (tablas 3.2 y 3.3) para la correcta formulación de las dietas.

TABLA 3.1: Composición química de las materias primas utilizadas en los ensayos (% s/ss)

	Proteína	Grasa	Cenizas	MELN	Mat.seca
Harina de Pescado ¹	70.0	9.5	20.2	0	92.0
Harina de Gluten maíz ¹	76.0	3.5	1.2	19.3	89.2
Harina de Pescado ²	73.0	9.8	18.0	0	90.3
Harina de Gluten maíz ²	73.2	3.5	1.7	21.6	90.0
Microcápsula tipo A	91.3	2.1	0.2	6.4	98.5
Microcápsula tipo B	86.5	2.7	0.2	10.6	98.4
Microcápsula tipo C1	78.0	10.0	0.1	6.0	93.4
Microcápsula tipo C1	66.0	14.4	2.9	16.7	84.0

¹ Experimento con truchas, ² Experimento con carpas,

TABLA 3.2: Composición en aminoácidos de las materias primas (g/100g del total de aminoácidos). *AAE

	HP1	HP2	HG1	HG2	McC1	McB	McA	McC2
LYS*	8.56	9.75	3.11	1.47	79.7	93.4	92.7	53.6
ASP	10.2	11.0	5.74	5.60	2.40	0.59	0.67	6.11
THR*	4.90	4.64	3.56	3.07	1.12	0.36	0.48	1.80
SER	4.36	4.02	5.20	4.64	1.56	0.48	0.53	3.19
GLU	14.7	15.0	22.1	20.9	3.35	1.96	1.91	6.84
PRO	5.32	4.22	9.55	9.15	0.00	0.00	0.34	1.20
GLY	6.25	6.22	2.83	2.54	0.79	0.20	0.21	1.84
ALA	6.51	6.41	7.60	8.17	1.31	0.29	0.32	2.91
VAL*	5.80	5.30	4.24	4.34	1.81	0.53	0.52	3.58
CYS	0.15	1.23	2.74	2.41	1.23	0.00	0.00	2.17
MET*	1.91	2.39	1.44	1.89	0.00	0.00	0.00	1.32
ILE*	4.97	4.81	3.34	3.87	1.20	0.38	0.40	2.44
LEU*	8.35	7.84	13.7	15.8	1.71	0.66	0.74	4.30
TYR	3.47	3.38	4.04	4.86	0.73	0.44	0.51	1.84
PHE	5.06	4.56	5.73	6.10	1.28	0.42	0.53	3.47
HIS*	2.96	2.53	2.08	2.09	0.43	0.12	0.07	0.88
ARG*	6.49	6.66	2.94	3.05	1.36	0.17	0.10	2.52

(HP, harina de pescado, HG, harina de gluten, Mc, microcapsula tipos A, B, C 1 y 2)

TABLA 3.3: Composición en aminoácidos de las materias primas (g/100g de harinas/ss). *AAE

	HP1	HP2	HG1	HG2	McC1	McB	McA	McC2
LYS*	6.00	7.12	2.37	1.08	62.2	80.8	84.6	35.4
ASP	7.18	8.04	4.36	4.10	1.88	0.51	0.61	4.03
THR*	3.43	3.39	2.70	2.25	0.87	0.32	0.43	1.19
SER	3.05	2.94	3.95	3.40	1.22	0.41	0.49	2.11
GLU	10.3	10.9	16.8	15.3	2.61	1.69	1.75	4.51
PRO	3.73	3.08	7.25	6.70	0.00	0.00	0.31	0.79
GLY	4.37	4.54	2.15	1.86	0.62	0.17	0.20	1.22
ALA	4.56	4.68	5.78	5.98	1.02	0.25	0.29	1.92
VAL*	4.06	3.87	3.22	3.17	1.41	0.46	0.48	2.36
CYS	0.11	0.89	2.09	1.77	0.96	0.00	0.00	1.43
MET*	1.33	1.74	1.10	1.39	0.00	0.00	0.00	0.87
ILE*	3.48	3.51	2.54	2.84	0.93	0.32	0.37	1.61
LEU*	5.84	5.72	10.4	11.6	1.34	0.57	0.67	2.84
TYR	2.43	2.47	3.07	3.55	0.57	0.38	0.47	1.21
PHE	3.54	3.33	4.35	4.47	1.00	0.36	0.49	2.29
HIS*	2.07	1.85	1.58	1.53	0.33	0.11	0.07	0.58
ARG*	4.54	4.86	2.23	2.23	1.06	0.14	0.09	1.66

(HP, harina de pescado, HG, harina de gluten, Mc, microcapsula tipos A, B, C 1 y 2)

La formulación y composición química completa de las dietas empleadas en cada ensayo se recoge en las tablas 3.4 y 3.5, y su aminograma en las tablas 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9. Las dietas se formularon isocalóricas en energía bruta y se tuvo en cuenta el contenido de lisina de las fuentes proteicas empleadas para ajustar el nivel de ésta en la dieta. Los valores de energía bruta se calcularon utilizando los factores de conversión: 23.6 , 39.5 y 17.2 Mj/g para la proteína, grasa e hidratos de carbono respectivamente (Jobling, 1983).

Las dietas se formularon según las siguientes premisas:

- 1.) Contenido proteico del 45% para las truchas, y del 30% para las carpas. La proteína de la dieta fué aportada por harina de pescado (HP) y harina de gluten de maíz (HG).
- 2.) La suma de las fuentes proteicas supone aproximadamente el 60% de la dieta, con una relación aproximada de 85% de gluten y 15% de harina de pescado para las dietas que contienen gluten como fuente proteica mayoritaria y de 52% de harina de pescado y 48% de gluten de maíz para la dieta control.

3.) El contenido total de lisina de las dietas se ajustó atendiendo a las necesidades de este aminoácido para la trucha (Ogino, 1980). La carpa (Nose, 1979), lo que supone 5.3% de la proteína y 2.25% de la dieta para la trucha y 5.7% de la proteína y 1.6% de la dieta para la carpa.

4.) La dieta control aporta ese porcentaje de lisina con la mezcla de las dos fuentes proteicas (lisina "proteica").

5.) El contenido total de lisina de las dietas con aporte mayoritario de lisina no proteica (G-A, G-B, G-C y G-L) están suplementadas con lisina libre (G-L) o encapsulada con tres tipos (A, B y C) de cubiertas (dietas G-A, G-B y G-C). (Ver apartado microencapsulación en pag.72).

6.) El contenido en lisina de la dieta deficiente (G-D) sólo proviene del aporte de las fuentes proteicas (HP y HG) y, por tanto, es deficiente en lisina según las necesidades de la trucha y de la carpa.

La harina de pescado fue suministrada por Harinas del Atlántico S.A. y el gluten de maíz por Campoebro Industrial S.A. El aceite de pescado fue aportado por AFANSA (Afampes 120) y el almidón de maíz nativo pregelatinizado, de nombre comercial PRECOL, fue suministrado por Campoebro Industrial S.A..

Como fuente lipídica se utilizó una mezcla de aceite de pescado y aceite de maíz al 50%, teniendo en cuenta la grasa aportada por la harina de pescado y el gluten de maíz usados en la fórmula, hasta alcanzar un 12% del total de la dieta en el caso de las truchas y el 10% en el caso de las carpas.

Los complementos mineral y vitamínico fueron preparados en nuestro laboratorio según lo establecido por de la Higuera et al. (1988) para la trucha y Hossain y Jauncey (1989) para la carpa. Su composición se detalla en las tablas 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13, respectivamente. Para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente se añadió como marcador inerte Cr_2O_3 y como aglutinante dietario se usó carboximetil celulosa (0.5 g/100g dieta). Como saborizante se empleó betaína suministrada por Musal y Chemical S.A.. La L-lisina añadida a las dietas fue suministrada por Musal y Chemical S.A.. Los microencapsulados tipo A y B fueron fabricados por la empresa Trofic S.A. Finalmente, se usó celulosa micronizada como diluyente para completar el 100% de la dieta.

Todos los ingredientes se homogeneizaron en una mezcladora comercial durante 30 minutos y la mezcla resultante se cernió 3 o 4 veces por un tamiz cuya malla tenía una luz de 100 μm , asegurándose de este modo la total homogeneización de los distintos componentes. El paso siguiente fue añadir a la mezcla la cantidad suficiente de agua (20%) para obtener una pasta húmeda que permitiera su granulado. Éste se realizó en una granuladora

con una matriz perforada con orificios de 1.5 mm y 3 mm, (según el tamaño de los animales) para el caso de las truchas (experimento 2), mientras que para las carpas, se usó en todo el periodo experimental una matriz con orificios de 3 mm de diámetro. Los gránulos así obtenidos se secaron a temperatura ambiente sobre una malla de plástico, hasta reducir su humedad a la ambiental (8-10%); a continuación se empaquetaron en bolsas opacas y herméticas, conservándose en cámara fría, a 4 °C, hasta su utilización.

TABLA 3.4: Composición general de las dietas experimentales empleadas en los ensayos con truchas (g/100 g dieta s/ss):

Ingredientes	C	GA	GB	GC	GL	GD
Harina de pescado	32.25	9.64	9.64	9.64	9.64	9.84
Harina de gluten maíz	29.50	49.12	49.12	49.12	49.12	50.15
Encapsulado tipo A		1.01				
Encapsulado tipo B			1.06			
Encapsulado tipo C1				1.18		
Lisina libre					0.92	
Aceite de pescado	5.86	6.99	6.99	7.09	7.09	7.07
Aceite de maíz	3.03	1.91	1.91	1.91	1.91	1.87
Corrector vitamínico*	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Corrector mineral*	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Almidón pregelatinizado	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Betaína	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Carboximetil celulosa	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cr ₂ O ₃	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α-Celulosa	5.86	7.83	7.79	7.56	7.82	7.57

Composición según análisis (% s/ss)

Proteína	47.05	46.13	45.82	46.22	46.07	46.44
Grasa	11.70	11.85	11.98	11.79	12.06	12.36
Cenizas	12.30	7.69	7.25	6.95	7.58	7.65
M.E.L.N.	28.95	34.33	34.95	35.04	34.29	33.55
Energía bruta (KJ/g)	19.17	19.58	19.56	19.58	19.65	19.88

*Según De la Higuera et al., 1988 (Tablas 3.10 y 3.12)

TABLA 3.5: Composición general de las dietas experimentales empleadas en los ensayos con carpas (g/ 100 g dieta s/ss):

Ingredientes	C	GA	GB	GC	GL	GD
Harina de pescado	22.50	4.10	4.10	4.10	4.10	4.10
Harina de gluten maíz	18.60	35.30	35.45	35.00	35.45	36.90
Encapsulado tipo A		1.27				
Encapsulado tipo B			1.20			
Encapsulado tipo C2				2.15		
Lisina libre					1.05	
Aceite de pescado	2.80	4.60	4.60	4.60	4.60	4.60
Aceite de maíz	4.35	3.80	3.80	3.80	3.80	3.70
Corrector vitamínico*	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Corrector mineral*	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Almidón pregelatinizado	33.00	30.35	30.35	30.35	30.30	30.10
Betaína	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Carboximetil celulosa	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cr ₂ O ₃	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
α-Celulosa	10.25	12.08	12.00	11.50	12.20	12.10

Composición según análisis (% s/ss)

Proteína	31.71	31.14	30.28	30.48	31.37	30.64
Grasa	9.76	9.65	9.10	10.59	9.63	8.52
Cenizas	9.06	4.78	4.89	5.02	4.93	5.01
M.E.L.N.	49.47	54.43	55.73	53.91	54.07	55.83
Energía bruta (KJ/g)	17.53	17.36	16.94	17.58	17.40	16.80

*Según Hossain y Jauncey, 1989. Tablas 3.11 y 3.13.

TABLA 3.6: Composición en Aa de las dietas para truchas (g Aa/100 g de AAT).

	C	GA	GB	GC	GL	GD
LYS*	5.59	5.76	5.78	5.58	5.91	3.96
ASP	8.00	6.30	6.30	6.30	6.30	6.43
THR*	4.23	3.68	3.69	3.69	3.69	3.76
SER	4.78	4.97	4.97	4.97	4.97	5.07
GLU	18.4	20.6	20.6	20.6	20.6	21.0
PRO	7.43	8.72	8.72	8.72	8.72	8.90
GLY	4.54	3.28	3.28	3.28	3.28	3.35
ALA	7.06	7.28	7.28	7.28	7.28	7.43
VAL*	5.02	4.38	4.38	4.38	4.38	4.48
CYS	1.44	2.30	2.30	2.30	2.30	2.35
MET*	1.68	1.48	1.48	1.48	1.48	1.51
ILE*	4.16	3.52	3.52	3.52	3.52	3.59
LEU*	11.0	12.6	12.6	12.6	12.6	12.9
TYR	3.76	3.88	3.88	3.88	3.88	3.96
PHE	5.39	5.51	5.51	5.51	5.51	5.62
HIS*	2.52	2.17	2.17	2.17	2.17	2.21
ARG*	4.72	3.41	3.41	3.41	3.41	3.48
IAAE (1)	181.75	165.26	165.39	164.74	165.80	161.42
IAAE (2)	86.32	78.49	78.55	78.24	78.75	76.66

TABLA 3.7: Composición en Aa de las dietas para truchas (g Aa/100 g dieta s/ss).

	C	GA	GB	GC	GL	GD
LYS*	2.75	2.66	2.65	2.58	2.72	1.83
ASP	3.77	2.91	2.89	2.91	2.9	2.99
THR*	1.99	1.70	1.69	1.70	1.70	1.75
SER	2.25	2.29	2.28	2.30	2.29	2.36
GLU	8.65	9.49	9.42	9.50	9.47	9.75
PRO	3.49	4.02	3.99	4.03	4.02	4.13
GLY	2.14	1.51	1.50	1.52	1.51	1.56
ALA	3.32	3.36	3.34	3.37	3.35	3.45
VAL*	2.36	2.02	2.01	2.03	2.02	2.08
CYS	0.68	1.06	1.05	1.06	1.06	1.09
MET*	0.79	0.68	0.68	0.69	0.68	0.70
ILE*	1.96	1.62	1.61	1.63	1.62	1.67
LEU*	5.19	5.83	5.79	5.84	5.83	6.00
TYR	1.77	1.79	1.78	1.79	1.79	1.84
PHE	2.54	2.54	2.52	2.55	2.54	2.61
HIS*	1.18	1.00	0.99	1.00	1.00	1.03
ARG*	2.22	1.57	1.56	1.58	1.57	1.62
ΣEAA	20.98	19.62	19.50	19.60	19.68	19.29
EAA/NEAA	0.80	0.74	0.74	0.74	0.75	0.71
%EAA	44.59	42.60	42.61	42.54	42.72	41.54
IAAE (1)	85.90	76.17	75.73	76.23	76.36	75.00

(1) Ref. requerimientos Trucha (Ogino, 1980), (2) Ref. Huevo de trucha (Ketola, 1982). * AAE

TABLA 3.8: Composición en Aa de las dietas para carpas (g Aa/100 g de AAT)

	C	GD	GL	GA	GB	GC
LYS*	5.05	2.04	4.49	5.13	4.66	4.82
ASP	8.03	6.02	5.79	6.24	5.90	6.28
THR*	4.14	3.64	3.33	3.48	3.31	3.36
SER	4.92	5.07	4.65	4.99	3.48	4.91
GLU	19.0	21.8	21.2	22.2	21.6	20.3
PRO	7.02	8.94	8.14	8.32	8.75	8.97
GLY	4.45	2.88	2.79	2.91	2.49	2.63
ALA	7.46	8.16	7.76	5.44	7.93	7.56
VAL*	4.55	3.98	4.09	3.27	4.20	4.09
CYS	1.69	2.04	1.89	1.83	1.93	2.04
MET*	2.20	1.78	1.90	1.91	1.73	1.84
ILE*	4.08	3.64	3.84	4.00	3.98	3.83
LEU*	12.3	15.7	15.4	15.9	15.7	14.5
TYR	3.29	3.58	4.08	3.94	3.49	4.26
PHE	5.23	5.81	5.56	6.00	5.82	5.49
HYS*	2.34	2.09	1.98	2.10	2.06	1.99
ARG*	4.30	2.82	3.08	2.31	2.98	3.13
IAAE (1)	140.61	116.71	127.80	126.08	128.74	127.61
IAAE (2)	85.72	71.15	77.90	76.86	78.48	77.79

TABLA 3.9: Composición en Aa de las dietas para carpas (g Aa/100 g dieta s/ss).

	C	GD	GL	GA	GB	GC
LYS*	1.60	0.62	1.41	1.60	1.41	1.47
ASP	2.55	1.85	1.82	1.94	1.79	1.91
THR*	1.31	1.11	1.04	1.08	1.00	1.02
SER	1.56	1.55	1.46	1.55	1.05	1.50
GLU	6.02	6.67	6.65	6.91	6.55	6.20
PRO	2.23	2.74	2.55	2.59	2.65	2.73
GLY	1.41	0.88	0.88	0.91	0.75	0.80
ALA	2.37	2.50	2.44	1.69	2.40	2.31
VAL*	1.44	1.22	1.28	1.02	1.27	1.25
CYS	0.54	0.62	0.59	0.57	0.58	0.62
MET*	0.70	0.55	0.60	0.59	0.52	0.56
ILE*	1.29	1.12	1.21	1.25	1.20	1.17
LEU*	3.89	4.82	4.84	4.96	4.75	4.42
TYR	1.04	1.10	1.28	1.23	1.06	1.30
PHE	1.66	1.78	1.74	1.87	1.76	1.67
HIS*	0.74	0.64	0.62	0.65	0.62	0.61
ARG*	1.36	0.86	0.97	0.72	0.90	0.95
ΣEAA	14.00	12.73	13.70	13.74	13.45	13.11
EAA/NEAA	0.79	0.71	0.78	0.79	0.80	0.75
%EAA	44.15	41.53	43.68	44.11	44.41	43.02
IAAE (1)	44.59	35.76	40.09	39.26	38.98	38.90

(1) Referencia requerimientos carpa (Nose, 1979), (2) Referencia Huevo de trucha (Ketola, 1982)

TABLAS:

Tabla 3.10. Composición del corrector mineral empleado en la formulación de las dietas para truchas.

Minerales	mg/100 g dieta
SO ₄ Zn (7 H ₂ O)	20
SO ₄ Cu (5 H ₂ O)	5
SO ₄ Mn (1 H ₂ O)	20
SO ₄ Co (7 H ₂ O)	5
SO ₄ Al (16 H ₂ O)	1
SO ₄ Fe (7 H ₂ O)	150
IK	2
ClK	250
Cl ₃ Mg	460
ClNa	400
CO ₃ Ca	650
(PO ₄ H ₂) ₂ Ca (1 H ₂ O)	3000
SeO ₃ Na	0.218
Excipiente (Celulosa)	36.782
Total	5000

Tabla 3.11. Composición del corrector mineral empleado en la formulación de las dietas para carpas.

Minerales	mg/100 g dieta
SO ₄ Zn (7 H ₂ O)	22
SO ₄ Cu (5 H ₂ O)	5
SO ₄ Mn (1 H ₂ O)	20
SO ₄ Co (7 H ₂ O)	30
SO ₄ Al (16 H ₂ O)	1
SO ₄ Fe (7 H ₂ O)	150
SO ₄ Mg (7 H ₂ O)	510
IK	2
ClK	200
ClNa	400
PO ₄ HCa (2 H ₂ O)	2910
SeO ₃ Na	0.2
Excipiente (Celulosa)	749.8
Total	5000

Tabla 3.12. Composición del corrector vitamínico empleado en la formulación de las dietas de truchas.

Vitaminas	mg/100 g dieta
Tiamina (B ₁)	5
Riboflavina (B ₂)	20
Piridoxina (B ₆)	5
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.1
Acido nicotínico	75
Pantotenato de Calcio	30
Inositol	200
Biotina	25
Acido fólico	1.5
Acido ascórbico (C)	100
PABA	40
Clorhidrato de colina (*)	800
Menadiona (K) (*)	8
Vitamina A (Retinal)	1
Vitamina D ₃ (Colecalciferol)	0.5
Vitamina E (α -tocoferol) (*)	80
Excipiente (Celulosa)	608.9
Total	2000

Tabla 3.13. Composición del corrector vitamínico empleado en la formulación de las dietas de carpas.

Vitaminas	mg/100 g dieta
Tiamina (B ₁)	5
Riboflavina (B ₂)	5
Piridoxina (B ₆)	4
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.01
Acido nicotínico	20
Pantotenato de Calcio	10
Inositol	200
Biotina	0.6
Acido fólico	1.5
Acido ascórbico (C)	100
PABA	5
Clorhidrato de colina (*)	800
Menadiona (K) (*)	8
Vitamina A (Retinal)	1.2
Vitamina D ₃ (Colecalciferol)	2
Vitamina E (α -tocoferol) (*)	80.4
Excipiente (Celulosa)	747.69
Total	2000

(*) Pureza del 50%

3.3.1.MICROENCAPSULACIÓN:

Existen una serie de estudios, para el desarrollo de dietas inertes, que aportan información de interés para el diseño y desarrollo de microencapsulados como alimento (Teshima et al., 1982; Kanazawa et al., 1982; Jones et al., 1984; Appelbaum, 1989; Langdon 1989; Fernández, 1994). Estos conocimientos nos han suministrado información tanto sobre el proceso de microencapsulación más adecuado, como sobre las técnicas de elaboración de microcápsulas.

La microencapsulación se ha definido como el proceso por el cual los componentes de la dieta, ya sean líquidos o partículas, se encierran en paredes finas y se liberan bajo condiciones macro o microambientales específicas (Meyers, 1979). De las técnicas existentes para la elaboración de partículas inertes, destinadas a la alimentación en acuicultura, el método basado en el entrecruzamiento de la proteína dietaria con un agente polimerizante, para formar una cubierta de naturaleza proteica, es el más empleado (Jones et al., 1987; Langdon, 1989). Este tipo de cubiertas se utilizan para encapsular sustancias hidrosolubles o finamente particuladas, de tal manera que el producto resultante aparece como un conjunto de partículas sólidas de distinto tamaño.

Las técnicas de encapsulación se ven afectadas por varios factores interrelacionados entre sí, que influyen en la estructura y características finales de la microcápsula: velocidad de agitación, agente polimerizante, proporción de las fases acuosa y orgánica, etc. La selección del encapsulamiento depende de las propiedades del producto deseado.

Fabricación de los microencapsulados:

El proceso de elaboración está basado en los procedimientos de encapsulación descritos en la patente UK GB 2 103 568 A (Hayworth, 1983), modificados por Fernández (1994). El método consiste inicialmente en la obtención de una fina emulsión de dieta o componente dietario (en nuestro caso la lisina) en solución acuosa (fase dispersa) con un líquido orgánico no miscible (fase de dispersión), para lo cual se usa un agente tensioactivo (emulgente). Una vez estabilizada la emulsión, las partículas se encuentran individualizadas, momento en el que es preciso formar una cubierta que les confiera mayor estabilidad. Esto se consigue con la adición de un compuesto polimerizante que actúe enlazando radicales activos de la proteína (albúmina), de tal forma que los grupos amino y carboxilo reaccionan con los grupos cloruro del agente polimerizante, formándose un polímero de membrana alrededor de las gotas emulsionadas. Se forman enlaces amidas (grupos aminos) o enlaces ésteres (grupos carboxilos), estos últimos en mayor número. El dicloruro de succinilo ($C_4H_4Cl_2O_2$) tiene dos posibles puntos de unión con la proteína, o sea, dos radicales cloro; mientras que el cloruro de sebacoilo ($C_{10}H_{16}Cl_2O_2$) tiene un sólo punto de unión con la proteína.

Concluido el proceso de microencapsulación, se retira el exceso de agente polimerizante, teniendo lugar un cambio de fase, como consecuencia de la eliminación del

compuesto orgánico (C-H) y su sustitución por agua. El cambio de fase tiene lugar sin detener la reacción de polimerización, añadiendo agua vehiculizada en alcohol, que reacciona con los grupos cloro que han quedado libres, impidiendo que se formen cadenas químicas entre las cápsulas. Posteriormente se produce el decantado de las microcapsulas y, una vez eliminado el líquido orgánico, se congelan para proceder a su secado por liofilización. El proceso de microencapsulación se realizó a temperatura ambiente.

Material empleado:

- Agitador de hélice (modelo Heidolph) con agitación variable (280-2200 r.p.m.).
- Microscopio óptico y electrónico de barrido (para la evaluación de las cápsulas).
- Material de vidrio diverso (portas excavados, pipetas pasteur, etc).
- Liofilizador (modelo FTS SYSTEMS INC), para el secado de las muestras.

Reactivos:

- L-Lisina (Musal y Chemical S.A)
- Albúmina de huevo de pollo desecada (Sigma- A5253)
- Cloruro de sebacoilo ($C_{10}H_{16}Cl_2O_2$) (Sigma-S2384)
- Dicloruro de succinilo ($C_4H_4Cl_2O_2$) (Sigma-S9628)
- Alcohol etílico (95°) (CH_3CH_2OH) (Panreac-131086)
- Lecitina de soja
- Ciclohexano (C_6H_{12}) (Panreac-141250)

Variables relacionadas con la técnica de encapsulación: Velocidad de agitación, naturaleza del agente polimerizante (succinilo y sebacoilo), relación de volúmenes de la fase acuosa con respecto a la fase orgánica (solutos/solvente=C-H) y concentración del agente polimerizante. Los tiempos de emulsión, encapsulación y reacción con el agente tensioactivo permanecieron constantes. Las variables usadas finalmente son las siguientes.

Proceso de fabricación definitivo para las microcápsulas usadas en dietas para truchas (tipo C1):

- 1º Fase A: 20 g Lys + 6.6 g albúmina, disueltas en 60 ml de agua (proporción 3:1). Se disuelve primero la albúmina en agua, en un vaso de precipitado, con ayuda de un agitador magnético. Una vez disuelta, se añade la lisina agitando suavemente hasta formar la suspensión coloidal.
- 2º Fase B: Lecitina disuelta en ciclohexano al 1.5% (3.4 g lecitina en 250 ml de C-H). Se toman 20 ml de la solución A y se le añaden 80 ml de la solución B (proporción 1:4). Se lleva la mezcla al agitador y se bate durante 10 min. a 1500 r.p.m. Una vez estabilizada la emulsión y ver partículas individualizadas (mediante observaciones sucesivas de las muestras al microscopio óptico), añadimos el agente polimerizante para que se forme la cubierta.
- 3º Se adiciona a la emulsión (sin dejar de agitar) 1 ml de succinilo. Dejando agitar durante 15 min. más.
- 4º Finalmente se para la reacción con la adición de 3 ml de etanol (95%). Agitamos durante 3 min. para que se disperse, tras los cuales se deja decantar la solución. Una vez hecho esto, se elimina con cuidado el sobrenadante y se lava el depósito con una solución de ciclohexano-

lecitina varias veces, siempre eliminándolo al final. Después de esto se congela para desecarlo por liofilización a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y 40 mtorr de presión y así eliminar los restos de C-H y agua.

Proceso de fabricación definitivo para las microcápsulas usadas en dietas para carpas (tipo C2):

1º) Fase A: 40 g Lys + 35 g albúmina, disueltas en 200 ml de agua (proporción aprox. 1:1). Se disuelve primero la albúmina en 200 ml de agua en un vaso de precipitado con ayuda de un agitador magnético. Una vez disuelta, se añade la lisina agitando suavemente hasta formar la suspensión coloidal.

2º) Fase B: Lecitina disuelta en ciclohexano al 2.5 %.

Se toman 60 ml de la solución A y se le añaden 300 ml de la solución B (proporción 1:5). Se lleva la mezcla al agitador y se bate durante 15 min. a 1300 r.p.m. Una vez estabilizada la emulsión y ver partículas individualizadas (mediante observaciones sucesivas de las muestras al microscopio óptico), añadimos el agente polimerizante para que se forme la cubierta.

3º) Se adiciona a la emulsión (sin dejar de agitar) 3 ml de succinilo. Dejando agitar durante 15 min. más.

4º) Finalmente se para la reacción con la adición de 9 ml de etanol (95 %). Agitamos durante 5 min. para que se disperse, tras los cuales se deja decantar la solución. Una vez hecho esto, se elimina con cuidado el sobrenadante y se lava el depósito con una solución de ciclohexano-lecitina varias veces, siempre eliminándolo al final. Después de esto se congela para desecarlo por liofilización a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y 40 mtorr de presión.

Aspectos morfológicos: el aspecto final de las microcapsulas, su tamaño, espesor y estabilidad de la cubierta, fueron examinados por microscopía óptica y electrónica de barrido.

Composición aproximada (s/s.f) de los tipos de microcapsulas usadas :

Tipo A: 80% de Lys y 20% de albúmina de huevo.

Tipo B: 90% de Lys y 10% de grasa.

Tipo C1: 75% de Lys y 25% de albúmina de huevo.

Tipo C2: 53.3% de Lys y 46.6% de albúmina de huevo.

Las de tipo A y B fueron fabricadas por la empresa Trofic. S.A. (Madrid), mientras que las de tipo C1 y C2 se realizaron en nuestro laboratorio, según la técnica desarrollada anteriormente.

3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

3.4.1. Control de peso e ingesta

Las dietas granuladas se suministraron "ad libitum", 2 veces al día (9:00 y 16:00 horas), 7 días a la semana, controlando diariamente la ingesta de cada lote de animales.

Los controles de peso se realizaron al inicio y cada 15 días, hasta el final del experimento. Para ello se introdujo cada lote en un recipiente conteniendo agua con anestésico y provisto de una canastilla perforada que permitía extraerla del recipiente y escurrir el agua. Posteriormente se procedió a pesar los animales previo tarado de la canastilla. La balanza utilizada fue una tipo monoplato de error ± 0.1 g. En todos los casos los animales se mantuvieron en ayuno durante las 24 horas previas a la pesada. Además de los controles de peso de los lotes completos, los animales se pesaron individualmente para establecer la dispersión de peso, tanto al inicio como al final de los ensayos de crecimiento.

3.4.2. Toma y procesamiento de muestras

Para realizar el análisis químico de dietas, animales y heces, fue necesario un procesamiento previo que se detalla a continuación:

Dietas: Una vez fabricadas y secas las dietas experimentales, se tomó una muestra al azar de cada una de ellas y se trituró en un molinillo de cuchillas, hasta la obtención de una fina harina que se usó para su posterior análisis de composición.

Animales: Para el análisis de la composición corporal se empleó el siguiente protocolo: Se tomaron 10 peces al azar al inicio del experimento como representativos del punto inicial y 10 animales por cada lote del experimento al final del mismo, que fueron sometidos al siguiente procesado:

- 1.- Disección del animal para la limpieza del intestino de los posibles restos de alimento que pudieran alterar los resultados.
- 2.- Troceado del animal.
- 3.- Desecación en estufa a 105 °C hasta peso constante.
- 4.- Trituración en un molinillo de cuchillas hasta obtener una muestra homogénea.
- 5.- Conservación en recipiente hermético y en frío, hasta su análisis.

Heces: Tras la recogida de los botes de las cubas de sedimentación, se siguió el siguiente protocolo:

- 1.- Centrifugación a 6.000x g en una centrífuga (Centrikon H-401) refrigerada a 7 °C durante 20 minutos.
- 2.- Eliminación del sobrenadante y trasvase del sedimento al liofilizador para su secado.
- 3.- Mezcla de las heces de varios días sucesivos con el fin de obtener una cantidad suficiente de muestra para el análisis de su composición.

- 4.- Trituración en molinillo de cuchillas hasta obtener una fina harina.
- 5.- Conservación en recipiente hermético y en frío, hasta su análisis.

Plasma: se tomaron muestras de sangre de 5 animales por cada dieta y punto, previamente anestesiados. Para ello se heparinizaban jeringas de 2.5 ml, con las que se tomaba la sangre de la vena caudal. Una vez obtenidos unos 1.5-2 ml de sangre, se vertía en viales de plástico herméticos para su inmediata centrifugación (15 min. a 1.400xg) y así conseguir separar el plasma del resto de células sanguíneas con ayuda de pipetas pasteur. Las muestras de plasma fueron inmediatamente congeladas a - 20°C hasta su posterior análisis de aminoácidos.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS:

Los métodos analíticos, salvo que se especifique otra referencia, se realizaron según lo establecido por la AOAC (1985).

3.5.1. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN:

Para realizar el análisis de materias primas, dietas, heces y animales, se siguieron los métodos que se indican a continuación.

Nitrogeno: Según el método Kjeldhal, se procedió a la digestión de la proteína con SO_4H_2 en un digestor NITROKJEL DRA, usando como catalizador de la reacción una mezcla de sulfato potásico, sulfato cúprico y selenio. Tras la digestión se realizó la destilación de la muestra con NaOH al 40%, recogiendo 150ml del destilado en un matraz, donde previamente se habían añadido 40 ml de indicador Büchi compuesto por rojo de metilo y verde de bromocresol.

La valoración del destilado obtenido se realizó con ClH 0.01 N hasta virage del indicador. Se usó el factor 6.25 para la conversión de nitrógeno en proteína (Winber, 1971).

Grasa: Mediante extracción continua con éter etílico por el método Soxhlet (en un BÜCHI 810).

Cenizas: Por incineración en horno mufla (HERAEUS) a 500°C hasta peso constante.

Humedad: Por desecación en estufa (HERAEUS) a 105°C hasta peso constante.

Material extractivo libre de nitrógeno (MELN): Por diferencia, a partir de los valores de proteína, grasa y cenizas, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ MELN} = 100 - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Cenizas})$$

$$\% \text{ MELN} = \% \text{ Fibra bruta} + \% \text{ HC}$$

3.5.2.DETERMINACIÓN DE CROMO EN DIETAS Y HECES:

Determinación en el destilado procedente del análisis Kjeldhal, mediante espectrofotometría de absorción atómica, en espectrofotómetro "Instrumentation Laboratory (IL) aa/ae spectrophotometro Mod.357". Lámpara de cromo de cátodo hueco $I = 6\text{mA}$, y anchura de banda = 0.5nm ; a una longitud de onda de 357.9 nm . Llama de acetileno-protóxido de nitrógeno (óxido nitroso). Rango lineal de 5 ppm con patrón de Merk tritisol ampoyas.

3.5.3.DETERMINACION DE AMINOACIDOS EN MATERIAS PRIMAS Y DIETAS:

Los análisis de aminoácidos de las materias primas y dietas se realizaron mediante cromatografía de intercambio iónico (Chromakon-500, Kontron) en columna de poliestireno sulfonado, con la metodología de Spackman et al. (1958) y usando reactivo de ninhidrina para colorear los aminoácidos separados. La cuantificación relativa de los distintos componentes (iminoácidos) se realizó tras lectura colorimétrica a 440 y 570 nm usando como referencia una mezcla estándar (Sigma Ltd.). Las muestras fueron previamente hidrolizadas en 6N a 110 °C durante 24 horas. Debido a que la hidrólisis ácida destruye los aminoácidos metionina y cistina, se sometieron a un segundo tratamiento de hidrólisis ácida con previa oxidación (agua oxigenada en ácido fórmico) que los transforma en metionina-sulfona y ácido cistéico. Los resultados de ambas hidrólisis se cromatografiaron y los resultados finales resultan de la superposición de los cromatogramas de cada muestra. Ambos tipos de hidrólisis destruyen el triptófano y, por tanto, carecemos de este dato.

3.5.4.DETERMINACION DE AMINOACIDOS EN PLASMA SANGUINEO POR CROMATOGRFÍA HPLC: (basado en la técnica de Bidlingmeyer et al., 1984)

Preparación de las muestras: Se tomó un volumen de $200\text{ }\mu\text{l}$ de cada una de las muestras de plasma a analizar y se le adicionó $400\text{ }\mu\text{l}$ de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (en relación $1:2\text{ v/v}$), para realizar la desproteinización del plasma. Tras agitación y centrifugación a $4000\times g$ durante 10 minutos, se obtuvo el plasma con los aminoácidos disueltos. Del sobrenadante obtenido se tomaron $50\text{ }\mu\text{l}$ de cada muestra y se le adicionó un volumen de $10\text{ }\mu\text{l}$ de norleucina (2.5 mM) como patrón interno.

Para la detección de los aminoácidos tras separación en columna cromatográfica, se requiere la previa reacción de éstos con un compuesto, formando un complejo coloreado; a esta serie de reacciones se les llama "derivación en precolumna". Esta técnica consiste en hacer reaccionar las muestras con fenil-isotiocianato, con la formación de derivados feniltiocarbamilos de aminoácidos y posterior separación en columna HPLC con fase reversa.

Derivación de los aminoácidos con PITC: las muestras de patrón standard de aminoácidos libres, así como las muestras de plasma de los animales fueron desecadas en vacío durante 90 min. a 0 °C . Después se añadió a cada muestra $20\text{ }\mu\text{l}$ del primer reactivo: agua-etanol-TEA ($2:2:1$), volviéndose a desecar en vacío durante 1 hora, tras lo cual se procedió a la derivación. El reactivo de derivación consistió en una mezcla de agua-etanol-TEA-PITC

(1:7:1:1), adicionándose a las muestras 40 μ l, dando lugar a la formación de derivados feniltiocarbamilo de los aminoácidos. Para ello se dejó reaccionar previamente en campana cerrada y oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. antes de su desecado en vacío a 0°C durante 12 horas, retirándose así posibles restos de los reactivos. El precipitado formado fue almacenado en seco y en frigorífico hasta el día de su análisis (los derivados formados son estables cuando se almacenan desecados según Henrickson y Meredith, 1984). Inmediatamente antes del análisis se resuspendieron en 200 μ l de fase móvil A y filtraron con filtro bacteriano de 45 μ m de diámetro de poro para eliminar las posibles impurezas. Tras ésto, las muestras se inyectaron en el cromatógrafo para la separación y detección de los aminoácidos presentes en ellas. (Todos los pasos de desecación se realizaron mediante liofilizador marca "FTS Systems, Inc.", a -4°C y -40 mtorr de presión atmosférica).

Materiales empleados: Acetonitrilo (calidad Lichrosolv), ácido acético glacial 100% (calidad analítica), etanol 99.5% (calidad Lichrosolv) y acetato sódico (calidad analítica) de Merck. Trietil-amina (TEA), fenil-isotiocianato (PITC, grado secuenciación de proteínas), y el patrón de aminoácidos estándar (para calibración de analizadores de aminoácidos, 0.5 mM de cada aminoácido, en citrato sódico 0.2N pH 2.20) de Sigma. El agua utilizada fue ultra-pura, obtenida por un sistema de purificación "Barnstead" modelo E-Pure, alimentado con agua destilada, obteniéndose agua desionizada, desmineralizada y libre de materia orgánica.

Los tubos de derivación fueron de vidrio de 7 x 50 mm, carbonizados en horno Mufla a 500 °C durante 24 horas, envueltos en papel de aluminio.

Sistema cromatográfico: se ha usado un cromatógrafo líquido marca "Konik Instruments" modelo KNK-500-A, con capacidad de programación de gradientes de las fases móviles y columna termostatizada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. La columna utilizada es del modelo "J&W Scientific, Inc." de 15 cm de longitud y 0.4mm de diámetro interno, rellena de fase estacionaria de octa-decil-silano de 3 μ m de tamaño de poro, como fase reversa. Los eluyentes fueron previamente desgasificados mediante burbujeo constante con gas helio. Para la detección de los aminoácidos a su salida de la columna cromatográfica se ha usado un detector de la misma marca, modelo UVIS-200, con lámpara ultravioleta; midiéndose a una longitud de onda de 254 nm y rango de escala de 0.05 AUFS. Finalmente, el integrador modelo SP4290 integró las áreas de los picos de absorbancia.

Proceso cromatográfico: el sistema de fase móvil que vehiculiza las muestras consistió en dos eluyentes: (A) un tampón acuoso (94% de tampón acetato sódico 0.14 M conteniendo 0.5 ml/l de TEA y ajustado a pH 6.4 con ácido acético glacial, y un 6 % de acetonitrilo) y (B) 60% de acetonitrilo y 40% de agua. La inyección de la muestra se realizó por el procedimiento de llenado completo del bucle para asegurar la repetitividad en la cantidad de muestra inyectada. La curva de gradiente fue escogida para optimizar el espaciado de separación de los picos en un tiempo de análisis mínimo 26 min. y a flujo constante de 0.8 ml/min., sus valores aparecen en la tabla 3.14:

Tabla 3.14: Gradiente de las fases líquidas que vehiculizan la muestra:

Tiempo	% A	% B
0	95	5
9	95	5
11	74	26
20	57	43
21	0	100
24	0	100
25	100	0

La separación de los aminoácidos se realizó en los primeros 21 min., coincidiendo el final con el 100 % de fase B, mantenida durante unos minutos con en fin de lavar la columna de componentes residuales de la muestra, tras lo cual se vuelve a 100% de fase A para estabilizar la columna antes de inyectar la siguiente muestra de plasma a los 26 min.

Previamente se identificaron cada uno de los picos que aparecían en el aminograma del patrón estándar facilitado por Sigma Chemical Company, a partir de soluciones preparadas en CIH 0.1N de 2.5 mM de cada aminoácido.

Cálculo de la concentración de aminoácidos en las muestras: el área del pico de un aminoácido en un cromatograma presenta una dependencia lineal con la cantidad de este aminoácido que está presente en la muestra. Esta dependencia viene dada por la expresión:

$$n_{aa} = RF_{aa} \times A_{aa}$$

donde n_{aa} : nº de nmoles del aminoácidos presentes en la muestra

RF_{aa} : constante de proporcionalidad

A_{aa} : área del pico del aminoácido en el cromatograma.

A la constante RF_{aa} se le llama factor de respuesta molecular absoluta, y es característica de cada aminoácido en las condiciones en que se preparan las muestras.

La adición a todas las muestras problema de un volumen conocido de una disolución de norleucina 2.5 mM, determinó un "standard interno" en los cromatogramas, el único pico cuya área conocemos de antemano, ya que se sabe a qué concentración de aminoácidos

corresponde. Éste aminoácido no está presente en las muestras biológicas, estando la totalidad del área que genera, producida por la cantidad que nosotros hemos adicionado a la muestra. Esto constituye la base del método de normalización por standard interno usado en el análisis y que se expresa mediante la ecuación:

$$\frac{\frac{A_{NL}}{n_{NL}}}{RF_{NL}} = \frac{\frac{A_{aa}}{n_{aa}}}{RF_{aa}} = cte$$

donde A_{NL} : área de NorLeu en el cromatograma

A_{aa} : área del aminoácido estudiado

n_{NL} : n° de nmoles de NorLeu en la muestra

n_{aa} : n° de nmoles del aminoácido en la muestra

RF_{NL} : factor de respuesta absoluta de la NorLeu

RF_{aa} : factor de respuesta absoluta del aminoácido

A partir de esta expresión, se puede calcular el número de moles que se encuentran en la muestra de cualquier aminoácido presente en el cromatograma, siempre que el pico aparezca bien separado de los demás, despejando este término en la ecuación anterior:

$$n_{aa} = n_{NL} \cdot \frac{A_{aa} \cdot RF_{aa}}{A_{NL} \cdot RF_{NL}}$$

donde el cociente entre área del aminoácido y área del estándar interno, que se denomina área normalizada del aminoácido, es proporcional a la cantidad de ese aminoácido en la muestra problema. Otra forma de expresión es definiendo el factor de respuesta relativa de un aminoácido como el cociente entre su factor de respuesta absoluta y el del standard interno de norleucina:

$$n_{aa} = n_{NL} \cdot RRF_{aa} \cdot \frac{A_{aa}}{A_{NL}}$$

y dividiendo por el volumen de muestra que se tomó para derivar, podemos calcular la concentración molar del aminoácido.

3.6. INDICES BIOLOGICOS:

3.6.1. EFICACIA DEL ALIMENTO

Los incrementos de peso se han expresado como porcentaje del peso inicial y en términos absolutos (g). También se expresó el crecimiento como Tasa de Crecimiento Instantáneo (TCI) según la siguiente expresión:

$$TCI = 100 \cdot \frac{\ln (\text{Peso Final}) - \ln (\text{Peso Inicial})}{n^{\circ} \text{ días}}$$

El primer paso para evaluar la eficacia del alimento, una vez cuantificada la ingesta total de la dieta, es la valoración del crecimiento en peso de los animales que cada una de las dietas experimentales promueve. Los incrementos de peso vivo deben ser expresados en términos absolutos, para un periodo determinado de tiempo. Relacionando estos datos de crecimiento con la ingesta, se puede calcular la conversión o eficacia del alimento para cada dieta, la cual viene expresada por el Índice de Eficacia Alimentaria:

$$IEA = \frac{\text{Incremento de peso (g s/sf)}}{\text{Alimento ingerido (g s/ss)}}$$

3.6.2. UTILIZACION DIGESTIVA:

Ante la dificultad que supone recoger todas las heces excretadas por los animales, se suelen utilizar métodos indirectos, en los cuales es necesario añadir a la dieta un marcador inerte, no digestible ni absorbible, de modo que los cambios en las proporciones del nutriente y el marcador en dieta y heces permiten conocer, de forma indirecta, la digestibilidad del nutriente según la siguiente expresión:

$$CDA = 100 - 100 \cdot \frac{\% \text{ indicador en dieta} \cdot \% \text{ nutriente en heces}}{\% \text{ indicador en heces} \cdot \% \text{ nutriente en dieta}}$$

Hemos usado como indicador el sesquióxido de cromo (Cr_2O_3), por ser el marcador más ampliamente usado en los estudios de digestibilidad, habiéndose confirmado su utilidad en los estudios de peces, sobre todo en el caso de la proteína (Austreng, 1978).

Para el cálculo del Coeficiente de Digestibilidad de la proteína de las materias primas experimentales, se siguió el método propuesto por Cho et al. (1985), de sustitución parcial de la dieta de referencia por el ingrediente problema. En nuestro caso, la sustitución se realizó a nivel del nutriente experimental (proteína) y no de ingrediente total. El cálculo del

CDA de la proteína de la fuente se realizó según la siguiente expresión:

$$CDA(\%) = 100 - \left(100 \cdot \frac{\text{Nutriente en heces}(\%)}{\text{Nutriente en dieta}(\%)} \cdot \frac{Cr_2O_3(\%) \text{ en dieta}}{Cr_2O_3(\%) \text{ en heces}} \right)$$

3.6.3. UTILIZACION DE LA PROTEINA:

A la hora de evaluar una fuente proteica, lo fundamental es conocer el uso que el animal hace de ella para crecimiento, lo cual se manifiesta en términos de retención de nitrógeno. Esta utilización que el animal hace de la proteína se expresa mediante índices de ganancia o retención proteica, en valores absolutos o relativos a la ingesta y/o a la absorción de nitrógeno proteico. Estos valores de retención nitrogenada, referidos tanto a la ingesta proteica como a la proteína digerida, se traducen en índices de utilización nutritiva que reflejan la calidad de la proteína de la dieta para crecimiento.

Cuando un animal ingiere una proteína, lo deseable es que tenga un destino mayoritariamente estructural, traducido en aumento de nitrógeno corporal. Es por esto, que la medida de la ganancia de nitrógeno corporal es un buen índice, tanto de crecimiento, como de aprovechamiento de la proteína de la dieta. Dado que el nitrógeno incorporado al organismo procede de la proteína ingerida, la medida del incremento corporal como índice de calidad de este nutriente ha de referirse a dicha ingesta.

Uno de los índices que evalúa la calidad proteica es el denominado Valor Productivo de la Proteína (VPP) que establece la relación porcentual entre ganancia de nitrógeno corporal y nitrógeno ingerido, en un determinado espacio de tiempo, y cuya expresión matemática es:

$$VPP = \frac{N \text{ corporal final} - N \text{ corporal inicial}}{N \text{ ingerido}} \cdot 100$$

Otro índice de evaluación de la calidad proteica es el Valor Biológico (VB), que expresa la proporción de nitrógeno retenido a partir del absorbido. Con este índice obtenemos información acerca de la calidad o utilización de la proteína para crecimiento, una vez que ha sido digerida y absorbida. A partir de los datos de VPP y CDA de la proteína, se calcula el VB aparente (si se obvian las correcciones por nitrógeno endógeno), ya que aquel

representa la proporción de nitrógeno retenido (VPP) respecto al absorbido (CDA).

$$VB \text{ aparente} = \frac{VPP}{CDA} \cdot 100$$

Quizás el término más usado en la evaluación de la proteína para crecimiento es el Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (CEC), que relaciona la ganancia de peso con la ingesta proteica mediante la expresión:

$$CEC = \frac{\text{Incremento de peso (g s/sf)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

Es muy fiable cuando las condiciones experimentales están bien estandarizadas, aunque se puede ver muy afectado por condiciones ajenas a la proteína de la dieta.

3.7. INDICES QUÍMICOS DE CALIDAD PROTEICA:

Además de los procedimientos biológicos mencionados para la valoración de la proteína, existen métodos químicos que comparan la tasa de AAE en la dieta con la del huevo de la especie o sus requerimientos en aminoácidos. Se definen los siguientes índices:

PPH: proporción de proteína huevo:

$PPH = \% \text{ aa en proteína o dieta} / \% \text{ aa en proteína huevo o necesidades para la especie.}$

Índice de aminoácidos esenciales: es la media geométrica de la relación anterior de los diez AAE.

$$IAAE = \sqrt[n]{\frac{a}{ah} \cdot \frac{b}{bh} \cdot \dots \cdot \frac{j}{jh}}$$

donde a...j= porcentaje cada AAE de la dieta problema

ac,bc,...,jc = porcentaje de AAE en la dieta control, huevo o necesidades de AAE para esa especie.

AAE/AANE: proporción entre la suma de AAE y suma de AANE

$$AAE / AANE = \frac{\Sigma AAE}{\Sigma AANE}$$

% AAE=AAE/AAT: proporción entre la suma de AAE con el total de AA x 100

$$\% EAA = \frac{\Sigma AAE}{TAA} \cdot 100$$

3.8. ACTIVIDADES ENZIMATICAS:

Se determinó la actividad del enzima glutamato deshidrogenasa hepático por ser vía final del metabolismo nitrogenado de los peces e índice de oxidación de aminoácidos que exceden cuantitativa y/o cualitativamente el patrón aminoacídico óptimo para síntesis de proteínas.

Como medida de la actividad de degradación, complementaría a los estudios de recambio proteico tisular, al menos desde el punto de vista cualitativo, se determinaron las actividades proteásicas del complejo MPC en hígado, músculo e intestino de trucha y carpa en las distintas condiciones experimentales que se contemplan.

3.8.1. GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH):

Una vez extraídos y pesados los hígados, se homogenizaron en frío con un potter de vidrio en tampón Tris-sacarosa, pH= 7.6, con una relación p/v de 50 mg/ml.

Para la determinación de la actividad Glutamato deshidrogenasa (GDH) se tomó una alícuota del homogenado que fue sometida en frío, a la acción de ultrasonidos (6000 Hz) durante 3 minutos, a intervalos de 30 sg, para liberar el componente enzimático intramitocondrial. Posteriormente, los extractos se centrifugaron durante 30 min. a 16.000 rpm (30.000 g) y 4 °C, en una centrífuga Centrikon H-401. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación se diluyó 10 veces (5 mg tej/ml) y se usó directamente para la determinación de la actividad enzimática de la GDH. Las proteínas solubles del sobrenadante se calcularon colorimétricamente a 595 nm, por el método de Bradford (1976) en el caso de las truchas, y por el método de Lowry a 640 nm, en el caso de las carpas.

Para la actividad hepática de la glutamato deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.2.), se siguió el método de Schmidt (1974), utilizando como sustrato alfa-cetoglutarato a la concentración de 100 nM. Se determinó por desaparición de NADH, mediante lectura espectrofotométrica a 340 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Uvikon 810 P con baño termostático a 25 °C. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Cálculo de las actividades enzimáticas:

La actividad específica de las diferentes enzimas se expresa como miliunidades (cantidad de enzima que transforma un nanomol de sustrato por minuto), por miligramo de proteína (actividad específica), o bien unidades (cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por minuto) por gramo de tejido o unidades por órgano completo. Se calculó según la siguiente fórmula:

$$mU / mg \text{ Proteína} = \frac{DO / \text{min.} \cdot V}{10^{-9} \cdot e \cdot d \cdot v \cdot P}$$

donde $DO/\text{min.}$ = incremento de densidad óptima por minuto

V = Volumen total de cubeta (1 ml)

e = coef. de extinción molar del NADH/NADHP ($6.22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{mol}$)

d = espesor de la cubeta (1 cm)

v = volumen del extracto en ml. (0.15 ml)

P = mg de proteína /ml.

10^{-9} = para convertir a nanomoles.

3.8.2. COMPLEJO MULTICATALITICO (MPC):

La MPC es una proteasa de alto peso molecular que mide la degradación de proteínas intracelulares. Exhibe tres actividades endopeptidasas distintas, rompe enlaces carboxílicos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos (actividad CT-L), ácidos (actividad PGPH) o básicos (actividad T-L). La proteasa hidroliza sustratos retirando del extremo N-terminal aminoácidos aromáticos (actividad similar a la quimotripsina) o retirando el aminoácido arginina (similar a la actividad de la tripsina). Las medidas se basan en la determinación de aminas aromáticas desprendidas de los sustratos, usando el procedimiento de la diazotización. El sustrato sintético lleva el aminoácido que reconoce cada actividad enzimática junto a un aminoácido aromático que es el que se colorea con la diazotización (la determinación de la actividad de síntesis de sustratos se basa en el mismo procedimiento). La cantidad de color es proporcional a la cantidad de roturas de aminoácidos aromáticos. La unidad está definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de producto por hora. La actividad específica es igual a mU/mg proteína.

Hay poca información sobre los mecanismos de la degradación proteica en peces, aunque se cree que puede jugar un papel importante en el turnover proteico intracelular. Por ello hemos estudiado las consecuencias de situaciones nutritivas distintas sobre 2-3 actividades del MPC en tres tejidos de los animales (hígado, intestino y músculo).

La determinación de la actividad MPC se ha efectuado de acuerdo con el método de Wilk y Orłowski (1983). Las medidas están basadas en la determinación de la cantidad de liberación de aminoácidos aromáticos de los sustratos sintéticos, usando el procedimiento de la diazotización.

Se ha medido en diferentes tejidos de los peces: hígado, intestino y músculo. La muestra tomada se homogenizó en tampón tris ClH 0.01M de pH=8 en frío a [200mg tej/ml tampón]. El homogenado resultante se centrifugó a 15.000 rpm (30.000 g) y 4 °C durante 45 minutos. La actividad de dicho complejo se mide en el sobrenadante resultante.

Se midieron tres, en carpas y dos, en truchas, de las actividades conocidas del MPC. La actividad Peptidil-glutamil-peptido hidrolizante (PGPH) se determina usando como sustrato una solución en dimetil sulfóxido (DMSO) de CBZ-Leu-Leu-Glu-2NA (Sigma-C0788) de una concentración 20 mM. Para la actividad similar a la quimotripsina se usó como sustrato el CBZ-Gly-Gly-Leu-pNA (Sigma-C3022) a concentración de 10 mM en DMSO y para la actividad similar a la tripsina se utilizó el sustrato CBZ-Gly-Gly-Arg-2NA (Sigma-C5770) a una concentración de 20 mM en DMSO.

La mezcla de reacción, de un volumen final de 250 μ l incluía: 10 μ l de sustrato a diferentes concentraciones (0.08, 0.16, 0.24, 0.48 y 0.8 mM para los sustratos 1° y 3°, y 0.04, 0.08, 0.12, 0.24 y 0.4 mM para el sustrato 2°), 30 μ l y 50 μ l del sobrenadante del homogenado de tejido en concreto (en trucha y carpa respectivamente) y el tampón tris ClH 0.05 M de pH=8 hasta completar los 250 μ l.

La reacción se incubó en un baño a 25 °C durante 60 minutos en todos los casos, excepto en el caso de la actividad PGPH medida en trucha en el que el tiempo de incubación fue de 30 minutos para los tejidos hígado y músculo, y de 15 minutos para el intestino. Finalizándose la reacción al añadir 250 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Para separar la proteína precipitada por el TCA los tubos de reacción se centrifugaron a 2.700

rpm durante 5 min. (volumen final=0.5 ml).

Se tomó una alícuota de 200 μ l del sobrenadante resultante, en donde se procedió a realizar la diazotización que consiste en añadir 200 μ l de NO_3Na , dejando reaccionar durante 3 minutos. Seguidamente se añaden 200 μ l de sulfamato amónico, dejando reaccionar durante 2 minutos. Finalmente se adicionó 400 μ l de 1-Naphthyl ethylen diamina diClH (Sigma). El volumen final de reacción es de 1 ml.

En el caso de las muestras con los sustratos CBZ-Leu-Leu-Glu-2NA y CBZ-Gly-Gly-Arg-2NA se incuban en un baño durante 30 min. y se lee en espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm, mientras que las muestras del sustrato CBZ-Gly-Gly-Leu-pNA se leen directamente a 540 nm.

Las actividades específicas de los diferentes tejidos se expresan como miliunidades por mg de proteína, siendo definida la unidad como la cantidad de enzima que transforma un μ mol de sustrato por hora.

$$U (\mu\text{mol} / \text{h}) / \text{ml} = \frac{\text{Incremento DO} \cdot \text{cte} \cdot 1000 \cdot t'}{V}$$

$\text{cte} = 0.069$ en sustratos 1 y 3, y 0.043 en sustrato 2

$V =$ volumen de extracto en μ l (50 μ l)

1000 para convertir μ l a ml

$t' = 1$ hora

Las formas de expresión usadas son: mU/mg de proteína, U/ g tejido, U/tej. total

El análisis de la proteína del extracto se realizó por el método de Lowry et al. (1951).

3.9. AMONIACO

La estimación del catabolismo "in totum" de los aminoácidos, mediante la valoración del contenido en nitrógeno amoniacal disuelto en agua, se efectuó por el método del indofenol, según la técnica de Lubochinsky y Zalta (1954), modificada por Chaney y Marbacht (1962).

Este método se basa en la reacción del nitrógeno amoniacal con el indofenol, usando Nitroprusiato sódico como catalizador, lo que da un compuesto de color azul bastante estable. La determinación del color resultante se efectuó en colorímetro a 625 nm, enfrentándose los datos a una curva patrón obtenida con soluciones de cloruro amónico.

3.10. ESTIMACIÓN DE LA TASA DE RECAMBIO PROTEICO

3.10.a. MEDIDA *IN VIVO* DE LA TASA DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN PROTEICA EN TEJIDOS DE TRUCHA ARCOIRIS Y CARPA.

Curvas de crecimiento: Para cada grupo de dietas, se determinaron a lo largo del periodo experimental las velocidades de crecimiento del animal completo, hígado y músculo. Para ello se sacrificaron al inicio y cada 7 días, cinco animales para la determinación del peso corporal, del hígado y del músculo blanco, así como el contenido proteico de éstos últimos según el método de Lowry et al. (1951).

La velocidad específica de crecimiento corporal (K_G), durante cada periodo experimental, se calculó como porcentaje de incremento de peso por día:

$$K_G (\% / día) = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{t} \cdot 100$$

donde los términos W_1 y W_2 corresponden, respectivamente, al peso inicial y final del período ensayado y t al número de días transcurridos en ese mismo período de tiempo. Las velocidades específicas de crecimiento, para cada uno de los tejidos, se calcularon como el porcentaje diario de ganancia de proteína tisular. Las velocidades específicas de crecimiento se calcularon según la expresión descrita anteriormente para el animal completo.

Teniendo en cuenta que las concentraciones de proteínas no variaron significativamente entre los tiempos en que se calculaba la K_G , y según describen Houlihan et al. (1988) para el cálculo de la K_G , se utilizó el valor medio obtenido entre los dos tiempos; los valores del porcentaje de incremento de proteínas/día, coinciden con los valores de porcentaje de incremento de peso/día para el hígado y el músculo.

Velocidades de recambio proteico: La velocidad fraccionaria de síntesis proteica para el hígado y el músculo blanco de la trucha arcoiris y carpa común, fue determinada por el método descrito por Garlick et al. (1980a), posteriormente aplicado a los peces por Haschemeyer (1983), Pocrnjick et al. (1983) y Houlihan et al. (1986, 1988). El método está basado en la determinación de la velocidad de incorporación de L-[2- 3 H]-fenilalanina a las proteínas tisulares tras la administración de una dosis masiva de dicho aminoácido.

Inmediatamente antes de inyectar la dosis en la vena caudal, el animal se anestesiaba con etilenglicol monofenil éter, para evitar el estrés y facilitar la administración de la solución. La solución acuosa inyectable contenía 135 mM de L-fenilalanina y L-[2- ^3H]-fenilalanina (Amersham International) de 37.0 MBq/ml, a una concentración de 100 $\mu\text{Ci/ml}$ y con una radiactividad específica de 1640 dpm/nmol. La dosis fue de 50 μCi en 0.5 ml por cada 100 g de peso corporal, lo que representa entre 5 y el 12.5 % del volumen sanguíneo total, teniendo en cuenta que éste presenta una relación con el peso del animal del orden del 4 al 10 % (Jones y Randall 1978). Después de la inyección el pez se devolvía al agua aireada, recuperándose rápidamente del efecto del anestésico. Los animales se sacrificaron a los 2 y 45 min. tras la inyección. Inmediatamente se pesó el animal, se le extrajo el hígado y se tomó la muestra de músculo. Después de pesar las muestras, se tomó una parte de éstas para el análisis de proteína, manteniéndose congelada hasta entonces; el resto de las muestras se usó para la determinación del recambio proteico y se congeló entre dos placas de aluminio enfriadas previamente en N_2 líquido a -70°C . Del polvo obtenido tras la posterior disgregación mecánica, se tomó 1 g de muestra de hígado y músculo, que se homogenizó y precipitó en 10 ml de ClO_4H al 2% (w/w). Esta operación se realizó utilizando homogenizadores manuales de vidrio con pistilo, separándose posteriormente la muestra en dos mitades iguales. Una de ellas, se centrifugó a 2.800 g durante 15 min. y se utilizó para determinar la velocidad de síntesis proteica. Tras parar todas las reacciones celulares con la congelación a -70°C , con el objetivo de mantener prácticamente invariables las concentraciones de metabolitos y demás componentes, el ClO_4H al 2% se utilizó para precipitar la fracción proteica y separar la fracción ácido soluble de la fracción ácido insoluble.

Preparación de una solución de aminoácidos procedentes de las dos fracciones:

A los diferentes sobrenadantes obtenidos anteriormente se le añadió 2.5 ml de citrato potásico saturado, produciéndose la precipitación del KClO_4 y un pH muy cercano a 6. Estas muestras se centrifugaron a 2800 g durante 10 min. y los sobrenadantes resultantes se utilizaron para medir la radiactividad de la fenilalanina libre. Los precipitados que contenían las fracciones de proteína, se lavaron una vez con ClO_4H al 2 % (5 ml), dos veces con alcohol del 95% (5 ml) y una más con éter etílico (5 ml). Para separar la fenilalanina unida a la proteína, el precipitado obtenido se sometió posteriormente a una hidrólisis en 5 ml de ClH 6 N durante 24 h. a 110°C . Realizada la hidrólisis, el ClH se retiró por evaporación hasta sequedad y los aminoácidos se resuspendieron en 3 ml de citrato sódico 2M, pH 6.3. El

conseguir este pH en cada una de las muestras es de extrema importancia para que la fenilalanina se separe de los aniones Cl⁻ y la decarboxilación posterior pueda llevarse a cabo con el máximo rendimiento y efectividad.

Aislamiento y determinación de la radiactividad específica de la fenilalanina libre y unida a las proteínas:

Transformación de la fenilalanina en β -feniletilamina: La determinación de la actividad específica de la [³H]-fenilalanina implica su conversión enzimática en β -feniletilamina (PEA). Un volumen de 1 ml de la fracción sobrenadante y/o 1.5 ml del hidrolizado se incubaron durante toda una noche a 50°C, en presencia de 0.5 ml de una suspensión de L-tirosina descarboxilasa (pulverizado seco con acetona de *Streptococcus faecalis* tipo 1. Sigma Biochemical. Co). El enzima en una cantidad de 0.5 y 1 U/ml (1 Unidad de enzima transformaba 1 μ mol/min. a 37°C y pH 5.5) para las muestras procedentes de los sobrenadantes y precipitados respectivamente, era previamente resuspendido en citrato sódico 0.5 M, pH 6.3, conteniendo 0.5 mg/ml de piridoxal fosfato.

Separación y extracción de la β -feniletilamina: Tras la incubación, y según el protocolo de Garlick et al. (1980a), la β -feniletilamina se extrajo añadiendo 1 ml de NaOH 3M y posterior agitación. Después se añadieron 10 ml de cloroformo:n-heptano (1:3 v/v) y tras agitar, la capa orgánica fue retirada, añadiéndose 5 ml de cloroformo + 3-4 ml de SO₄H₂ 0.01M y nueva agitación. Cada una de las muestras se agitó durante 1 min.

Determinación de la radiactividad de la β -feniletilamina: Tras la segunda extracción, 1 ml de la capa acuosa superior de las muestras procedentes de los sobrenadantes y 2 ml de las del hidrolizado, se mezclaron con 10 y 9 ml respectivamente de líquido de centelleo (Biogreen 3, Scharlau) especial para muestras acuosas y se midió la radiactividad en un contador de centelleo Beckman LS 600 TA, con una eficacia entre 30-40%.

Determinación de la concentración de β -feniletilamina total: La determinación de la concentración total de la B-feniletilamina se llevó a cabo según una modificación del método de Suzuki y Yagi (1976). Para ello se utilizaron 1 ó 0.02 ml de la fase acuosa superior procedente de la última extracción según fuese el origen de las muestras, sobrenadantes o hidrolizados, respectivamente. Paralelamente, se preparó una curva patrón de β -feniletilamina

en SO_4H_2 0.01M. A todas las muestras se les añadió 0.5 ml de leucil-alanina 2 mM, 1 ml de ninhidrina 50mM y 2.5 ml de fosfato potásico 1 M, a un pH 8.0, incubándose durante 1 h. a 60°C. Una vez acabada la incubación se enfrió rápidamente en hielo durante 15 min. La fluorescencia se determinó a 495nm, con una excitación a 390nm. Debido a la inestabilidad del compuesto determinado fluorimétricamente al ponerse en contacto con la luz, las dos etapas posteriores a la incubación, se llevaron a cabo en oscuridad.

Los resultados experimentales se expresaron en función de la radiactividad específica de la L-fenilalanina libre (dpm/nmol), S_A y de la radiactividad específica de la fenilalanina unida a proteínas (dpm/nmol), S_B . La velocidad fraccionaria de síntesis proteica, K_S (%día) se calcula como el porcentaje de la masa de proteínas sintetizada por día según la siguiente expresión:

$$K_S = (S_{B(t_2)} - S_{B(t_1)} / S_{A(t_2-t_1)}) \cdot 100 / (t_2 - t_1)$$

donde los valores $S_{B(t_2)}$ y $S_{B(t_1)}$ corresponden a la radiactividad específica unida a la proteína a los tiempos experimentales t_2 (45 min.) y t_1 (2 min.); $S_{A(t_2-t_1)}$ corresponde a la radiactividad específica libre media del contenido de L-Phe de los períodos t_1 y t_2 . Finalmente t_2-t_1 corresponde a las diferencias entre los dos tiempos de experimentación.

Para el cálculo de la síntesis total de proteína por órgano y por día, se aplicó el porcentaje representado por la K_S , al contenido proteico total del órgano y al peso del mismo:

$$\text{Síntesis total} \cdot \text{día} = K_S / 100 \cdot [\text{proteína (mg / g órgano)}] \cdot \text{peso órgano}$$

Por otra parte, la velocidad de degradación proteica para cada tejido, se calculó en función de la diferencia entre la velocidad de síntesis (K_S % día) y la velocidad de crecimiento (K_G %día), calculándose según la siguiente expresión:

$$K_D = K_S - K_G$$

Finalmente, el concepto de eficacia tisular de retención de las proteínas sintetizadas, en forma de crecimiento, entendida como el porcentaje de proteína sintetizada que se deposita en el tejido, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$EPR = (K_G / K_S) \cdot 100$$

3.10.b.DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DNA Y RNA TISULARES:

Para la separación, extracción y cuantificación de los contenidos de RNA y DNA se utilizó el procedimiento recomendado por Munro y Fleck (1966).

Precipitación de ácidos nucleicos y proteínas y eliminación de sustancias contaminantes.:

El método de Schmidt-Thannhauser (1945) provee la mejor base teórica y práctica para una estimación precisa de los contenidos de DNA y RNA. Ha sido modificado por Fleck y Munro (1962) y Peragón (1993).

El paso inicial consiste en la homogenización del tejido congelado en N₂ líquido y precipitación de las proteínas y los ácidos nucleicos en ClO₄H al 2%, posteriormente y tras una centrifugación durante 15 min. a 2800 g, el precipitado resultante se lava dos veces con una solución 0.2 N de ClO₄H. A continuación se descartó el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble en ácido.

El método usual de eliminar sustancias contaminantes (nucleótidos libres, coenzimas, etc) es por precipitación de los ácidos nucleicos, proteínas y otras grandes moléculas con ácido en frío, normalmente tricloroacético (TCA) o ácido perclórico ClO₄H. El TCA tiene el inconveniente de que absorbe luz ultravioleta y puede interferir con las estimaciones posteriores de ácidos nucleicos por este método (Munro y Fleck, 1966).

Los resultados de Hallinan et al. (1963), confirmaron los de Ogur y Rosen (1950), demostrando que con el ClO₄H 0.2 N se produce una máxima precipitación de DNA y proteínas hepáticas, sin extraer RNA del tejido. Es esencial mantener la temperatura entre 0 y 4°C, ya que a mayor temperatura no sólo el RNA se hace ácido soluble, sino que se reduce la recuperación del DNA.

Separación y extracción de la fracción de RNA del DNA:

El procedimiento de ambas fracciones según el método de Schmid-Thannhauser (1945), se basa en el hecho de que el DNA es resistente a la acción de una base, mientras que el RNA no lo es, hidrolizándose, por tanto, en sus correspondientes nucleótidos. La

condición más idónea para producir la hidrólisis básica consiste en la incubación en KOH 0.3 N (4ml) a 37°C, durante 1 h. Inmediatamente pasado este tiempo, se enfría en hielo durante 10 min. y se precipitan las proteínas y el DNA añadiendo 2.5 ml de ClO_4H 1.2 N. Posteriormente y tras una centrifugación a baja velocidad (1000g), se separa el precipitado y se decanta la fracción del sobrenadante en donde se localiza el RNA. Posteriormente, se lava el precipitado dos veces con 5 ml de ClO_4H 0.2N cada una y se añaden estos lavados a la fracción de RNA.

El uso de KOH tiene la ventaja de formar perclorato potásico insoluble a 0-4°C, lo que permite retirar el ión potasio de la fracción de RNA, al final de la digestión cuando se le añade ClO_4H al precipitado de DNA.

La forma más común de determinar el RNA en la fracción ácido-soluble de una digestión alcalina, es midiendo la absorción UV a 260 nm, siendo los principales contaminantes los productos de degradación de proteínas tisulares, ya que absorben la luz UV, de ahí que sea aconsejable un corto período de digestión en medio alcalino, el cual es suficiente para completar la extracción del RNA y para obtener un efecto hipercrómico completo (Munro y Fleck, 1966).

Para separar la fracción ácido-soluble (RNA) de la digestión, Munro y Fleck, recomiendan enfriar las muestras de la digestión alcalina a 0°C antes de acidificar, para obtener una precipitación máxima. El procedimiento usado por estos autores, consiste en acidificar la digestión a una concentración final de ClO_4H de 0.2 N, el cual produce una precipitación óptima de la proteína y del DNA, los lavados posteriores del precipitado con ClO_4H 0.2 N permiten, finalmente, una completa separación del RNA y del DNA.

Determinación de la concentración de RNA:

A la solución final obtenida anteriormente, se le añaden 10 ml de ClO_4H 0.6 N y se completa hasta 100 ml con H_2O , resultando una solución de ribonucleótidos en un medio 0.1N de ClO_4H . En esta solución, se determina la absorción ultravioleta a 260 y 232 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70. La concentración de RNA se calculó según la siguiente expresión:

$$RNA (\mu g / ml) = 32.9 \cdot A_{260} - 6.11 \cdot A_{232}$$

La intensa y característica absorción de la luz UV de las bases púricas y pirimidínicas en la región de los 260 nm se utiliza para estimar la cantidad de RNA en solución. Para evitar la interferencia correspondiente a la proteína se introduce un factor de corrección ya que el espectro de absorción de la proteína es máximo a 232 nm y el del RNA mínimo a esta longitud de onda.

Determinación de la concentración de DNA:

Para la determinación del contenido en DNA, se disuelve el precipitado obtenido de la acidificación de la digestión alcalina en 5 ml de KOH 0.3 N, calentándolo suavemente hasta 37°C. La solución se lleva hasta 50 ml añadiéndole 12 ml de 0.3 N de KOH hasta conseguir una solución de DNA en 0.1 N de KOH. Finalmente, 2 ml de esta solución se utilizarán para la determinación del contenido de DNA, de acuerdo con el método de Ceriotti (1952). Este método se basa en la estimación específica de la concentración de desoxirribosa. La técnica seguida es una modificación de la reacción inicial propuesta por Ceriotti (Webb y Levi, 1958). Esta medida depende de la formación de un compuesto amarillo-marrón cuando el DNA se calienta con indol en una solución ácida de ClH, siendo este método diez veces más sensible que la reacción de la difenilamina de Dische (Munro y Fleck, 1966).

La técnica de medida se basa en el siguiente protocolo: a 2 ml de muestra se le añaden 1 ml de indol al 0.04 % en agua destilada y 1 ml de ClH concentrado. La muestra se coloca en un baño en agua hirviendo con agitación continua durante 10 min. y después se enfría en agua helada. La solución se extrae 3 veces con 4 ml de cloroformo y la capa acuosa se separa de la fase orgánica por centrifugación. La intensidad del color amarillo en la fase acuosa se mide en un espectrofotómetro Beckman DU-70 a 490 nm, frente a un blanco tratado de la misma forma y se compara con el valor obtenido en una curva patrón de DNA (2.5-1.5 μ g DNA/ml) realizada previamente.

Los contenidos de RNA y DNA se expresan en mg/g tejido. La concentración de DNA total para el día de la determinación de la velocidad de recambio expresada en mg por órgano completo, se calculan multiplicando el peso del órgano por la concentración correspondiente de DNA.

A la relación existente entre los niveles de RNA y la concentración de proteína en el tejido (RNA/proteína) se denomina **capacidad de síntesis (C_S)** y se expresa como mg/g, e indica la capacidad de un determinado tejido para sintetizar proteínas.

La **eficacia de síntesis proteica (K_{RNA})**, se define como la cantidad en g de proteína sintetizada por día y por g RNA, y se calcula a partir del cociente entre la velocidad de síntesis y la capacidad de síntesis, según la expresión:

$$K_{RNA} = (K_S / C_S) \cdot 10$$

La cantidad en g de proteína sintetizada por día y por unidad celular, se define como K_{DNA} y se calcula como los g de proteína sintetizados por día y por g de DNA según la ecuación:

$$K_{DNA} = [K_S \cdot (Proteína / DNA)] / 100$$

Determinación de la radiactividad específica de la fenilalanina libre y unida a las proteínas.

3.11. ANALISIS ESTADISTICO:

Se ha utilizado el Paquete CSS: STATISTICA de Soft Inc. Tulsa (USA). El análisis de la varianza de una vía (ANOVA) con o sin covariable sirve para detectar el posible efecto de los tratamientos aplicados (dietas, experimentos, etc), complementado con un test de comparaciones múltiples a posteriori, normalmente el de menor diferencia de significación (Newman-Keuls test). En el caso de las dos temperaturas se realizó un diseño factorial de dos factores (1x2). Nivel límite de significación para las diferencias, $p < 0.05$. Análisis de correlación/regresión: relación/dependencia entre 2 variables (corr. lineal, exp., log., etc). La diferencia entre ecuaciones de regresión lineal se establecieron por comparación entre pendientes (T-Student).

RESULTADOS

Introducción:

En este apartado se comentan los resultados obtenidos en los distintos experimentos y que se presentan en las tablas correspondientes. Para la rápida localización de las tablas se ha utilizado la siguiente numeración. El primer dígito hace referencia al capítulo de la Memoria donde se encuentra la tabla (3. Material y Métodos y 4. Resultados). El segundo dígito, se refiere al objetivo (1. Truchas y 2. Carpas). El tercer dígito corresponde al número de la tabla dentro de cada uno de los objetivos.

OBJETIVO 1: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA EN DIETAS PARA TRUCHAS.

EXPERIMENTO 1.1: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ

En este experimento se valoraron seis dietas cuya fórmula es a base de gluten de maíz con suplementación de lisina donde la única variable era la incorporación de lisina libre o encapsulada (Tabla 3.3). El perfil aminoacídico de las diferentes dietas se muestran en las tablas 3.6 (en % de proteína) y 3.7 (en % de dieta). En ellas podemos encontrar diversos índices químicos de calidad proteica de las dietas. En todos los casos los valores más altos corresponden a la dieta control, seguida de las dietas que están suplementadas con lisina, teniendo unos índices más bajos, aunque no significativos la dieta deficiente como se esperaba según la formulación diseñada. El índice de aminoácidos esenciales (IAAE) se ha calculado tomando como referencia las necesidades de aminoácidos de la trucha (Ogino, 1980), o la composición en aminoácidos del huevo de trucha (Ketola, 1982).

Efecto de la composición de la dieta sobre la ingesta y el crecimiento:

En las Tablas 4.1.1 y 4.1.2 se relacionan los resultados de ingesta, variación de peso e índices de utilización nutritiva de las diferentes dietas experimentales.

La valoración del grado de aceptación de las diferentes dietas experimentales por parte de los animales, juzgada a partir de las cantidades respectivas ingeridas (Tabla 4.1.1.), muestra que las dietas suplementadas con lisina tienen una aceptación algo menor a la dieta control, no siendo significativa para la dieta que estaba suplementada con lisina encapsulada del tipo B. La dieta peor aceptada con diferencias significativas con el resto de dietas es la dieta deficiente en lisina. Cuando la ingesta se refiere a 100 gramos de pez y día, las diferencias entre las dietas suplementadas en lisina y la dieta control pierde la significación, mientras que la dieta deficiente es la que presenta un valor significativamente más bajo.

TABLA 4.1.1. Efecto de la composición de las dietas sobre la ingesta y crecimiento de trucha.

	DIETAS					
	C	GA	GB	GC	GL	GD
P.medio inicial(g)	6.79 ^a ±0.19	7.23 ^a ±0.10	7.09 ^a ±0.14	7.08 ^a ±0.05	7.18 ^a ±0.27	7.04 ^a ±0.19
P.medio final(g)	39.38 ^a ±0.40	33.01 ^b ±1.35	35.05 ^b ±1.58	31.47 ^b ±1.37	33.96 ^b ±1.65	24.57 ^c ±1.07
TCI ¹	2.28 ^a ±0.02	1.97 ^b ±0.05	2.07 ^b ±0.04	1.94 ^b ±0.05	2.02 ^b ±0.08	1.62 ^c ±0.05
P. inicial(g)	378.0 ^a ±15.2	390.7 ^a ±5.5	382.7 ^a ±7.4	382.3 ^a ±2.5	387.9 ^a ±14.8	380.2 ^a ±10.3
P. final(g)	2193 ^a ±48	1739 ^b ±80	1858 ^b ±83	1656 ^b ±53	1788 ^b ±84	1318 ^c ±50
ΔPeso (%)	480.9 ^a ±10.7	345.2 ^b ±20.5	385.1 ^b ±13.7	333.0 ^b ±11.2	362.5 ^b ±29.9	246.8 ^c ±11.2
Ing. total (g)	1750 ^a ±21	1487 ^b ±85	1577 ^{ab} ±75	1409 ^b ±50	1456 ^b ±73	1075 ^c ±48
Ing.(g/100g/d)	1.77 ^a ±0.03	1.81 ^a ±0.04	1.83 ^a ±0.01	1.80 ^a ±0.01	1.74 ^a ±0.03	1.64 ^b ±0.02
Ing.Prot.(g/100g/d)	0.74 ^a ±0.01	0.77 ^a ±0.02	0.75 ^a ±0.01	0.76 ^a ±0.01	0.70 ^b ±0.01	0.68 ^b ±0.01
IEA ¹	1.04 ^a ±0.01	0.91 ^d ±0.00	0.93 ^c ±0.00	0.90 ^d ±0.00	0.96 ^b ±0.01	0.87 ^c ±0.01

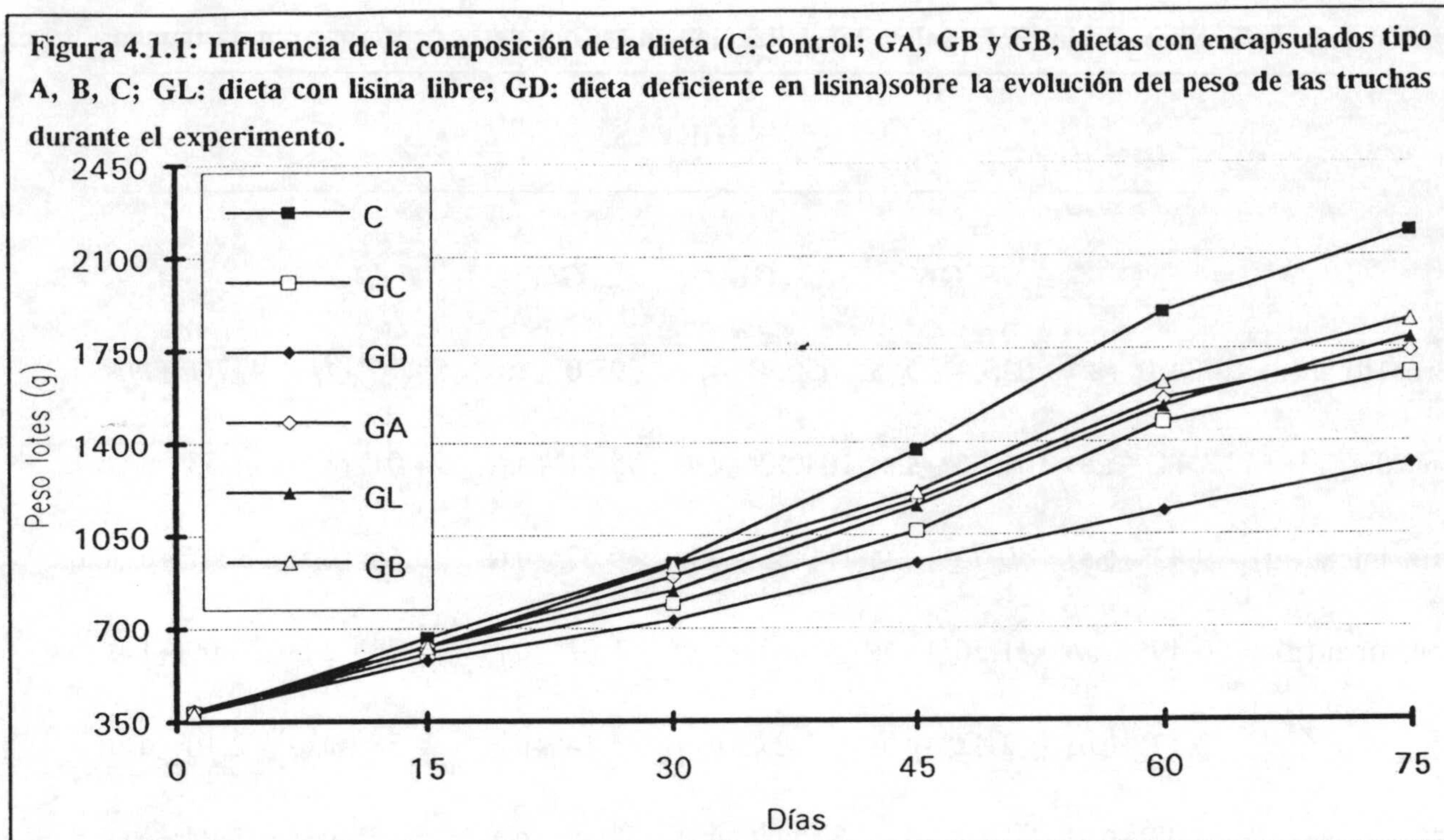
¹ TCI: $(\ln Pf - \ln Po) / d \cdot 100$; IEA: $\Delta \text{Peso} / \text{Ing.}$ C: control; GA, GB, GC: dietas + tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. Los resultados son media \pm ES de 3 lotes experimentales. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

El crecimiento inducido por el consumo de las diferentes dietas ensayadas, a lo largo del periodo experimental, puede expresarse de distintas formas (Tabla 4.1.1). Tomando como referencia el respectivo peso medio inicial, el incremento porcentual de peso ha sido máximo para los lotes de animales alimentados con la dieta control. Las dietas suplementadas con lisina tanto en forma libre o encapsulada con cualquiera de las tres cubiertas no mostraron diferencias significativas entre sí y todas ellas produjeron un mayor incremento de peso respecto a la dieta sin suplementar o deficiente.

La valoración del crecimiento mediante la tasa de crecimiento instantáneo (TCI) (Tabla 4.1.1.) presenta la misma tendencia que el porcentaje de incremento de peso.

Al relacionar los dos parámetros ya comentados, ingesta de dieta y ganancia de peso, por medio del índice de eficacia alimentaria (IEA) (Tabla 4.1.1.) denuevo, la dieta deficiente presenta los resultados más bajos, y la dieta control los más altos significativamente. En este

caso, las dietas suplementadas en lisina presentan diferencias significativas entre sí, siendo algo mayor significativamente la dieta G-L (G+lys libre) a la dieta G-B (G+lys B encapsulada), y ésta a las dietas G-A (G+lys A encapsulada) y G-C (G+lys B encapsulada).



Influencia de la dieta sobre la utilización nutritiva de la proteína (CEC y VPP) por las truchas.

En la Tabla 4.1.2 se presentan los índices CEC y VPP así como algunos valores necesarios para su cálculo.

El CEC nos informa de la eficacia con que la proteína de la dieta se utiliza para crecimiento en peso, independientemente de la composición corporal, mientras que el VPP es un índice aún más relacionado con la calidad proteica ya que expresa el porcentaje de proteína retenida respecto a la ingerida. La retención corporal de la proteína de la dieta (VPP) es, de los índices empleados, el más representativo de la calidad nutritiva de la proteína.

El análisis estadístico de las posibles diferencias nos muestra, en cuanto al índice CEC, que, por unidad de proteína ingerida, la dieta control fue significativamente mayor al resto de las dietas. Las dietas con suplementación de lisina libre y tipo B fueron más productivas que los otros dos tipos de suplementación A y C, sin que la diferencia entre estas dos últimas y la deficiente sea significativa.

Si observamos el índice VPP, la dieta control presentó el mayor valor mientras que la dieta deficiente el más bajo, ambos significativamente diferentes respecto al resto de dietas. Presentando valores intermedios y muy cercanos las dietas suplementadas con lisina,

destacando entre ellas la dieta suplementada con el tipo B, que en todos los índices examinados fue mayor al resto de las dietas suplementadas.

TABLA 4.1.2. Influencia de la dieta sobre la utilización nutritiva de la proteína por la trucha.

	DIETAS					
	C	GA	GB	GC	GL	GD
Ing.Prot. total (g)	734.0 ^a ±8.7	635.4 ^b ±36.5	650.7 ^b ±31.2	595.0 ^b ±21.0	587.6 ^b ±29.4	447.1 ^c ±19.8
N ingerido(g)	117.44 ^a ±1.39	101.66 ^b ±5.84	104.12 ^b ±4.99	95.21 ^b ±3.35	94.01 ^b ±4.71	71.53 ^c ±3.17
N corp. inicial (g)	9.42 ^a ±0.37	9.73 ^a ±0.13	9.53 ^a ±0.18	9.52 ^a ±0.06	9.66 ^a ±0.37	9.47 ^a ±0.26
N corp. final (g)	56.49 ^a ±1.80	41.26 ^b ±1.75	46.62 ^b ±1.89	41.02 ^b ±0.85	43.73 ^b ±2.25	28.09 ^c ±1.43
CEC ¹	2.47 ^a ±0.03	2.12 ^d ±0.01	2.27 ^c ±0.01	2.14 ^d ±0.01	2.38 ^b ±0.03	2.10 ^d ±0.01
VPP ¹	40.07 ^a ±0.88	31.02 ^d ±0.45	34.66 ^{bc} ±0.21	33.11 ^c ±0.54	36.17 ^b ±0.68	25.97 ^c ±0.66

¹CEC: (Δpeso/g prot ing.); VPP:(% N retenido del ingerido); C: control; GA,GB,GC: dietas + tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. Los resultados son media ±ES de e lotes experimentales. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, p<0.05)

Efecto de la composición de la dieta sobre la composición corporal de la trucha:

La totalidad de las truchas usadas en este experimento, presentada en la Tabla 4.1.3, muestran una composición corporal uniforme, destacando pequeñas diferencias en el porcentaje de proteína entre la control y las suplementadas con lisina. Aunque la control es significativamente diferente a éstas, entre ellas no existieron diferencias. La dieta deficiente presentó el valor más bajo, siendo significativo respecto al resto de las dietas. En cuanto al porcentaje de grasa corporal, la dieta control y G-A presentaron un valor significativamente mayor que el resto de las dietas. Ninguna de las dietas experimentales ensayadas afectó de forma significativa el contenido en cenizas totales de los animales al final del experimento. En cuanto al contenido en agua sólo la dieta deficiente (G-D) presentó valores significativamente más altos.

TABLA 4.1.3. Efecto de la composición de la dieta sobre la composición corporal de la trucha en (% s/sf).

Dieta	%Humedad	%Proteína	%Grasa	%Cenizas
Inicia	74.90±0.47	15.57±0.21	6.04±0.13	2.70±0.06
Control	72.02 ^a ±0.31	16.09 ^a ±0.17	9.62 ^a ±0.16	2.41 ^a ±0.04
GA	72.39 ^a ±0.33	15.35 ^{bc} ±0.15	9.85 ^a ±0.11	2.40 ^a ±0.03
GB	71.52 ^a ±0.19	15.50 ^b ±0.16	10.60 ^b ±0.09	2.41 ^a ±0.03
GC	72.13 ^a ±0.24	14.83 ^b ±0.16	10.51 ^b ±0.09	2.39 ^a ±0.03
GL	71.71 ^a ±0.31	15.28 ^{bc} ±0.16	10.54 ^b ±0.18	2.41 ^a ±0.03
GD	73.50 ^b ±0.34	13.31 ^d ±0.14	10.21 ^b ±0.11	2.45 ^a ±0.03

C: control; GA,GB,GC: dietas + encapsulados tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$) Los resultados son media ±ES de 3 lotes experimentales de 10 animales.

4.1.2. EXPERIMENTO 2: UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LA PROTEÍNA DE LA DIETA

En la Tabla 4.1.4 se expresan los valores del Coeficiente de Digestibilidad Aparente y valor biológico (VBA) de la proteína de las dietas, así como el CDA del conjunto de la dieta, calculados a partir de la composición de las heces en proteína (CDA proteína) y cromo como marcador inerte encontrándose que en ningún caso hubo diferencias.

TABLA 4.1.4: Influencia de la forma de suplementación de la proteína de gluten con lisina, sobre la Digestibilidad Aparente (CDA) y Valor Biológico Aparente (VBA) de la proteína de las dietas, y CDA del conjunto de la dieta en la trucha.

	Control	GA	GB	GC	GL	GD
CDA	94.44 ^a ±0.45	95.40 ^a ±0.42	94.84 ^a ±0.25	94.33 ^a ±0.31	93.97 ^a ±0.10	95.06 ^a ±0.67
CDA	80.66 ^a ±0.97	82.71 ^a ±1.08	81.83 ^a ±0.99	80.13 ^a ±0.44	81.59 ^a ±0.72	79.45 ^a ±1.29
VBA	42.40 ^a ±0.37	32.51 ^a ±0.58	36.53 ^a ±0.49	35.13 ^a ±0.24	38.59 ^a ±0.32	27.30 ^a ±0.79

C: control; GA,GB,GC: dietas + encapsulados tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$) Los resultados son media ±ES de 3 lotes experimentales.

4.1.3. EXPERIMENTO 3: DINÁMICA POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA DE TRUCHAS ALIMENTADAS CON DIETAS A BASE DE GLUTEN SUPLEMENTADO CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA.

Los niveles de aminoácidos libres en plasma (Lys, AAE y AAT) de las muestras tomadas a distintos tiempos después de la ingesta de la dieta correspondiente (hora cero) se localizan en la Tabla 4.1.5. y Figuras 4.1.3.a y b.

Los resultados de las concentraciones plasmáticas vienen expresados como $\mu\text{mol}/100$ ml de plasma.

Tabla 4.1.5. Concentraciones plasmáticas (en $\mu\text{moles}/100$ ml) de Lys, AAE y AAT en trucha: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina). Los valores son media de 5 animales.

	HORAS								
	0	2	4	8	10	12	14	16	24
[Lys]									
G-A	14,986	15,301	15,619	<u>18,692</u>	15,661	15,752	19,938	<u>23,361</u>	10,107
G-B	10,185	12,527	10,185	17,077	16,097	<u>22,115</u>	<u>22,748</u>	12,508	10,913
G-C	10,24	14,62	16,99	<u>19,83</u>	10,96	12,60	22,68	<u>25,14</u>	11,36
G-L	10,24	17,36	16,42	18,02	<u>21,58</u>	14,23	14,04	15,75	12,14
G-D	14,98	15,73	13,40	14,03	12,91	14,69	15,87	<u>16,35</u>	12,98
[AAE]									
G-A	107,88	102,01	119,64	102,55	145,28	<u>154,06</u>	<u>168,01</u>	138,51	130,81
G-B	117,88	119,30	76,32	99,97	106,53	108,28	<u>121,61</u>	<u>134,29</u>	103,15
G-C	123,55	101,20	97,85	85,91	90,12	<u>146,62</u>	<u>160,07</u>	<u>145,81</u>	127,97
G-L	114,64	109,12	78,91	103,96	109,08	<u>133,94</u>	<u>161,39</u>	106,61	129,95
G-D	80,00	86,92	105,22	118,41	106,95	<u>125,84</u>	<u>122,47</u>	<u>149,18</u>	153,30
[AAT]									
G-A	223,30	193,24	204,37	201,89	213,22	209,09	<u>281,52</u>	<u>280,98</u>	239,04
G-B	225,30	242,67	178,00	188,66	200,10	208,84	<u>226,95</u>	<u>253,33</u>	199,97
G-C	226,99	206,91	182,97	174,04	198,03	281,11	<u>324,58</u>	<u>343,06</u>	261,44
G-L	228,39	198,96	162,74	198,46	206,62	239,65	<u>284,45</u>	<u>321,24</u>	241,09
G-D	223,30	166,28	199,12	209,92	229,03	242,50	<u>258,85</u>	<u>331,92</u>	295,52

Los niveles de aminoácidos, según nuestros análisis, comienzan a subir a partir de las 2 horas después de la ingesta de alimento, presentando unos máximos de concentración a distintas horas en función de la forma de suplementación.

La dieta deficiente presenta unos niveles de lisina muy bajos en todo momento, con una pequeña subida entre las 12 y 16 horas resultado de la absorción de lisina de las fuentes proteicas que componen su dieta.

Los máximos de concentración de lisina en plasma se obtuvieron en torno a las siguientes horas tras la ingesta de las distintas dietas:

-Deficiente en lisina (G-D): entre las 12 y 16 horas.

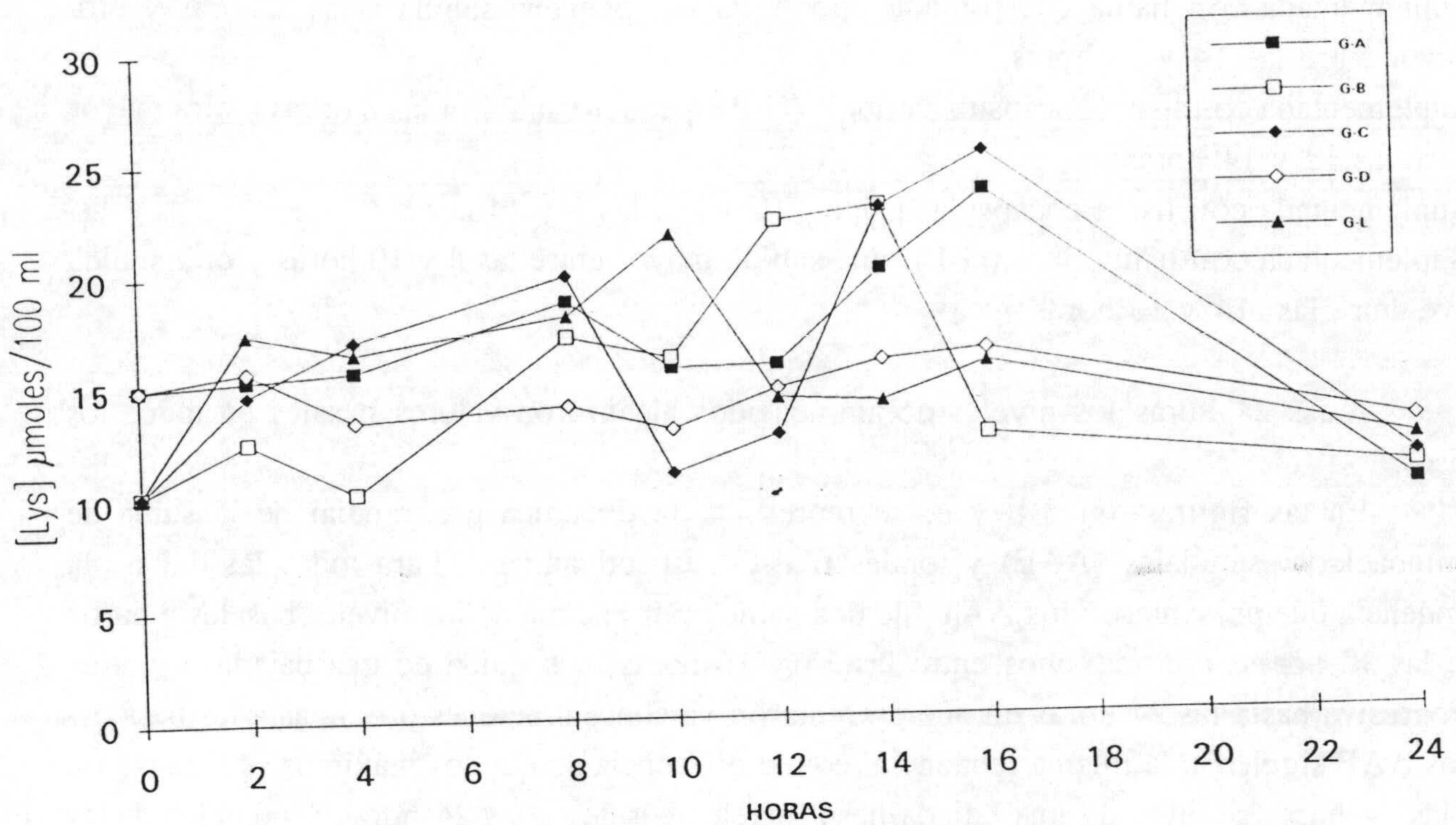


Figura 4.1.3 a: Dinámica postprandial de Lys en plasma de trucha: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina). Los valores son media de 5 animales.

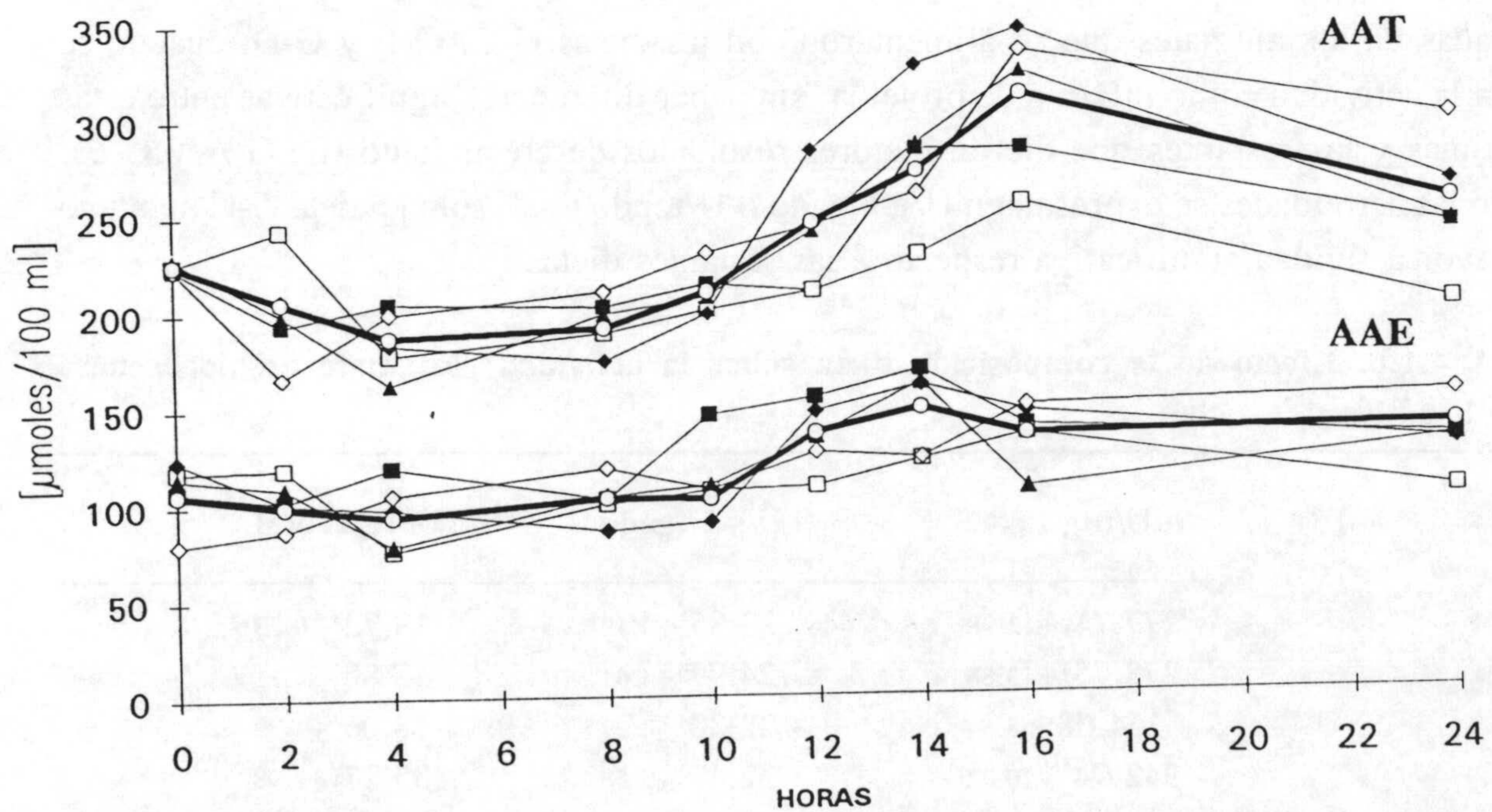


Figura 4.1.3 b: Dinámica postprandial de AAT y AAE en plasma de trucha: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina). Los valores son media de 5 animales.

- Suplementada con lisina encapsulada tipo A (G-A): pequeña subida a las 8 horas y otra mayor entre las 14 y 16 horas.
- Suplementada con lisina encapsulada tipo B (G-B): pequeña subida a las 8 horas y otra mayor entre las 12 y 14 horas.
- Suplementada con lisina encapsulada tipo C (G-C): a las 8 y 14 horas.
- Suplementada con lisina libre (G-L): una subida mayor entre las 8 y 10 horas y otra subida leve entre las 14 y 16 horas.

A las 24 horas los niveles de aminoácidos alcanzaron valores basales en todos los casos.

En las figuras 4.1.3 b y c, se representa la dinámica posprandial de la suma de aminoácidos esenciales (AAE) y totales (AAT) respectivamente. Para todas las dietas, la tendencia que presentaron los AAT fue una subida por encima de los niveles basales a partir de las 12 horas, con máximos entre las 14 y 16 horas, y seguida de una bajada posterior progresiva hasta las 24 horas en que presentaron ya concentraciones próximas a las basales. Los AAE siguieron la misma tendencia, con la diferencia de que los máximos se alcanzaron a las 14 horas seguida de una bajada hasta niveles basales a las 24 horas. Todas las dietas presentaron la misma dinámica, ya que la composición general de las dietas era la misma.

Efecto de la composición de la dieta sobre la actividad GDH hepática de trucha:

En la Tabla 4.1.6 se muestran los valores obtenidos para esta actividad medida en hígado de truchas alimentadas con las distintas dietas. Las mayores actividades fueron registradas en los animales que se alimentaron con las dietas G-C, G-L y G-D, cuando se expresa la actividad como mU/mg de proteína, sin haber diferencias significativas entre estas dos últimas y las restantes que dieron mejores resultados de crecimiento (C, G-A y G-B). Cuando las actividades se expresan en U/g hígado o U/tejido total, sólo la dieta G-C mantuvo una mayor actividad significativa respecto a las restantes dietas.

TABLA 4.1.6. Efecto de la composición dieta sobre la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) hepática de trucha.

Dieta	mU/mg Prot.	U/g Hígado	U/Tej.Total
Control	277.71 ^a ± 12.98	23.35 ^a ± 1.19	19.72 ^a ± 0.75
GA	278.73 ^a ± 13.88	24.97 ^a ± 1.41	18.80 ^a ± 1.11
GB	264.08 ^a ± 8.84	22.30 ^a ± 1.37	15.06 ^a ± 1.29
GC	342.94 ^b ± 20.02	32.45 ^b ± 2.58	35.27 ^b ± 2.98
GL	308.09 ^{ab} ± 11.92	27.25 ^a ± 1.44	20.38 ^a ± 0.41
GD	292.19 ^{ab} ± 20.24	25.66 ^a ± 1.72	15.28 ^a ± 0.66

C: control; GA,GB,GC: dietas con encapsulados tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina.; a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (N-K test, p<0.05) Los valores son media ± ES de 6 animales.

4.1.4. EXPERIMENTO 4: INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA DE DIETAS A BASE DE PROTEÍNA GLUTEN DE MAÍZ, COMO FUENTE PROTEICA MAYORITARIA, SOBRE EL RECAMBIO PROTEICO EN HÍGADO Y MÚSCULO BLANCO DE LA TRUCHA.

Se realizaron medidas *in vivo* de la tasa de síntesis y degradación proteica en hígado y músculo blanco de las truchas. Las 6 dietas del experimento 2, se redujeron a 4 al seleccionar la microcapsula más favorable para este otro experimento. Las dieta por tanto, fueron: control (C), dieta con la microcápsula que mejores resultados tuvo en cuanto a crecimiento, tipo B (G-B), dieta con la lisina libre (G-L) y dieta deficiente en lisina (G-D).

a) Influencia de la forma de suplementación con lisina, de la proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del hígado de la trucha.

La velocidad específica de crecimiento corporal o tisular (K_G) se calcula como el porcentaje diario de incremento de peso. Conociendo el contenido proteico de cada víscera o tejido, es posible conocer la K_G proteica o % diario de aumento de proteína. Como se ha podido comprobar con anterioridad, al no variar de forma apreciable durante el período experimental, el contenido proteico, se ha empleado la velocidad específica de crecimiento como velocidad de acúmulo proteico. Las diferencias en éstos índices reflejan el crecimiento del experimento 2. La K_G hepática para las dietas control y G-B no presentan diferencias significativas entre ellas, siendo mayores significativamente a las de las dietas de peor calidad G-L y G-D, presentando ésta última el valor más bajo.

En la Tablas 4.1.7, podemos observar, para los distintos índices calculados, el efecto de la suplementación o no de la dieta con lisina, libre o encapsulada, sobre la tasa de recambio proteico y el contenido de ácidos nucleicos del hígado de la trucha.

La eficacia de retención EPR experimentó cambios paralelos a los de la velocidad de crecimiento (K_G), índice con el que está directamente relacionada. En este sentido las dieta G-D y G-L produjeron en una menor eficacia de la retención de proteínas hepáticas (5.09 y 9.47 respectivamente).

La velocidad de síntesis proteica (K_S) fue significativamente inferior para las dietas G-D y G-L, aunque no presentaron diferencias significativas con la control y la dieta suplementada con el encapsulado del tipo B. La velocidad de degradación proteica (K_D) cambió en el mismo sentido que la velocidad de síntesis, excepto para la dieta deficiente que presentó una K_D superior a las dietas G-B y G-L, aunque con diferencias no significativas.

La capacidad del hígado para sintetizar proteínas ($C_S = \text{ARN/proteína}$) resultó ser muy superior en el hígado respecto a la del músculo (Tabla 4.1.6) debido, sobre todo, al mayor contenido en ARN. El contenido hepático de ARN fue significativamente mayor en las dietas control y G-B. El menor contenido en ARN y el consiguiente menor C_S fue

obtenido para la dieta deficiente en lisina (G-D). La capacidad de transcripción (mg ARN/mg ADN) de los hepatocitos fue muy similar en todas las dietas, aunque con diferencias significativas de la control y G-B, con la de las dietas G-D y G-L.

La eficacia de síntesis proteica ($K_{RNA} = (K_S / C_S) \times 100$) y la cantidad de proteína sintetizada por unidad celular ($K_{DNA} = \text{g proteína sintetizada / día / g ADN}$) fueron significativamente más altas para la dieta deficiente, debido al bajo valor que presentó esta dieta en C_S y concentración de ADN.

TABLA 4.1.7: Influencia de la forma de suplementación con lisina, de la proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del hígado de la trucha.

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-B
K_G	1.90 ^a ±0.12	0.76 ^c ±0.05	1.31 ^b ±0.07	1.72 ^a ±0.17
K_S	17.02 ^a ±0.94	14.97 ^a ±0.38	14.15 ^a ±0.98	15.44 ^a ±0.95
K_D	15.12 ^a ±1.34	14.21 ^a ±0.38	12.84 ^a ±0.98	13.72 ^a ±0.95
C_S	58.24 ^a ±2.98	29.56 ^c ±2.23	40.89 ^b ±3.98	61.68 ^a ±0.63
K_{RNA}	2.92 ^{ab} ±0.23	5.06 ^c ±0.13	3.46 ^b ±0.24	2.50 ^a ±0.15
K_{DNA}	12.74 ^a ±1.00	35.38 ^d ±0.90	22.97 ^c ±1.59	17.23 ^b ±1.06
EPR	11.54 ^a ±0.95	5.09 ^b ±0.13	9.47 ^a ±0.77	11.26 ^a ±0.68
[Proteína]	146.9 ^a ±8.5	153.2 ^a ±9.2	141.7 ^a ±7.2	141.7 ^a ±7.0
[ARN]	8.51 ^a ±0.31	4.52 ^c ±0.34	5.80 ^b ±0.28	8.74 ^a ±0.06
[ADN]	1.96 ^a ±0.72	0.65 ^c ±0.15	0.87 ^c ±0.15	1.27 ^b ±0.07
Prot./ADN	122.6 ^a ±4.7	150.8 ^a ±4.5	145.4 ^a ±3.8	112.2 ^a ±5.5
ARN/ADN	6.78 ^a ±0.11	4.44 ^b ±0.22	4.56 ^b ±0.60	6.93 ^a ±0.40

ABREVIATURAS USADAS: K_G , velocidad de acumulación de proteínas; K_S , velocidad de síntesis proteica; K_D , velocidad de degradación de proteínas; C_S , capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA} , eficacia de síntesis proteica: $(K_S/C_S) \times 10$, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA} , g proteína sintetizada/día/g DNA: $(K_S/100) \times (\text{Prot./DNA})$; EPR, eficacia de retención de proteínas: $(K_G/K_S) \times 100$. C: dieta control, G: dietas a base de proteína de gluten (G-D: deficiente, G-L: + lisina libre, G-B: + lisina microencapsulada).

Los resultados son la media \pm SEM de 5 animales. $p < 0.05$.

b) Influencia de la forma de suplementación con lisina, de la proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del músculo blanco de la trucha.

Los resultados correspondientes a la influencia de la calidad de la suplementación sobre el recambio proteico y el contenido en ácidos nucleicos del músculo blanco de la trucha se relacionan en la Tabla 4.1.8. La velocidad específica de crecimiento muscular (K_G), o porcentaje de incremento de peso, al igual que se comentó para el hígado y en relación a los ensayos de conversión y utilización nutritiva del alimento, fue más baja para las truchas alimentadas con la dieta deficiente en lisina (G-D), que previamente demostró su peor calidad proteica (Tablas 4.1.1. y 4.1.2.).

La EPR fue mucho más elevada en músculo que en hígado y asociada a una menor K_S muscular, aunque para valores de K_G muy similares. La dieta control y las suplementadas con lisina, en forma encapsulada o libre (G-B y G-L), dieron valores de EPR significativamente mayores que los obtenidos con la dieta deficiente (G-D).

La velocidad fraccional de síntesis proteica (K_S) muscular (Tabla 4.1.6) fue significativamente más alta para las dietas que presentaron mayores K_G (control, G-B y G-L), correspondiendo los valores de K_S más bajos a la dieta deficiente (G-D), con una disminución del 16%. La velocidad de degradación (K_D) cambió en el mismo sentido que la velocidad de síntesis, siendo mayor para la dieta deficiente (G-D).

El menor contenido de ARN del músculo se relacionó directamente con una menor capacidad de síntesis (C_S), siendo los correspondientes valores significativamente más altos para las dietas control y G-B.

El contenido de ADN del músculo se alteró significativamente, con valores menores que en hígado y mayores para las dietas control y G-B. En la relación ARN/ADN sólo se encontraron diferencias significativas entre la dieta control y el resto de las dietas, que resultaron con valores más bajos.

c) Influencia de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad del complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC) de la trucha:

Se midieron las actividades proteásicas correspondientes al complejo multicatalítico de actividad proteasa (MPC): actividad tipo quimotripsina (CT-L: *chymotrypsin-like*) y la actividad hidrolítica de péptidos (PGPH: *peptidil-glutamyl-peptide hydrolyzing activity*) determinadas en hígado, músculo e intestino de trucha. Las citadas actividades proteásicas se relacionan en las Tablas 4.1.9 y 4.1.10. Los resultados ponen de manifiesto claras diferencias entre los tejidos, localizándose las mayores actividades, en el intestino, seguidas de las del hígado y músculo, que fueron las más bajas, independientemente de que las actividades se expresen en mU/mg de proteína o como U/g tejido.

TABLA 4.1.8: Influencia de la forma de suplementación con lisina, de la proteína de gluten de maíz, sobre el recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del músculo blanco de la trucha.

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-B
K _G	1.29 ^a ±0.02	0.86 ^b ±0.03	1.27 ^a ±0.03	1.27 ^a ±0.04
K _s	1.30 ^a ±0.01	1.09 ^b ±0.13	1.30 ^a ±0.04	1.29 ^a ±0.02
K _D	0.01 ^a ±0.00	0.23 ^b ±0.03	0.03 ^a ±0.01	0.02 ^a ±0.01
C _s	9.23 ^a ±1.38	7.13 ^b ±0.38	7.01 ^b ±0.10	8.12 ^{ab} ±0.21
K _{RNA}	1.41 ^b ±0.01	1.52 ^b ±0.18	1.86 ^a ±0.05	1.59 ^b ±0.02
K _{DNA}	17.66 ^a ±0.06	17.58 ^a ±2.03	18.26 ^a ±0.52	14.18 ^b ±0.21
EPR	99.24 ^a ±0.34	82.49 ^b ±9.47	97.74 ^a ±2.74	98.32 ^a ±1.43
[Proteína]	186.1 ^a ±7.5	154.7 ^b ±8.2	175.9 ^a ±9.2	173.6 ^a ±10.0
[ARN]	1.65 ^a ±0.04	1.10 ^c ±0.02	1.24 ^{bc} ±0.28	1.41 ^{ab} ±0.12
[ADN]	0.14 ^a ±0.01	0.11 ^b ±0.02	0.13 ^{ab} ±0.01	0.16 ^a ±0.01
Prot./ADN	1353 ^a ±139	1615 ^a ±474	1444 ^a ±155	1094 ^a ±107
ARN/ADN	12.12 ^a ±0.61	8.56 ^b ±0.34	9.14 ^b ±0.77	8.89 ^b ±0.24

ABREVIATURAS USADAS: K_G, velocidad de acumulación de proteínas; K_s, velocidad de síntesis proteica; K_D, velocidad de degradación de proteínas; C_s, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_s/C_s) x 10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA: (K_s/100) x (Prot./DNA); EPR, eficacia de retención de proteínas: (K_G/K_s) x 100. C: dieta control, G: dietas a base de proteína de gluten (G-D: deficiente, G-L: +lisina libre, G-B: +lisina microencapsulada).

Los resultados son la media ± SEM de 5 animales. p < 0.05.

Para la actividad PGPH (Tabla 4.1.9) en el hígado no se presentaron diferencias significativas, excepto para la dieta G-B, que fue algo menor al resto de las dietas. En el músculo, la mayor actividad se obtuvo para las dietas G-D y G-L, respecto a las dietas control y G-B. En el intestino, la mayor actividad se obtuvo para la dieta control con diferencias significativas en relación al resto de las dietas.

Para la actividad CT-L (Tabla 4.1.10) no se presentaron diferencias significativas en el hígado excepto, de nuevo, para la dieta G-B, que fue algo menor que el resto de las dietas. En el músculo, la mayor actividad se obtuvo para la dieta G-D. En intestino, la mayor actividad se obtuvo para la dieta control con diferencias significativas en relación al resto de las dietas.

Tabla 4.1.9: Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad PGPH en hígado, músculo e intestino de la trucha. [Sustrato=0.16 mM]

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-B
Hígado				
mU/mg prot.	57.57 ^a ±1.51	69.26 ^a ±1.76	56.95 ^a ±3.78	43.75 ^b ±2.10
U/g tejido	5.52 ^a ±0.15	5.88 ^a ±0.18	6.16 ^a ±0.31	4.23 ^b ±0.18
U/hígado	6.66 ^a ±0.69	3.40 ^c ±0.24	4.88 ^b ±0.36	3.33 ^c ±0.09
Músculo				
mU/mg prot.	21.82 ^c ±1.99	43.75 ^a ±4.19	32.09 ^b ±2.17	16.86 ^c ±1.19
U/g tejido	1.02 ^b ±0.08	1.38 ^a ±0.04	1.54 ^a ±0.12	0.73 ^c ±0.05
Intestino				
mU/mg prot.	3224.5 ^a ±248.9	1725.4 ^b ±163.8	1937.8 ^b ±156.0	1524.12 ^b ±112.6
U/g tejido	56.47 ^a ±3.07	45.77 ^a ±7.40	54.33 ^a ±1.98	46.92 ^a ±2.79

C: control; GB: dieta con encapsulado tipo B; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina.

a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$) Los valores son media ± ES de 5 animales.

Tabla 4.1.10: Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad CT-L en hígado, músculo e intestino de la trucha. [Sustrato=0.40 mM]

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-B
Hígado				
mU/mg prot.	47.90 ^a ±2.50	40.32 ^a ±1.75	42.01 ^a ±1.82	32.19 ^b ±3.02
U/g tejido	4.73 ^a ±0.20	3.58 ^b ±0.18	4.41 ^a ±0.13	3.32 ^b ±0.28
U/hígado	4.79 ^a ±0.17	1.94 ^c ±0.08	3.64 ^b ±0.33	2.96 ^b ±0.40
Músculo				
mU/mg prot.	17.00 ^a ±1.00	26.36 ^b ±2.77	17.84 ^a ±1.30	13.36 ^a ±0.41
U/g tejido	0.80 ^b ±0.03	0.95 ^a ±0.05	0.92 ^a ±0.04	0.58 ^c ±0.00
Intestino				
mU/mg prot.	128.21 ^a ±13.53	77.68 ^b ±10.32	72.11 ^b ±12.54	68.86 ^b ±5.29
U/g tejido	2.42 ^a ±0.25	1.59 ^b ±0.24	2.57 ^a ±0.32	1.17 ^b ±0.07

C: control; GB: dieta con encapsulado tipo B; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina.; a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$) Los valores son media ± ES de 5 animales.

OBJETIVO 2: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA EN DIETAS PARA CARPAS: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

4.2.1. EXPERIMENTO 1: UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ

Se diseñaron seis dietas experimentales compuestas a base de gluten de maíz suplementado con lisina, libre o encapsulada (Tabla 3.4) que fueron ofrecidas a los distintos lotes experimentales. Con el objetivo de valorar en la carpa su utilización nutritiva de dietas y las posibles diferencias que, sobre el crecimiento, pueda producir el que la lisina se suplemente libre o encapsulada, así como la influencia que, sobre la utilización de las dietas, pueda tener la temperatura. El perfil aminoacídico de las diferentes dietas se muestra en las tablas 3.8 (en g/100g AAT) y 3.9 (en g/100g dieta). En ellas se indican también diversos índices químicos de calidad proteica en función de la composición en aminoácidos. En todos los casos, los valores más altos correspondieron a la dieta control, seguida de las dietas que están suplementadas con lisina. La dieta deficiente presentó índices más bajos, aunque no significativos. El índice de aminoácidos esenciales (IAAE) se ha calculado tomando como referencia las necesidades de aminoácidos de la carpa (Nose, 1979), o la composición en aminoácidos del huevo de la trucha (Ketola, 1982). Los índices de aminoácidos esenciales calculados para la carpa fueron algo menores que para la trucha cuando se expresan como % de proteína y tomando como referencia las necesidades de aminoácidos ya que la carpa tiene unas necesidades cuantitativas algo mayores que la trucha cuando se expresan como % de la proteína de la dieta. En caso de calcular el IAAE como el % de aminoácidos de la dieta, en la carpa disminuye bastante su valor ya que la dieta de éstas tiene un 30 % de proteína mientras que en la de las truchas es del 45 %.

Efecto de la composición de la dieta y de la temperatura sobre la ingesta y el crecimiento.

En las tablas 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 y 4.1.4 se relacionan los resultados de ingesta, variación de peso e índices de utilización nutritiva de las diferentes dietas experimentales para carpas, ensayadas a dos temperaturas. Tanto para la ingesta como para el crecimiento e índices de conversión y retención proteica, la mayor temperatura ha tenido un efecto positivo. (Tablas 4.2.1. y 4.2.2. a 18°C, y 4.2.3 y 4.2.4 a 25°C)

a) Carpas mantenidas a 18°C:

La valoración del grado de aceptación de las diferentes dietas experimentales por parte de los animales, juzgada a partir de las cantidades respectivas ingeridas expresadas como ingesta total o como ingesta por 100 gramos de pez y día (Tablas 4.2.1.), muestran que las dietas suplementadas con lisina (G-L, G-C y G-A) no presentaron diferencias significativas respecto a la dieta control, presentando una significativamente menor aceptación la dieta

suplementada con el microencapsulado tipo B y la dieta deficiente.

El crecimiento inducido por el consumo de las dietas ensayadas, a lo largo del periodo experimental, puede expresarse de distintas forma (Tabla 4.2.1.) Tomando como referencia el respectivo peso medio inicial, el incremento porcentual de peso fue máximo para los lotes alimentados con las dietas control y las suplementadas G-A y G-C. Las dietas que suplementaban lisina tanto en forma libre como de encapsulado tipo B no mostraron diferencias significativas entre sí y fueron significativamente inferiores al grupo anterior (control, G-A y G-C). La dieta deficiente en lisina presentó el peor crecimiento de todas ellas.

La valoración del crecimiento mediante la tasa de crecimiento instantáneo (TCI) (Tabla 4.2.1.) presenta la misma tendencia que el porcentaje de incremento de peso.

Al relacionar los dos parámetros ya comentados, ingesta de dieta y ganancia de peso, por medio del índice de conversión (IC) (Tabla 4.2.1.) de nuevo, la dieta deficiente presentó los valores más bajos y la dieta control los más altos. En este caso, las dietas suplementadas con lisina presentaron diferencias significativas entre sí, siendo algo mayor para la dieta G-C que no llegó a presentar diferencias significativas con la dieta control. Las dietas G-A y G-B fueron significativamente mejores que las dietas G-L y G-D, siendo la G-D la que peor índice presentó de todas ellas.

Utilización nutritiva de la proteína de las dietas (CEC y VPP)

En la Tabla 4.2.2 se presentan los índices CEC y VPP así como algunos de los valores necesarios para su cálculo.

El análisis estadístico de las posibles diferencias en relación al índice CEC, demostró que, por unidad de proteína ingerida, las dietas control y las tres suplementadas con lisina encapsulada, fueron significativamente mayores que la dieta suplementada con lisina libre o la no suplementada.

El índice VPP, obtenido para la dieta control, presentó desde el punto de vista estadístico el valor más alto y para la dieta deficiente el peor. Las dietas suplementadas con lisina encapsulada, (G-A, G-B y G-C) presentaron valores intermedios y significativamente superiores al obtenido con la dieta suplementada con lisina libre y ésta, a su vez, significativamente superior al de la dieta deficiente, que presentó unos valores muy bajos para todos los índices examinados.

Resumiendo, la suplementación con lisina produjo mejores índices que la no suplementación, alcanzando valores cercanos a los la dieta control. Destacaron las dietas con lisina encapsulada tipo A y C, seguidas del microencapsulado tipo B, y todas ellas dieron mejores resultados que la dieta suplementada con lisina libre.

TABLA 4.2.1. Efecto de la composición de la dieta sobre la ingesta y crecimiento de carpas a 18°C.

	DIETAS					
	C	GA	GB	GC	GL	GD
P.medio inicial(g)	55.38 ^a ±0.58	55.17 ^a ±0.38	55.07 ^a ±0.44	54.49 ^a ±0.33	53.80 ^a ±0.74	53.37 ^a ±0.13
P.medio final(g)	74.21 ^a ±0.71*	70.50 ^a ±1.90*	66.99 ^b ±0.95*	72.66 ^a ±1.54	65.01 ^b ±0.77*	56.40 ^c ±0.04
TCI ¹	0.36 ^a ±0.00*	0.30 ^a ±0.03*	0.24 ^b ±0.01*	0.35 ^a ±0.03	0.23 ^b ±0.00*	0.07 ^c ±0.00*
P. inicial(g)	1661 ^a ±17	1655 ^a ±11	1652 ^a ±13	1635 ^a ±10	1614 ^a ±22	1601 ^a ±4
P. final(g)	2227 ^a ±21*	2115 ^a ±57*	2010 ^b ±19*	2180 ^a ±46	1950 ^b ±23*	1692 ^c ±1
ΔPeso (%)	34.01 ^a ±0.24*	27.77 ^{ab} ±2.94*	21.66 ^b ±1.37*	33.38 ^a ±3.42*	20.84 ^b ±0.26*	5.69 ^c ±0.33*
Ing. total (g)	1077 ^{ab} ±10*	1171 ^a ±49*	875 ^b ±44*	1128 ^a ±61*	1052 ^a ±9*	703 ^c ±12*
Ing.(g/100g/d)	0.68 ^a ±0.01	0.76 ^a ±0.06	0.58 ^b ±0.03	0.72 ^a ±0.03	0.72 ^a ±0.01*	0.52 ^b ±0.01
Ing.Prot.(g/100g/d)	0.19 ^a ±0.00*	0.21 ^a ±0.02*	0.16 ^b ±0.01*	0.20 ^a ±0.01*	0.20 ^a ±0.01*	0.14 ^b ±0.00*
IEA ¹	0.52 ^a ±0.01*	0.39 ^b ±0.03*	0.41 ^b ±0.01	0.48 ^a ±0.03	0.32 ^c ±0.00*	0.13 ^d ±0.01*

¹ TCI: $(\ln Pf - \ln Po)/d \cdot 100$; IEA: $\Delta P/Ing.$ C: control; GA, GB, GC: dietas + tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. Los resultados son media ±ES de 3 lotes experimentales. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$), * diferencias significativas entre la dieta a 18°C y 25°C.

TABLA 4.2.2. Influencia de la dieta sobre la utilización nutritiva de la proteína por la carpa a 18°C.

	DIETAS					
	C	GA	GB	GC	GL	GD
Ing.Prot.Total (g)	298.8 ^a ±2.8*	322.0 ^a ±30.1*	237.0 ^b ±12.0*	307.7 ^a ±16.7*	287.5 ^a ±2.5*	193.5 ^b ±3.4*
N ingerido(g)	47.80 ^a ±0.45	51.53 ^a ±4.81	37.92 ^b ±1.91	49.24 ^a ±2.68	46.01 ^a ±0.39	30.96 ^b ±0.55
N corp.inicial (g)	35.01 ^a ±0.36	34.87 ^a ±0.24	34.81 ^a ±0.28	34.45 ^a ±0.21	34.01 ^a ±0.47	33.74 ^a ±0.08
N corp.final (g)	49.80 ^a ±0.47	45.75 ^a ±1.23	43.25 ^b ±0.42	46.32 ^a ±0.98	42.66 ^b ±0.50	35.33 ^c ±0.02
CEC ¹	1.89 ^a ±0.03*	1.43 ^a ±0.09*	1.51 ^a ±0.05	1.77 ^a ±0.11	0.83 ^b ±0.33*	0.47 ^b ±0.03*
VPP ¹	30.95 ^a ±0.47*	21.13 ^{bc} ±1.26*	22.25 ^b ±0.61	24.06 ^b ±1.49	18.80 ^c ±0.06*	5.15 ^d ±0.37*

¹CEC: $(\Delta peso/g \text{ prot ing.})$; VPP: $(\% N \text{ retenido del ingerido})$; C: control; GA,GB,GC: dietas + tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. Los resultados son media ±ES de e lotes experimentales. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

b) Carpas mantenidas a 25°C:

El grado de aceptación de las diferentes dietas experimentales fue valorado a partir de las cantidades ingeridas, expresadas como ingesta total o como ingesta por 100 gramos de pez y día (Tablas 4.2.3.). Para ambas expresiones, la dieta control presentó los valores más altos y la dieta deficiente los más bajos, en términos estadísticos. La ingesta total de dieta G-A presentó el valor más alto de las dietas suplementadas, que no fueron significativamente diferentes entre ellas. Cuando la ingesta se expresa en g/100 g pez/día destacaron, entre las suplementadas, las dietas G-A y G-B que fueron mejor aceptadas que la G-B y que la suplementada con lisina libre.

El crecimiento inducido por el consumo de las diferentes dietas ensayadas, a lo largo del periodo experimental se expresa en la Tabla 4.2.3. El porcentaje de incremento de peso presentó la misma dinámica que la ingesta, mayor para la dieta control y menor para la deficiente, cuando se comparan estadísticamente con el resto de las dietas. Entre las suplementadas destacó la dieta G-A que no presentó diferencias significativas respecto a los otros dos tipos de encapsulado; sin embargo, si resultó significativamente diferente de la dieta suplementada con lisina libre. La valoración del crecimiento, mediante la tasa de crecimiento instantáneo (TCI) (Tabla 4.2.3.), presentó la misma tendencia que el porcentaje de incremento de peso.

Al relacionar los dos parámetros, ingesta y ganancia de peso, por medio del Índice de Eficacia Alimentaria (IEA) (Tabla 4.2.3.), de nuevo, la dieta deficiente presentó los resultados más bajos, y la dieta control los más altos desde el punto de vista estadístico. Las dietas suplementadas con lisina encapsulada no presentaron diferencias significativas entre sí, siendo algo mayor el IEA obtenido con la dieta G-A. Las otras dos dietas suplementadas con lisina encapsulada (G-B y G-C) no presentaron diferencias significativas respecto a la dieta G-L.

Utilización nutritiva de la proteína de las dietas (VPP y CEC)

En la Tabla 4.2.4 se presentan los índices de retención y utilización proteica para crecimiento (VPP y CEC) así como algunos de los valores usados para su cálculo.

El análisis estadístico de las posibles diferencias nos muestra, en cuanto al índice CEC, que, por unidad de proteína ingerida, sigue la misma tendencia que hemos observado en el crecimiento, siendo mejor este índice para la dieta control, muy cercana a las tres suplementadas con lisina encapsulada aunque significativamente mayor. Dentro de las encapsuladas destacó la dieta G-A, mientras que las otras dos (G-B y B-C) no presentaron

diferencias significativas con la dieta suplementada con lisina libre. La dieta deficiente siempre presentó los peores índices, con diferencias significativas respecto al resto de las dietas.

TABLA 4.2.3. Efecto de la composición de las dietas sobre la ingesta y crecimiento de carpas a 25°C.

	DIETAS					
	C	GA	GB	GC	GL	GD
P.medio inicial(g)	55.98 ^a ±0.92	54.76 ^a ±0.25	54.20 ^a ±0.47	53.20 ^a ±0.50	54.13 ^a ±0.10	51.12 ^b ±0.11
P.medio final(g)	102.43 ^a ±0.78	83.38 ^b ±4.04	77.04 ^{bc} ±1.74	77.87 ^{bc} ±1.13	74.08 ^c ±0.33	59.80 ^d ±0.02
TCI ¹	0.66 ^a ±0.02	0.43 ^b ±0.05	0.36 ^{bc} ±0.02	0.39 ^{bc} ±0.02	0.32 ^c ±0.00	0.16 ^d ±0.00
P. inicial(g)	1619 ^a ±27	1643 ^a ±7	1626 ^a ±14	1561 ^b ±29	1624 ^a ±3	1533 ^b ±3
P. final(g)	3073 ^a ±23	2501 ^b ±60	2311 ^c ±52	2284 ^c ±34	2222 ^c ±10	1794 ^d ±1
Δ Peso (%)	89.86 ^a ±3.03	52.27 ^b ±7.29	42.10 ^{bc} ±2.13	46.45 ^{bc} ±3.50	36.84 ^c ±0.49	16.99 ^d ±0.28
Ing. total (g)	2191 ^a ±39	1827 ^b ±59	1586 ^c ±32	1621 ^c ±42	1511 ^c ±23	1104 ^d ±3
Ing. (g/100g/d)	0.72 ^a ±0.01	0.65 ^b ±0.03	0.59 ^c ±0.01	0.62 ^{bc} ±0.02	0.57 ^c ±0.01	0.47 ^d ±0.00
Ing.Prot. (g/100g/d)	0.27 ^a ±0.00	0.25 ^b ±0.01	0.22 ^c ±0.00	0.24 ^{bc} ±0.01	0.22 ^c ±0.00	0.19 ^d ±0.00
IEA ¹	0.66 ^a ±0.01	0.47 ^b ±0.04	0.43 ^{bc} ±0.02	0.45 ^{bc} ±0.02	0.39 ^c ±0.00	0.24 ^d ±0.00

¹ TCI: $(\ln Pf - \ln Pi) / d \cdot 100$; IEA: $\Delta P / Ing.$ C: control; GA, GB, GC: dietas + tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. Los resultados son media ±ES de 3 lotes experimentales. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

TABLA 4.2.4. Influencia de la dieta sobre la utilización nutritiva de la proteína por la carpa a 25°C.

	DIETAS					
	C	GA	GB	GC	GL	GD
Ing.P. Total (g)	607.9 ^a ±10.8	502.5 ^b ±31.8	429.3 ^c ±8.7	442.1 ^c ±11.5	412.7 ^c ±6.2	303.8 ^d ±0.7
N ingerido(g)	97.27 ^a ±1.73	80.41 ^b ±5.09	68.70 ^c ±1.37	70.74 ^c ±1.84	66.03 ^c ±0.99	47.99 ^d ±0.64
N corp.inicial (g)	34.12 ^a ±0.58	34.61 ^a ±0.16	34.26 ^a ±0.30	32.89 ^a ±0.61	34.22 ^a ±0.06	30.01 ^a ±2.30
N corp.final (g)	68.74 ^a ±0.52	54.11 ^b ±2.65	49.73 ^{bc} ±1.12	48.53 ^{bc} ±0.73	48.61 ^c ±0.22	35.16 ^d ±2.30
CEC ¹	2.39 ^a ±0.03	1.69 ^b ±0.13	1.59 ^{bc} ±0.07	1.63 ^{bc} ±0.06	0.45 ^c ±0.01	0.86 ^d ±0.01
VPP ¹	35.59 ^a ±0.44	25.47 ^b ±1.02	22.50 ^c ±0.97	22.08 ^c ±0.75	21.79 ^c ±0.17	10.58 ^d ±0.14

¹CEC: $(\Delta \text{peso} / g \text{ prot ing.})$; VPP: $(\% \text{ N retenido del ingerido})$; C: control; GA,GB,GC: dietas + tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. Los resultados son media ±ES de e lotes experimentales. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

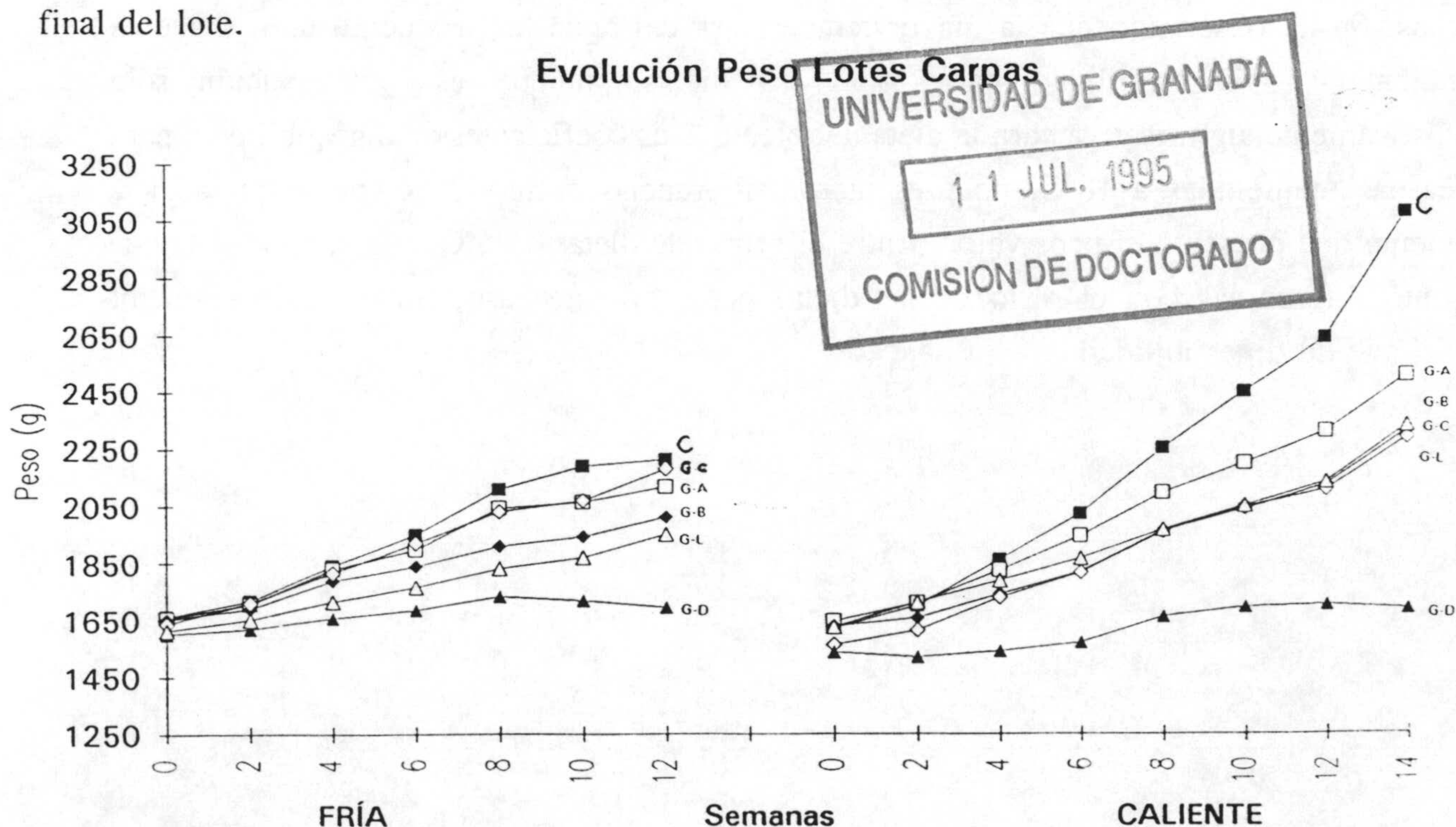
Los valores para el índice VPP reprodujeron las mismas diferencias estadísticas comentadas para el CEC.

En resumen, la suplementación de lisina produjo mejores índices que la no suplementación, estando muy cerca de los valores de la dieta control. Destacó la dieta suplementada con lisina encapsulada tipo A, seguida de las de tipo B y C, todas ellas fueron mejores a la dieta suplementada con lisina libre que generalmente no presentó diferencias significativas con las que coonstruían encapsulados B o C.

Diferencias de cada dieta respecto a la temperatura:

Se ha analizado estadísticamente las diferencias que se han producido en el crecimiento y utilización nutritiva por influencia de la temperatura. Hubo diferencias significativas entre los animales alimentados con una misma dieta y mantenidos a 18°C o 25°C, exceptuando los siguientes casos:

- Para la dieta control: respecto a la ingesta expresada en g/100 g de pez/día.
- Para la dieta G-A: respecto a la ingesta expresada en g/100 g de pez/día.
- Para la dieta G-B: respecto a la ingesta (en g/100 g de pez/día.), IC, CEC y VPP.
- Para la dieta G-C: respecto al peso medio o del lote final,, TCI, ingesta (en g/100 g de pez/día.), IC, CEC y VPP.
- Para la dieta G-D: respecto a la ingesta (en g/100 g de pez/día.), peso medio individual y final del lote.



Efecto de la composición de la dieta sobre la composición corporal de la carpa:

Los valores de composición corporal, de carpas mantenidas a ambas temperaturas, se relacionan en la tabla 4.2.5.

En las carpas mantenidas a 18°C, en ningún caso se presentaron diferencias significativas entre dietas.

En las carpas mantenidas a 25°C, aunque presentaron una composición corporal muy aproximada, hubo pequeñas diferencias entre dietas. Con respecto al contenido en agua las dietas deficiente y suplementada con lisina libre fueron menores al resto de las dietas. En minerales totales sólo la dieta deficiente presentó una concentración más alta. El porcentaje de grasa fue significativamente inferior en la control al resto de las dietas y el porcentaje proteico las dietas G-D y G-C fueron significativamente menores al resto.

4.1.2. EXPERIMENTO 2: RESULTADOS EN LA UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE LA PROTEÍNA

En la Tabla 4.2.6 se relacionan los valores obtenidos para el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la proteína en carpas mantenidas a dos temperaturas (18 °C y 25 °C), calculado a partir de los contenidos de proteína y cromo, como marcador inerte, en dieta y heces. Se ha observado que la mayor temperatura del agua ha producido unos mayores coeficientes de digestibilidad para todas las dietas, aunque esta observación sólo estadísticamente significativa para la dieta deficiente. Los coeficientes de digestibilidad, para las carpas mantenidas a 18°C, no presentaron diferencias entre sí, excepto para la dieta deficiente que presentó el peor valor. Entre el grupo de dietas a 25°C, fue la control la que presentó diferencias con el resto de las dietas pero, en este caso, presentando el mejor coeficiente de digestibilidad.

TABLA 4.2.5. Efecto de la composición de las dietas sobre la composición corporal de las carpas (% s/sf).

Dieta	%Humedad	%Proteína	%Grasa	%Cenizas
Inicial	73.02 ^a ± 0.54	13.17 ^a ± 0.07	11.50 ^a ± 0.30	2.28 ^a ± 0.07
Control/F	70.72 ^a ± 0.53	13.98 ^a ± 0.19	13.03 ^a ± 0.48*	2.62 ^a ± 0.07
GA/F	68.71 ^a ± 0.49	13.52 ^a ± 0.25	15.08 ^a ± 0.61	2.49 ^a ± 0.09
GB/F	69.01 ^a ± 0.67	13.45 ^a ± 0.39	14.51 ^a ± 0.53	2.61 ^a ± 0.07
GC/F	68.80 ^a ± 0.66	13.28 ^a ± 0.13	14.96 ^a ± 0.64	2.53 ^a ± 0.06
GL/F	69.98 ^a ± 0.46	13.67 ^a ± 0.12	13.28 ^a ± 0.48	2.73 ^a ± 0.05
GD/F	69.29 ^a ± 0.82	13.05 ^a ± 0.38	14.22 ^a ± 0.76	2.78 ^a ± 0.10
Control/C	71.93 ^a ± 0.38	13.80 ^a ± 0.11	10.96 ^b ± 0.47	2.59 ^a ± 0.04
GA/C	69.76 ^a ± 0.48	13.24 ^a ± 0.07	13.55 ^a ± 0.49	2.59 ^a ± 0.03
GB/C	70.16 ^a ± 0.59	13.15 ^a ± 0.25	13.35 ^a ± 0.57	2.64 ^a ± 0.04
GC/C	70.51 ^a ± 0.49	12.94 ^b ± 0.19	13.11 ^a ± 0.47	2.50 ^a ± 0.04
GL/C	69.86 ^b ± 0.57	13.36 ^a ± 0.12	13.16 ^a ± 0.68	2.69 ^a ± 0.05
GD/C	69.27 ^b ± 0.66	13.02 ^b ± 0.27	13.79 ^a ± 0.79	2.92 ^b ± 0.08

C: control; GA,GB,GC: dietas con encapsulados tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina.
a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, p < 0.05)

TABLA 4.2.6. Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA) y Valor Biológico de la proteína de las dietas en los ensayos con carpas. Influencia de la temperatura.

	Control	GA	GB	GC	GL	GD
CDA Prot/F	87.75 ^a ± 0.81	87.50 ^a ± 1.23	87.74 ^a ± 0.87	87.58 ^a ± 2.39	84.22 ^a ± 1.84	74.53 ^b ± 1.51
CDA Prot/C	92.87 ^b ± 0.31	90.71 ^a ± 0.24	90.40 ^a ± 1.36	90.09 ^a ± 0.42	89.50 ^a ± 0.24	88.67 ^a ± 0.42
CDA dieta/F	80.69 ^a ± 2.10	63.26 ^a ± 1.33	82.33 ^a ± 0.22	82.46 ^a ± 5.17	77.26 ^a ± 2.99	70.08 ^b ± 3.91
CDA dieta/C	87.01 ^b ± 0.83	76.26 ^a ± 7.02	73.65 ^a ± 5.34	82.98 ^a ± 0.31	82.09 ^a ± 0.92	79.27 ^a ± 0.40
VBA/F	35.30 ^a ± 0.41	24.10 ^a ± 0.63	25.40 ^a ± 0.47	27.50 ^a ± 1.39	22.32 ^a ± 0.84	6.90 ^b ± 0.51
VBA/C	38.30 ^b ± 0.11	28.10 ^a ± 0.14	24.90 ^a ± 0.36	24.50 ^a ± 0.12	24.30 ^a ± 0.14	11.90 ^a ± 0.12

C: control; GA,GB,GC: dietas con encapsulados tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina.
a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, p < 0.05)

4.2.3. EXPERIMENTO 3: RESULTADOS EN LA DINÁMICA POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA DE CARPA:

Los niveles de lisina (Lys), aminoácidos esenciales (AAE) y totales (AAT) libres en plasma de las muestras tomadas a distintos tiempos después de la ingestión de la dieta correspondiente (hora cero) se localizan en la Tabla 4.2.7 o Figuras 4.2.3.a, b y c.

La diferente temperatura a la que se mantuvieron los animales, 18°C y 25°C, ha producido cambios en la dinámica postprandial de los aminoácidos en plasma. En este sentido, la mayor temperatura produjo una más rápida aparición postprandial de concentraciones máximas de aminoácidos en plasma.

La evolución de la suma de concentraciones de AAE en plasma de carpas mantenidas a 18°C, se inicia con una subida, a partir de la media hora de la ingesta de alimento, con valores máximos entre las 4 y 6 horas y bajadas posteriores progresivas hasta las 24 horas. En carpas mantenidas a 25°C, la suma de AAE crece más rápidamente, con máximos entre las 2 y 4 horas y bajando posteriormente hasta las 24 horas. La misma dinámica presentaron los AAT para ambas temperaturas.

Los niveles de Lys comenzaron a subir a partir de los 30 minutos de la ingesta de alimento, presentando unos máximos de concentración a distintas horas dependiendo del tipo de dieta y de la temperatura.

Los máximos de concentración de lisina en plasma, tras la ingestión de las distintas dietas, se obtuvieron en torno a las siguientes horas:

A 18°C:

- Control: entre las 2, 4 y 6 horas (lisina proveniente de la proteína de la dieta).
- Deficiente en lisina (G-D): presentó niveles de lisina bajos en todo momento.
- Suplementada con lisina encapsulada tipo A (G-A): 2 horas (más alto que la control).
- Suplementada con lisina encapsulada tipo B (G-B): entre las 2, 4 y 6 horas.
- Suplementada con lisina encapsulada tipo C (G-C): 2 horas (más alto que la control).
- Suplementada con lisina libre (G-L): 1 hora.

A 25°C:

- Control: entre las 1 y 2 horas (lisina proveniente de la proteína de la dieta).
- Deficiente en lisina (G-D): presentó niveles de lisina bajos en todo momento, con una pequeña subida a la hora.
- Suplementada con lisina encapsulada tipo A (G-A): 1 hora (más alto que la control), siendo aún altos a las 2 horas .
- Suplementada con lisina encapsulada tipo B (G-B): a los 30 minutos (un pico pequeño y a

las 2 horas.

-Suplementada con lisina encapsulada tipo C (G-C): a los 30 minutos (más alto que la control y que las dietas G-A y G-B).

-Suplementada con lisina libre (G-L): a los 30 minutos (más alto que la control y que las dietas G-A y G-B).

A las 24 horas, los niveles de aminoácidos alcanzaron valores basales en todos los casos. Hubo una pequeña subida a las 12 horas, coincidiendo con el apagado de la luz de los acuarios.

Actividad GDH medida en carpas: Influencia de la temperatura

Los valores obtenidos, al medir la actividad GDH en el hígado de las carpas a las dos temperaturas de experimentación, se detallan en la Tabla 4.2. Al expresar la actividad en mU/mg de proteína, la dieta deficiente presentó una significativa menor actividad en los animales a 18°C. A la temperatura de 25°C se observó un aumento significativo de actividad para las dietas G-B y G-L. A 25°C la mayor actividad se obtuvo para la dieta G-C, pero sin llegar a establecer diferencias significativas con las dietas (C y G-A) de mejor calidad proteica para crecimiento.

TABLA 4.2.8. Influencia de la dieta sobre la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) hepática de las carpas: Efecto de la temperatura.

Dieta	mU/mg Prot.	U/g Hígado	U/tej.total
Control/F	297.58 ^a ±15.13	25.89 ^{bc} ±2.25	64.03 ^{bc} ±4.92*
GA/F	278.68 ^{ab} ±17.44	25.84 ^{bc} ±2.04	55.54 ^{cd} ±3.49
GB/F	294.84 ^a ±12.79*	30.40 ^{ab} ±1.38*	50.35 ^{de} ±2.37
GC/F	311.71 ^a ±2.62	32.97 ^a ±0.73	76.42 ^a ±3.84*
GL/F	313.11 ^a ±22.10*	31.65 ^{ab} ±2.51*	71.55 ^{ab} ±3.17*
GD/F	244.21 ^b ±4.24	23.96 ^c ±0.56	42.34 ^c ±2.84*
Control/C	263.01 ^{ab} ±13.09	25.87 ^{ab} ±1.43	51.90 ^b ±2.06
GA/C	258.09 ^{ab} ±20.75	25.55 ^{ab} ±2.17	45.92 ^{bc} ±3.26
GB/C	208.95 ^b ±8.22	19.90 ^b ±0.78	41.59 ^{cd} ±2.96
GC/C	294.12 ^a ±15.28	29.80 ^a ±1.65	58.83 ^a ±2.93
GL/C	223.43 ^b ±14.08	19.39 ^b ±1.84	35.05 ^{de} ±0.62
GD/C	235.39 ^b ±12.38	22.79 ^b ±1.83	31.03 ^c ±1.38

C: control; GA,GB,GC: dietas con encapsulados tipo A,B,C; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina.

a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, p<0.05)

Tabla 4.2.7. Concentraciones plasmáticas (en $\mu\text{moles}/100\text{ ml}$) de Lys, AAE y AAT en carpa: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina), y de la temperatura. Los valores son media de 5 animales.

		HORAS									
		0	0,5	1	2	4	6	8	10	12	24
[Lys] a 25°C											
Control		7,47	15,13	<u>15,49</u>	<u>18,98</u>	11,36	8,82	11,33	7,16	14,03	11,56
G-A		9,81	14,08	<u>21,27</u>	<u>15,77</u>	12,06	12,16	9,01	12,63	12,86	7,02
G-B		8,40	<u>12,67</u>	<u>11,97</u>	<u>15,91</u>	14,30	8,62	9,33	11,70	12,28	8,38
G-C		13,70	<u>29,26</u>	10,62	13,61	10,82	15,64	9,58	10,76	9,66	6,66
G-L		9,58	<u>30,07</u>	16,03	12,57	12,58	14,99	6,77	12,46	11,93	7,69
G-D		2,21	4,54	<u>7,11</u>	3,87	<u>3,78</u>	4,20	3,13	2,83	3,82	3,25
[Lys] a 18°C											
Control		8,47	10,76	11,03	<u>15,11</u>	<u>16,11</u>	<u>14,28</u>	10,30	9,82	10,76	8,31
G-A		12,00	19,90	17,01	<u>24,05</u>	<u>17,19</u>	14,32	11,21	14,91	16,30	6,70
G-B		14,44	15,18	16,66	<u>20,25</u>	<u>20,94</u>	<u>17,79</u>	12,87	11,94	14,02	12,25
G-C		12,93	15,29	21,78	<u>28,26</u>	<u>18,61</u>	13,25	13,35	10,93	9,91	11,27
G-L		8,29	16,02	<u>21,98</u>	<u>17,36</u>	13,15	15,75	8,68	12,38	15,39	8,12
G-D		4,96	2,65	3,69	3,42	3,24	3,66	3,92	3,56	3,62	3,39
[AAE] a 25°C											
Control		46,84	76,42	75,79	<u>112,90</u>	<u>102,60</u>	73,04	56,03	57,36	74,43	47,77
G-A		45,28	65,38	<u>67,99</u>	<u>65,20</u>	<u>65,76</u>	<u>67,59</u>	54,76	62,88	71,43	34,20
G-B		41,57	48,72	48,08	<u>64,81</u>	<u>63,19</u>	51,05	49,08	48,53	47,53	29,83
G-C		46,13	54,77	55,66	<u>68,28</u>	<u>72,43</u>	<u>76,57</u>	49,31	56,91	47,38	26,34
G-L		45,06	67,86	62,27	<u>76,63</u>	<u>70,30</u>	68,25	65,51	54,74	49,05	37,51
G-D		33,40	46,64	<u>68,23</u>	<u>71,93</u>	<u>68,62</u>	63,46	61,92	44,27	34,74	28,81
[AAE] a 18°C											
Control		50,28	59,09	56,61	66,24	<u>87,44</u>	<u>84,60</u>	<u>82,24</u>	65,53	78,66	46,57
G-A		45,76	64,96	52,69	<u>75,64</u>	<u>67,64</u>	<u>78,52</u>	<u>66,78</u>	60,32	62,93	39,83
G-B		35,92	46,08	54,04	<u>58,19</u>	<u>60,21</u>	<u>58,05</u>	50,80	51,56	54,53	46,81
G-C		43,05	43,10	76,27	73,61	<u>84,13</u>	73,41	52,72	53,88	34,93	48,75
G-L		38,29	53,24	59,27	62,12	<u>66,90</u>	<u>68,92</u>	61,33	52,63	61,25	39,77
G-D		64,77	48,75	45,65	48,61	53,57	<u>64,66</u>	48,70	49,10	49,50	36,21
[AAT] a 25°C											
Control		176,87	246,38	214,05	<u>286,97</u>	<u>251,60</u>	<u>251,10</u>	187,46	211,53	291,54	168,07
G-A		246,30	272,75	279,71	244,61	<u>276,70</u>	<u>324,80</u>	245,42	281,15	298,38	239,38
G-B		235,59	222,23	203,38	<u>254,18</u>	<u>287,71</u>	214,30	193,82	200,00	178,84	138,16
G-C		127,81	219,25	197,83	<u>271,38</u>	<u>252,69</u>	232,17	202,10	260,14	219,55	112,25
G-L		257,65	283,89	257,98	<u>290,10</u>	<u>304,46</u>	273,22	291,06	246,93	215,21	207,17
G-D		243,79	289,82	322,77	346,97	<u>365,95</u>	<u>373,40</u>	284,62	270,17	201,34	152,38
[AAT] a 18°C											
Control		164,95	156,21	145,36	163,35	<u>212,88</u>	<u>230,01</u>	<u>210,21</u>	190,84	244,99	160,81
G-A		183,33	235,85	154,25	<u>204,21</u>	<u>200,43</u>	<u>240,15</u>	<u>201,60</u>	174,18	195,38	158,81
G-B		112,85	134,74	155,75	170,90	<u>189,28</u>	172,61	165,23	165,04	171,82	133,38
G-C		158,39	153,68	264,15	<u>289,30</u>	<u>314,45</u>	<u>227,93</u>	173,74	148,68	163,86	184,61
G-L		121,58	188,36	207,00	189,86	<u>235,65</u>	<u>257,46</u>	204,34	170,57	228,25	123,85
G-D		225,39	176,34	159,07	200,99	<u>247,30</u>	<u>234,46</u>	221,47	209,24	237,01	167,14

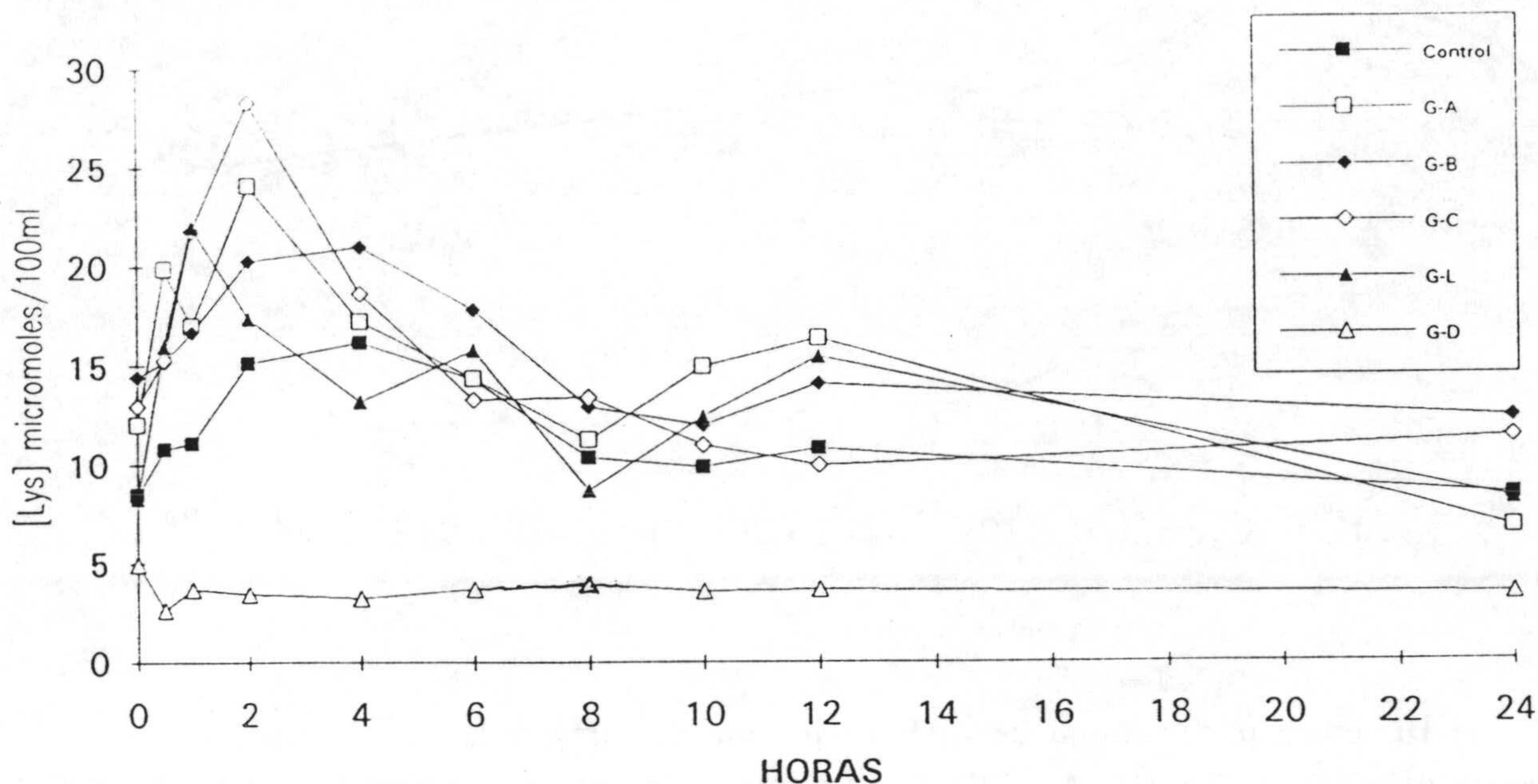


Figura 4.2.3 a: Dinámica postprandial de Lys en plasma de carpa a 18°C: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina; Control). Los valores son media de 5 animales.

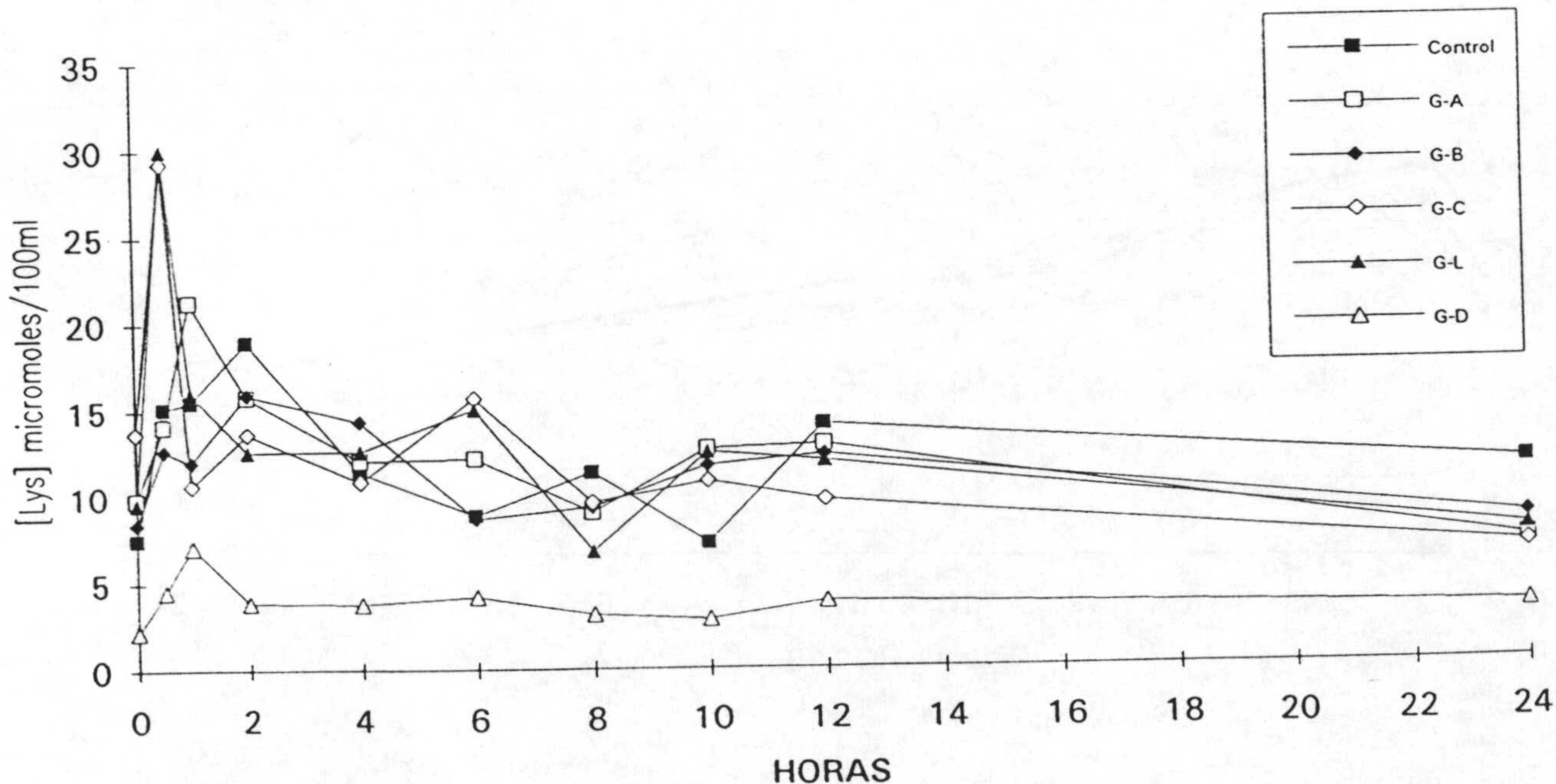


Figura 4.2.3 b: Dinámica postprandial de Lys en plasma de carpa a 25°C: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina; Control). Los valores son media de 5 animales.

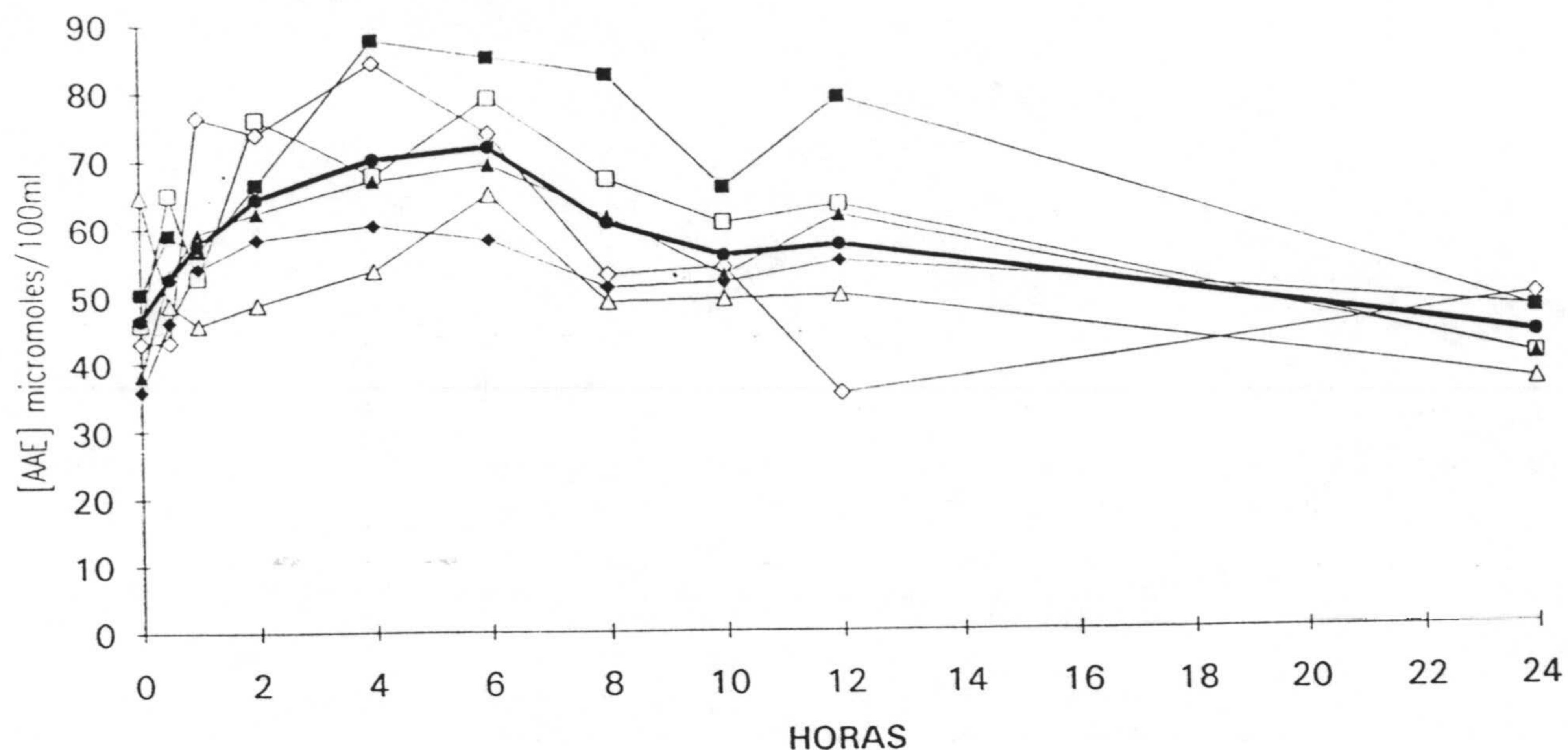


Figura 4.2.3 c: Dinámica postprandial de AAE en plasma de carpa a 18°C: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina; Control). Los valores son media de 5 animales.

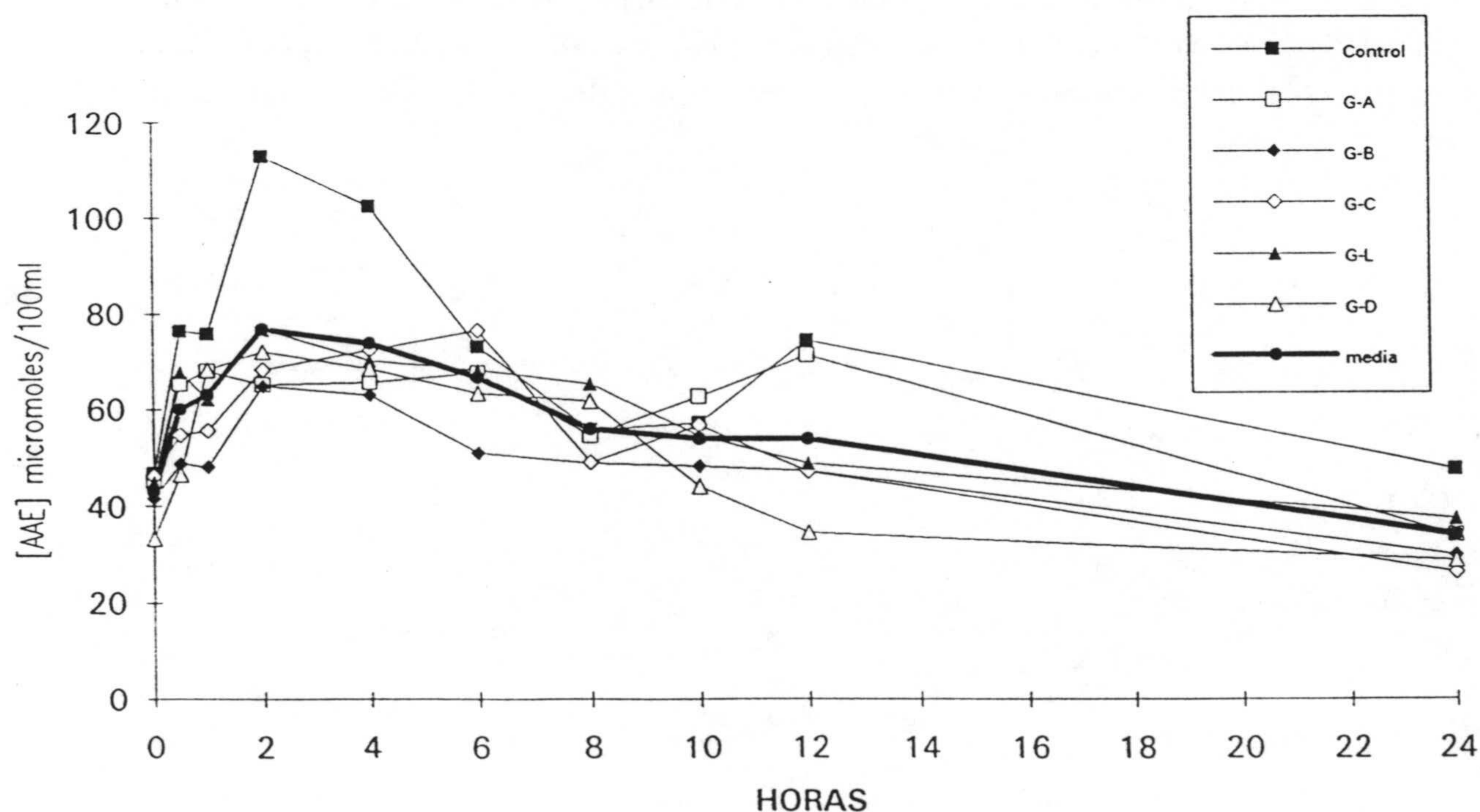


Figura 4.2.3 d: Dinámica postprandial de AAE en plasma de carpa a 25°C: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina; Control). Los valores son media de 5 animales.

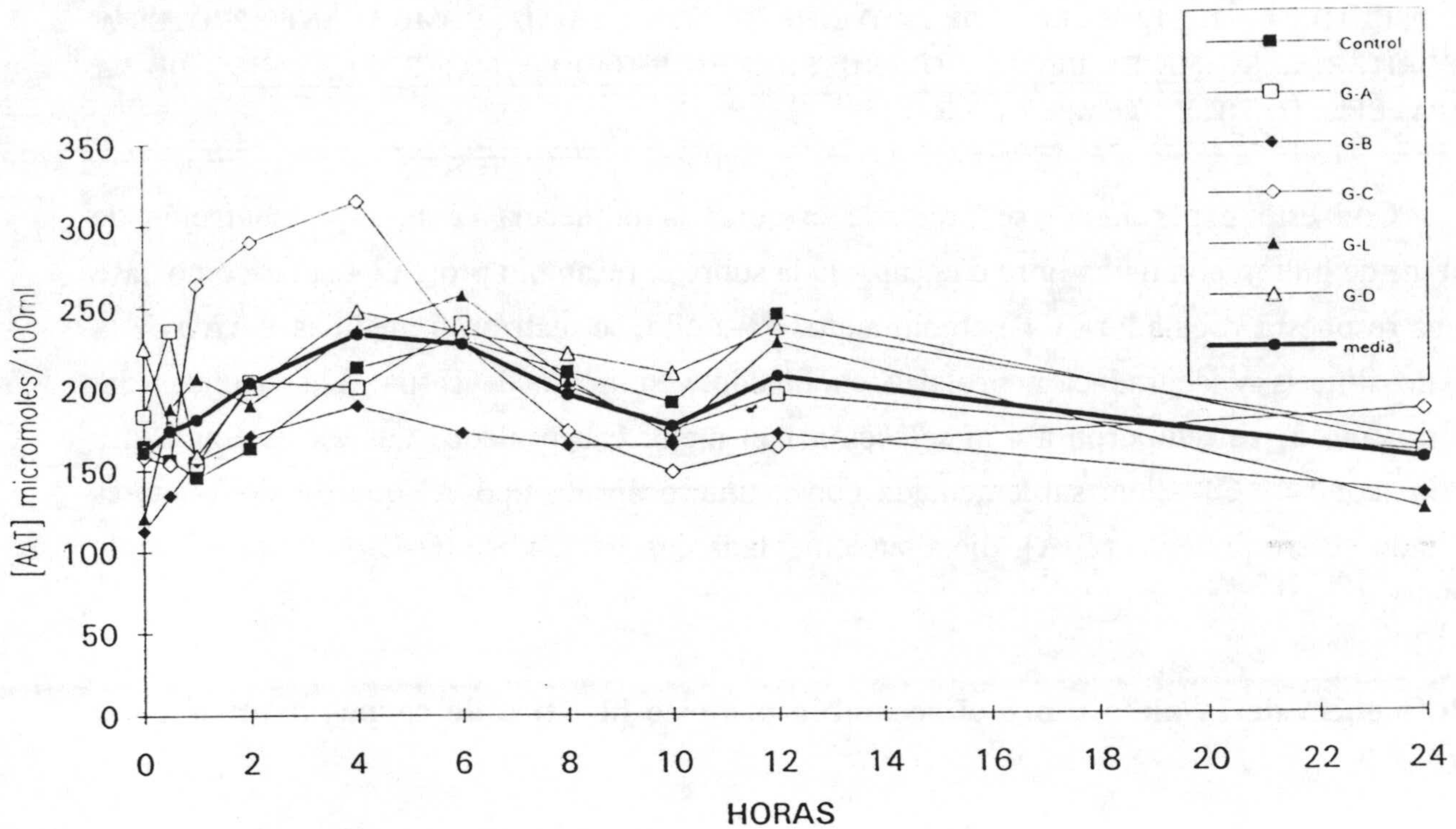


Figura 4.2.3 e: Dinámica postprandial de AAT en plasma de carpa a 18°C: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina; Control). Los valores son media de 5 animales.

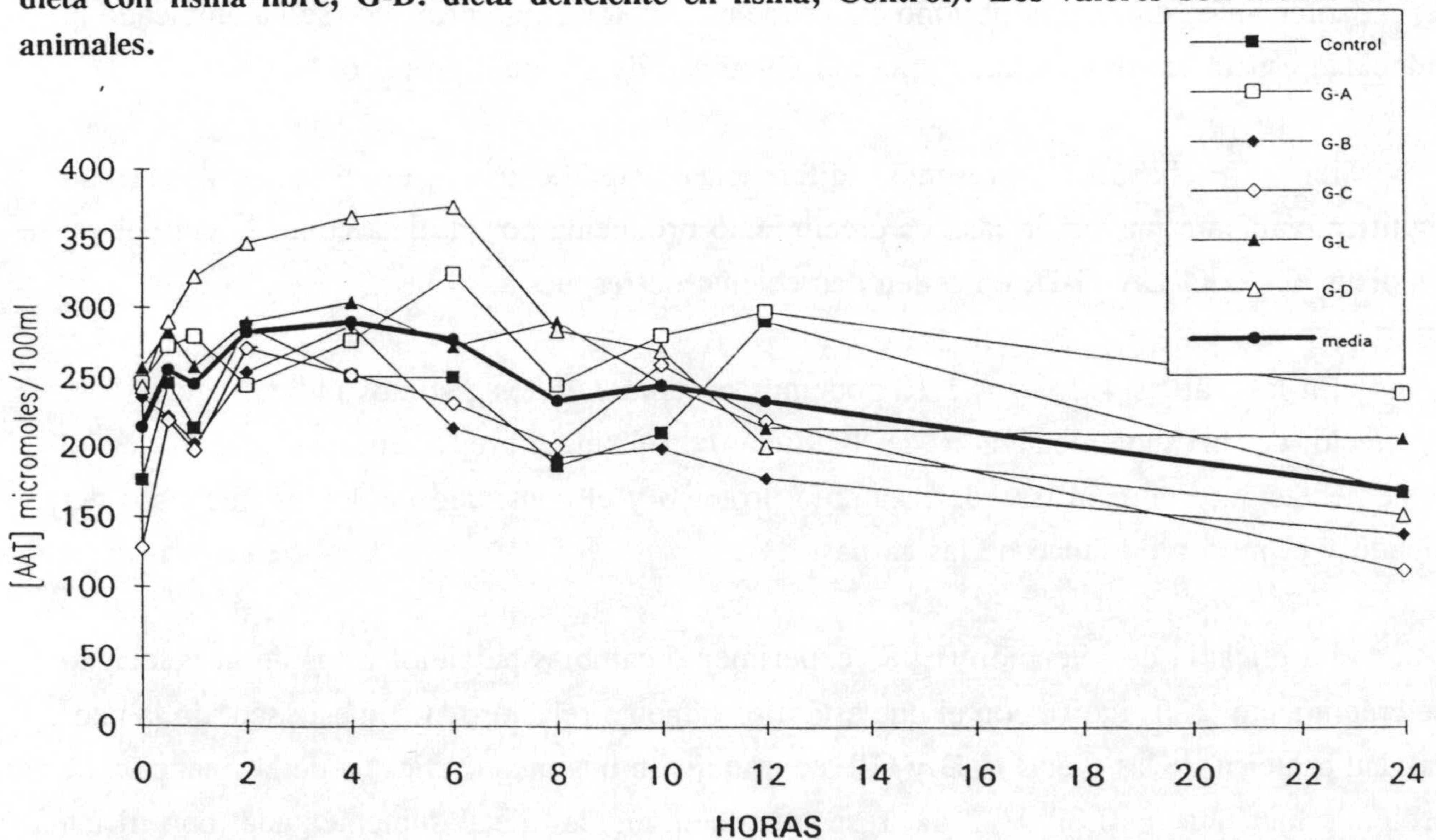


Figura 4.2.3 f: Dinámica postprandial de AAT en plasma de carpa a 25°C: Influencia de la forma de encapsulación con lisina (G-A, G-B y G-C: dietas con encapsulados tipos A, B, C; G-L: dieta con lisina libre; G-D: dieta deficiente en lisina; Control). Los valores son media de 5 animales.

4.2.4. EXPERIMENTO 4: INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA DE DIETAS A BASE DE PROTEÍNA GLUTEN DE MAÍZ, COMO FUENTE PROTEICA MAYORITARIA, SOBRE EL RECAMBIO PROTEICO EN HÍGADO Y MÚSCULO BLANCO DE LA CARPA: EFECTO DE LA TEMPERATURA.

Con este experimento se pretende estudiar la influencia de la suplementación de proteína de gluten con lisina libre o encapsulada sobre el recambio proteico tisular como base de una respuesta reguladora y de crecimiento. Para ello, se realizaron medidas *in vivo* de la tasa de síntesis y degradación proteica en hígado y músculo de carpa. Las 6 dietas del experimento 2, se redujeron a 4 al seleccionar el mejor encapsulado. Las dietas empleadas fueron: control (C), dieta suplementada con la microcápsula tipo A, que dió los mejores resultados de crecimiento (G-A), dieta suplementada con lisina libre (G-L) y dieta deficiente en lisina (G-D).

a) Influencia de la dieta sobre el recambio proteico hepático de carpas mantenidas a 18°C:

La velocidad específica de crecimiento corporal o tisular (K_G) se calcula como el porcentaje diario de incremento de peso. Conociendo el contenido proteico de cada víscera o tejido, es posible conocer la K_G proteica o % diario de acúmulo proteico. Al no variar de forma apreciable, durante el período experimental, el contenido proteico, se ha empleado la velocidad específica de crecimiento como velocidad de acúmulo proteico.

La K_G hepática presentó diferencias significativas entre dietas, siendo significativamente mayor la tasa de crecimiento producida por la dieta control, seguida de las dietas G-A, G-L y G-D, en orden decreciente de respuesta.

En las Tablas 4.2.9 y 4.2.10 podemos observar, en los distintos índices calculados, el efecto de la suplementación de la dieta con lisina libre o encapsulada, o la no suplementación, sobre la tasa de recambio proteico y el contenido de ácidos nucleicos del hígado y el músculo blanco de las carpas.

La eficacia de retención (EPR) experimentó cambios paralelos a los de la velocidad de crecimiento (K_G), índice con el que está directamente relacionada. En este sentido la peor calidad proteica de las dietas G-D y G-L se tradujo en una menor eficacia de la retención de proteína hepática (0.89 y 2.44 respectivamente), la dieta suplementada con lisina encapsulada produjo valores intermedios entre aquellas y la control (3.99 y 10.26, respectivamente).

TABLA 4.2.9: Influencia de la disponibilidad de lisina dietaria sobre el turnover proteico en el hígado de la carpa a 18 °C.

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
K _G	0.63 ^a ±0.04*	0.08 ^d ±0.00*	0.21 ^c ±0.01*	0.37 ^b ±0.03*
K _S	6.48 ^a ±0.55*	9.11 ^b ±0.41*	8.66 ^b ±0.24*	9.40 ^b ±0.41*
K _D	5.85 ^a ±0.55*	9.03 ^b ±0.41*	8.45 ^b ±0.24*	9.03 ^b ±0.41*
C _S	36.38 ^a ±1.62*	42.11 ^a ±2.44*	38.36 ^a ±2.20*	41.73 ^a ±1.29*
K _{RNA}	1.76 ^a ±0.14*	2.21 ^b ±0.16*	2.22 ^b ±0.09*	2.26 ^b ±0.09*
K _{DNA}	10.84 ^a ±0.53*	13.11 ^a ±0.76	11.13 ^a ±0.73*	12.44 ^a ±1.26*
EPR	10.26 ^a ±0.90*	0.89 ^d ±0.04*	2.44 ^c ±0.07*	3.99 ^b ±0.21*
[Proteína]	101.4 ^a ±0.70	91.9 ^b ±1.50	102.6 ^a ±1.90	102.9 ^a ±1.0
[ARN]	3.69 ^a ±0.18	3.85 ^a ±0.14*	3.93 ^a ±0.22*	4.29 ^a ±0.11*
[ADN]	0.60 ^a ±0.04*	0.65 ^a ±0.05*	0.77 ^a ±0.05	0.81 ^a ±0.06
Prot./ADN	173.4 ^a ±10.7*	145.3 ^a ±10.9*	138.4 ^a ±12.4	132.4 ^a ±11.0
ARN/ADN	6.25 ^a ±0.37*	6.25 ^a ±0.87*	5.21 ^a ±0.35*	5.48 ^a ±0.40*

ABREVIATURAS USADAS: K_G, velocidad de acumulación de proteínas; K_S, velocidad de síntesis proteica; K_D, velocidad de degradación de proteínas; C_S, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_S/C_S) x 10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA: (K_S/100) x (Prot./DNA); EPR, eficacia de retención de proteínas: (K_G/K_S) x 100. Los resultados son la media ± SEM de 5 animales. p < 0.05. (* diferencias significativas entre dieta a 18 °C y dieta a 25°C).

La velocidad de síntesis proteica (K_S) hepática fue significativamente inferior para la dieta control, respecto al resto de las dietas. Simultáneamente la velocidad de degradación proteica (K_D) fue también menor para la dieta control respecto a las dietas G-A, G-L y G-D que, entre ellas, no presentaron diferencias significativas.

La capacidad del hígado para sintetizar proteína (C_S = ARN/proteína) resultó ser muy superior en el hígado respecto a la del músculo (Tabla 4.2.10) debido, sobre todo, al mayor

contenido hepático de ARN. El contenido hepático de ARN y C_s para las distintas dietas no presentaron diferencias significativas. Lo mismo ocurrió para el índice de capacidad de transcripción (mg ARN/ mg ADN) de los hepatocitos.

La eficacia de síntesis proteica ($K_{RNA} = (K_s / C_s) \times 100$) y la cantidad de proteína sintetizada por unidad celular ($K_{DNA} = \text{g proteína sintetizada / día / g ADN}$) fueron significativamente más bajas para la dieta control, respecto al resto de las dietas, que no fueron significativamente diferentes entre sí.

b) Influencia de la calidad proteica de la dieta sobre el recambio proteico en el músculo blanco de carpa a 18°C.

Los resultados correspondientes a la influencia de la forma de suplementación con lisina sobre el recambio proteico y el contenido en ácidos nucleicos del músculo blanco de la carpa se relacionan en la Tabla 4.2.10. La velocidad específica de crecimiento muscular (K_G), o porcentaje de incremento de peso, fue más baja para las carpas alimentadas con la dieta deficiente en lisina (G-D) y con la dieta suplementada con lisina libre (G-L), que previamente demostraron su peor calidad proteica (Tablas 4.2.1. y 4.2.2.), aunque ésta última no presentó diferencias significativas con la dieta suplementada con lisina encapsulada (G-A).

La EPR fué mucho más elevada en músculo que en hígado, asociada a una menor K_s muscular para valores similares de K_G . Las dietas control, y suplementadas con lisina encapsulada o libre (G-A y G-L) presentaron valores de retención proteica significativamente más altos que la dieta deficiente (G-D).

La velocidad fraccional de síntesis proteica (K_s) muscular (Tabla 4.2.6) fue significativamente más alta para las dietas que presentaron mayores K_G (control y G-B), correspondiendo los valores de K_s más bajos a las dietas deficiente (G-D) y suplementada con lisina libre (G-L), no siendo diferentes entre sí. Entre las velocidades de degradación, la única diferente a la dieta control, y con el valor más bajo, fue la que presentaron las carpas alimentadas con la dieta G-L, ésta, sin embargo, no presentó diferencias con el resto de las dietas.

El menor contenido de ARN muscular se relacionó directamente con C_s pero sin llegar a producir diferencias significativas entre las dietas.

El contenido muscular de ADN no se alteró significativamente por el tipo de dieta ingerida, obteniéndose en todos los casos valores menores que en hígado. La relación ARN/ADN sólo presentó diferencias significativas al comparar la dieta G-L con la control y la G-D, que presentaron valores más bajos.

TABLA 4.2.10: Influencia de la disponibilidad de lisina dietaria sobre el turnover proteico en el músculo blanco de la carpa a 18°C.

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
K_G	$0.32^a \pm 0.02$	$0.06^c \pm 0.00$	$0.21^b \pm 0.01$	$0.26^b \pm 0.03$
K_s	$0.71^a \pm 0.06^*$	$0.42^c \pm 0.04^*$	$0.45^c \pm 0.01^*$	$0.59^b \pm 0.02^*$
K_D	$0.39^a \pm 0.06^*$	$0.36^{ab} \pm 0.04$	$0.24^b \pm 0.01$	$0.33^{ab} \pm 0.02$
C_s	$3.71^a \pm 0.34$	$3.98^a \pm 0.21$	$4.14^a \pm 0.10^*$	$4.16^a \pm 0.48$
K_{RNA}	$1.98^a \pm 0.19^*$	$1.07^b \pm 0.09$	$1.09^b \pm 0.03^*$	$1.56^a \pm 0.22^*$
K_{DNA}	$11.5^a \pm 1.27$	$6.16^b \pm 0.70$	$9.18^{ab} \pm 1.15^*$	$8.02^b \pm 0.59$
EPR	$47.02^a \pm 4.10^*$	$14.97^b \pm 1.45^*$	$46.73^a \pm 1.09^*$	$44.22^a \pm 1.65^*$
[Proteína]	$129.8^a \pm 1.9^*$	$124.6^a \pm 2.5^*$	$128.1^a \pm 3.0^*$	$128.1^a \pm 2.1^*$
[ARN]	$0.48^a \pm 0.04$	$0.49^a \pm 0.02$	$0.53^a \pm 0.01^*$	$0.53^a \pm 0.05$
[ADN]	$0.08^a \pm 0.01^*$	$0.09^a \pm 0.01^*$	$0.07^a \pm 0.01^*$	$0.09^a \pm 0.01^*$
Prot./ADN	$1648^a \pm 476$	$1448^a \pm 156^*$	$2036^a \pm 664^*$	$1606^a \pm 755^*$
ARN/ADN	$5.90^a \pm 0.55^*$	$5.75^a \pm 0.34^*$	$7.36^a \pm 0.54^*$	$6.12^{ab} \pm 0.55^*$

ABREVIATURAS USADAS: K_G , velocidad de acumulación de proteínas; K_s , velocidad de síntesis proteica; K_D , velocidad de degradación de proteínas; C_s , capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA} , eficacia de síntesis proteica: $(K_s/C_s) \times 10$, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA} , g proteína sintetizada/día/g DNA: $(K_s/100) \times (Prot./DNA)$; EPR, eficacia de retención de proteínas: $(K_G/K_s) \times 100$. Los resultados son la media \pm SEM de 5 animales. $p < 0.05$. (* diferencias significativas entre dieta a 18 °C y dieta a 25°C).

a) Influencia de la dieta sobre el recambio proteico hepático en carpas mantenida a 25°C:

La tasa de crecimiento (K_G) hepático presentó diferencias significativas entre dietas, siendo significativamente mayor la obtenida para la dieta control, seguida de la dieta G-A y, con valores más bajos y no diferentes significativamente entre sí, las dietas G-L y G-D.

En las Tablas 4.2.11 y 4.2.12, se refleja el efecto de la suplementación de la dieta con

lisina libre o encapsulada, así como de la no suplementación, sobre la tasa de recambio proteico y el contenido en ácidos nucleicos del hígado y músculo blanco de la carpa.

La eficacia de retención proteica (EPR) experimentó cambios paralelos a los de la velocidad de crecimiento (K_G). La peor calidad proteica de las dietas G-D y G-L se tradujo en una menor eficacia de retención de proteína hepáticas (2.20 y 1.53 respectivamente). La dieta suplementada con lisina encapsulada obtuvo valores intermedios (2.63) entre las citadas dietas y la control (3.77).

La velocidad fraccional de síntesis proteica (K_S) fue significativamente mayor para las dietas control y G-A, presentando un valor intermedio la dieta G-L y el valor más bajo se obtuvo para la dieta G-D. La misma tendencia se observó para la velocidad de degradación proteica (K_D).

La capacidad del hígado para sintetizar proteínas ($C_S = \text{ARN/proteína}$) resultó ser muy superior a la del músculo (Tabla 4.2.12) debido, sobre todo, al mayor contenido hepático de ARN. El contenido de ARN, en hígado de carpas alimentadas con las distintas dietas, no presentó diferencias significativas. La capacidad de síntesis (C_S) fue mayor en carpas que ingieren dieta control y G-D. la capacidad de transcripción (mg ARN/ mg ADN) de los hepatocitos fue significativamente mayor para la dieta control.

La eficacia de síntesis proteica ($K_{RNA} = (K_S / C_S) \times 100$) para la dieta G-D fue la más baja. La cantidad de proteína sintetizada por unidad celular ($K_{DNA} = \text{g proteína sintetizada/día/g ADN}$) fue también significativamente más baja para la dieta G-D, seguida de la dieta G-L, que no fue significativamente inferior a la dieta G-A pero sí a la control.

b) Influencia de la forma de suplementación de la proteína de gluten sobre el recambio proteico en músculo blanco de carpas mantenidas a 25°C.

Los resultados correspondientes a la influencia de la forma de suplementación (libre o encapsulada) sobre el recambio proteico y el contenido en ácidos nucleicos del músculo blanco de la carpa, se relacionan en la Tabla 4.2.12. La velocidad específica de crecimiento muscular (K_G), o porcentaje de incremento de peso, fue más baja para las carpas alimentadas con la dieta deficiente en lisina (G-D), seguida de la dieta suplementada con lisina libre (G-

L), y de las dietas G-A y control, todas con diferencias significativas entre ellas.

TABLA 4.2.11: Influencia de la disponibilidad de lisina dietaria sobre el turnover proteico en el hígado de la carpa a 25°C.

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
K_G	0.81 ^a ±0.05	0.26 ^c ±0.01	0.25 ^c ±0.01	0.55 ^b ±0.03
K_S	21.73 ^a ±0.96	11.84 ^c ±0.29	16.45 ^b ±0.56	20.89 ^a ±0.16
K_D	20.92 ^a ±0.96	11.58 ^c ±0.29	16.20 ^b ±0.56	20.34 ^a ±0.16
C_S	31.56 ^a ±1.24	31.46 ^a ±1.66	26.07 ^b ±1.28	27.22 ^b ±1.34
K_{RNA}	6.97 ^a ±0.48	3.83 ^b ±0.24	6.41 ^a ±0.41	7.81 ^a ±0.45
K_{DNA}	25.09 ^a ±1.06	10.81 ^c ±0.39	19.78 ^b ±1.58	22.49 ^{ab} ±1.69
EPR	3.77 ^a ±0.18	2.20 ^c ±0.05	1.53 ^d ±0.05	2.63 ^b ±0.02
[Proteína]	106.3 ^a ±2.0	86.2 ^b ±1.2	106.7 ^a ±2.2	107.1 ^a ±1.0
[ARN]	3.35 ^a ±0.12	2.71 ^b ±0.13	2.79 ^b ±0.18	2.91 ^b ±0.12
[ADN]	0.93 ^a ±0.06	0.95 ^a ±0.04	0.91 ^a ±0.06	1.03 ^a ±0.07
Prot./ADN	116.8 ^a ±7.4	91.6 ^b ±4.0	119.4 ^a ±6.5	107.6 ^a ±7.8
ARN/ADN	3.67 ^a ±0.23	2.86 ^b ±0.13	3.08 ^b ±0.13	2.88 ^b ±0.14

ABREVIATURAS USADAS: K_G , velocidad de acumulación de proteínas; K_S , velocidad de síntesis proteica; K_D , velocidad de degradación de proteínas; C_S , capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA} , eficacia de síntesis proteica: $(K_S/C_S) \times 10$, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA} , g proteína sintetizada/día/g DNA: $(K_S/100) \times (Prot./DNA)$; EPR, eficacia de retención de proteínas: $(K_G/K_S) \times 100$. Los resultados son la media \pm SEM de 5 animales. $p < 0.05$. (* diferencias significativas entre dieta a 18 °C y dieta a 25°C).

La EPR fue también, a 25°C, más elevada en músculo blanco que en hígado, como consecuencia de una menor K_S muscular para valores similares de K_G . La dieta control y las suplementadas con lisina encapsulada o libre (G-A y G-L) presentaron valores de retención proteica significativamente mayores que los de la dieta deficiente (G-D). Los valores de EPR, para las cuatro dietas fueron todos ellos estadísticamente diferentes entre sí.

La velocidad fraccional de síntesis proteica (K_S) muscular (Tabla 4.2.12) fue

significativamente más alta para las dietas que presentaron mayores K_G (control y G-A), correspondiendo los valores de K_S más bajos a las dietas deficiente (G-D) y suplementada con lisina libre (G-L), que fueron similares. Entre las velocidades de degradación, la única diferente fue la que presentaron las carpas alimentadas con la dieta G-D, con un valor mayor al resto de las dietas.

TABLA 4.2.12: Influencia de la disponibilidad de lisina dietaria sobre el turnover proteico en el músculo blanco de la carpa a 25°C.

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
K_G	0.75 ^a ±0.03	0.20 ^d ±0.01	0.39 ^c ±0.03	0.54 ^b ±0.03
K_S	0.92 ^a ±0.02*	0.58 ^c ±0.05*	0.66 ^c ±0.02*	0.75 ^b ±0.02*
K_D	0.17 ^a ±0.02*	0.38 ^b ±0.05	0.27 ^a ±0.02	0.21 ^a ±0.02
C_S	2.92 ^a ±0.11	2.93 ^a ±0.17*	2.72 ^a ±0.27*	3.14 ^b ±0.16
K_{RNA}	3.33 ^a ±0.19*	1.67 ^c ±0.11	2.61 ^b ±0.33*	2.43 ^b ±0.19*
K_{DNA}	10.06 ^a ±0.34	4.64 ^c ±0.33	5.54 ^c ±0.37*	7.00 ^b ±0.38
EPR	81.44 ^a ±1.41*	35.89 ^d ±2.90*	59.44 ^c ±1.72*	72.75 ^b ±2.19*
[Proteína]	132.1 ^a ±0.9*	119.4 ^b ±1.5*	128.2 ^a ±1.6*	128.8 ^a ±1.7*
[ARN]	0.40 ^a ±0.03	0.40 ^a ±0.02	0.35 ^a ±0.03*	0.42 ^a ±0.02
[ADN]	0.12 ^a ±0.00*	0.15 ^a ±0.01*	0.14 ^a ±0.01*	0.14 ^a ±0.01*
Prot./ADN	1091 ^a ±83	808 ^a ±104*	969 ^a ±366*	936 ^a ±96*
ARN/ADN	3.31 ^a ±0.31*	2.65 ^b ±0.07*	2.46 ^b ±0.15*	3.02 ^a ±0.18*

ABREVIATURAS USADAS: K_G , velocidad de acumulación de proteínas; K_S , velocidad de síntesis proteica; K_D , velocidad de degradación de proteínas; C_S , capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA} , eficacia de síntesis proteica: $(K_S/C_S) \times 10$, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA} , g proteína sintetizada/día/g DNA: $(K_S/100) \times (Prot./DNA)$; EPR, eficacia de retención de proteínas: $(K_G/K_S) \times 100$. Los resultados son la media \pm SEM de 5 animales. $p < 0.05$.

El menor contenido de ARN del músculo blanco se relacionó con una menor C_S .

El contenido de ADN del músculo no se alteró significativamente por el tipo de dieta

y fue siempre menor que en hígado. La relación ARN/ADN fue similar entre las dietas G-L y G-D y entre las dietas control y G-A que presentaron valores significativamente más altos respecto a las otras dos.

Diferencias debidas a la temperatura para un mismo tipo de dieta:

Generalmente, todos los índices de recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos presentaron diferencias con el cambio de temperatura dentro de cada dieta, exceptuando los siguientes casos en hígado:

- Dieta control: concentración de proteína y ARN.
- Dieta G-A: concentración de proteína y ADN.
- Dieta G-L: concentración de proteína, ADN y relación Prot./ADN.
- Dieta G-D: concentración de proteína.

Y las siguientes excepciones en músculo blanco:

- Dieta control: K_G , C_S , K_{DNA} , [ARN] y Prot./ADN.
- Dieta G-A: K_G , K_D , C_S , K_{DNA} , y [ARN].
- Dieta G-L: K_G y K_D .
- Dieta G-D: K_G , K_D , C_S , K_{RNA} , K_{DNA} y [ARN].

c) Influencia de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad del complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC) de la carpa:

Se midieron las actividades proteásicas correspondientes al complejo multicatalítico de actividad proteasa (MPC), expresadas como: actividad tipo quimotripsina (CT-L: *chymotrypsin-like*), actividad hidrolítica de péptidos (PGPH: *peptidil-glutamyl-peptide hydrolyzing activity*) y actividad tipo tripsina (T-L: *trypsin-like*) y determinadas en hígado, músculo e intestino se relacionan en las tablas 4.2.13 a la 4.2.18. Los resultados ponen de manifiesto una clara influencia de la temperatura, a la que se mantuvieron los animales, con la tendencia de que a más baja temperatura mayor actividad, excepto en hígado donde, dependiendo de la actividad medida, se observa o no esa tendencia. Las mayores actividades fueron registradas en hígado e intestino (variando mucho en éste según la temperatura) y las más bajas en el músculo, independientemente de que las actividades se expresen en mU/mg de proteína o como U/g tejido.

Actividad PGPH:

En hígado de carpas mantenidas a 18°C, la dieta deficiente fue la que mostró diferencias significativas con las restantes dietas, presentando los valores más bajos de

actividad en cualquier forma de expresión (Tabla 4.2.13). En este mismo tejido, pero a 25°C, las dietas con mayor actividad a 18°C experimentaron una disminución y, por el contrario, la dieta deficiente llegó incluso a experimentar un ligero aumento (Tabla 4.2.14).

En músculo de carpas a 18°C no se apreciaron diferencias entre dietas; sin embargo, a 25°C, las dietas de peor calidad G-D y G-L experimentaron un aumento significativo de la actividad de degradación respecto a las dietas que mostraron mejor utilización nutritiva (dietas C y G-A).

En intestino y para los animales mantenidos a 18°C, la dieta control mostró una mayor actividad que las demás dietas. En el caso de las carpas mantenidas a 25°C, la actividad en este tejido disminuyó un 90% .

Actividad CT-L:

En hígado de carpa a 18°C (Tabla 4.2.15), son las dietas de peor calidad (G-D y G-L) las que mostraron actividades significativamente más altas respecto a las dietas C y G-A, expresadas mU/mg proteína y, U/g tejido. A la temperatura de 25°C (4.2.16), sólo la dieta G-A mostró diferencias con las restantes dietas. En este caso, el aumento de la temperatura disminuyó en un 50 % las actividades registradas para las dietas G-L y G-D, mientras que no se produjo una disminución significativa entre los animales alimentados con las dietas C y G-A a 18°C, respecto a las que se mantuvieron a 25°C.

Mientras que a 18°C la dieta control indujo una mayor actividad en músculo, a 25°C la actividad para las dietas C, G-A y G-L disminuyó un 50%. La dieta deficiente en lisina (G-D) mantuvo la actividad proteásica en los valores más altos.

Las actividades registradas en intestino fueron mayores para las dietas de mejor calidad C y G-A, aunque la dieta encapsulada (G-A) no dió diferencias significativas con la deficiente en lisina (G-D) y con la suplementada con lisina libre (G-L). De nuevo hubo disminuciones del 50% en las actividades intestinales a 25°C, excepto para la dieta deficiente que no presentó diferencias debidas a la temperatura.

Actividad T-L:

En el hígado de los animales mantenidos a 18°C, destacó la dieta control con una mayor actividad y no se registraron diferencias significativas entre el resto de las dietas. Al aumentar la temperatura hubo disminuciones significativas para las dietas C y G-A, mientras que para las dietas deficiente y suplementada con lisina libre se mantuvieron altas las

actividades.

En músculo de carpas a 18°C, de nuevo destacó la dieta control con una mayor actividad sin que se manifestaran diferencias significativas entre el resto de las dietas. En los animales a 25°C, disminuyó la actividad en un 50 %, excepto para la dieta deficiente que no presentó diferencias con los animales que comieron esta dieta y estuvieron a 18°C, presentando la dieta deficiente (G-D) la mayor degradación significativa de todas las dietas a 25°C.

En el intestino la más baja temperatura no provocó diferencias entre dietas. A 25°C hubo una disminución en la actividad del 70%, en las dietas C, G-A y G-L y, del 30% en la deficiente alcanzando en ésta última (G-D) la mayor actividad estadísticamente significativa.

Tabla 4.2.13: Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad PGPH en distintas fracciones corporales de carpa a 18°C [Sustrato=0.16 mM].

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
Hígado				
mU/mg prot.	37.41 ^a ±1.95*	25.24 ^b ±2.27*	40.63 ^a ±2.81*	37.89 ^a ±3.89*
U/g tejido	2.59 ^a ±0.13*	1.75 ^b ±0.15*	2.77 ^a ±0.17*	2.49 ^a ±0.19*
U/hígado	6.26 ^a ±0.46*	2.70 ^b ±0.33*	6.79 ^a ±0.68*	6.85 ^a ±0.95*
Músculo				
mU/mg prot.	13.25 ^a ±1.68*	11.44 ^a ±1.00*	13.85 ^a ±0.61*	10.48 ^a ±0.27*
U/g tejido	0.55 ^a ±0.07*	0.55 ^a ±0.02*	0.59 ^a ±0.04*	0.59 ^a ±0.04*
Intestino				
mU/mg prot.	69.24 ^a ±3.71*	30.22 ^b ±1.75*	28.89 ^b ±3.16*	32.41 ^b ±3.04*
U/g tejido	4.77 ^a ±0.46*	2.38 ^b ±0.32*	1.91 ^b ±0.16*	2.24 ^b ±0.31*

C: control; GA: dieta con encapsulado tipo A; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, p<0.05)

Tabla 4.2.14: Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad PGPH en distintas fracciones corporales de carpa a 25°C [Sustrato=0.16 mM].

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
Hígado				
mU/mg prot.	19.94 ^{bc} ±1.42	34.44 ^a ±4.76	27.43 ^{ab} ±1.54	15.91 ^c ±0.42
U/g tejido	1.46 ^{bc} ±0.11	2.45 ^a ±0.31	1.93 ^{ab} ±0.13	1.11 ^c ±0.04
U/hígado	4.24 ^a ±0.32	5.39 ^a ±0.42	4.16 ^a ±0.33	2.45 ^b ±0.20
Músculo				
mU/mg prot.	4.75 ^b ±0.45	7.15 ^a ±0.53	6.74 ^a ±1.08	3.74 ^b ±0.30
U/g tejido	0.22 ^a ±0.03	0.32 ^a ±0.07	0.34 ^a ±0.06	0.22 ^a ±0.03
Intestino				
mU/mg prot.	5.59 ^a ±0.62	5.00 ^a ±0.71	1.76 ^b ±0.23	1.29 ^b ±0.13
U/g tejido	0.38 ^a ±0.18	0.22 ^a ±0.09	0.09 ^a ±0.01	0.08 ^a ±0.02

C: control; GA: dieta con encapsulado tipo A; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, p<0.05)

Tabla 4.2.15: Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad CT-L en distintas fracciones corporales de carpa a 18°C [Sustrato=0.16 mM].

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
Hígado				
mU/mg prot.	34.96 ^b ±2.27	57.25 ^a ±4.67*	57.63 ^a ±9.78*	36.58 ^b ±3.60
U/g tejido	2.39 ^b ±0.20	3.81 ^a ±0.32*	4.23 ^a ±0.24*	2.71 ^b ±0.31
U/hígado	7.30 ^b ±0.30	5.19 ^c ±0.75	10.37 ^a ±1.18*	7.55 ^b ±0.79
Músculo				
mU/mg prot.	25.03 ^a ±0.53*	16.06 ^b ±0.44	19.11 ^b ±1.66*	16.42 ^b ±1.63*
U/g tejido	1.09 ^a ±0.06*	0.86 ^a ±0.07*	0.98 ^a ±0.10*	0.95 ^a ±0.03*
Intestino				
mU/mg prot.	23.27 ^a ±1.22*	14.15 ^b ±0.85	14.65 ^b ±1.99*	19.03 ^{ab} ±2.30*
U/g tejido	1.60 ^a ±0.07*	0.76 ^b ±0.16	0.97 ^b ±0.12*	1.27 ^{ab} ±0.25*

C: control; GA: dieta con encapsulado tipo A; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

Tabla 4.2.16: Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad CT-L en distintas fracciones corporales de carpa a 25°C [Sustrato=0.16 mM].

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
Hígado				
mU/mg prot.	35.96 ^{ab} ±2.09	27.98 ^b ±1.70	32.32 ^b ±3.90	42.12 ^a ±1.32
U/g tejido	2.92 ^a ±0.26	2.07 ^b ±0.08	2.12 ^b ±0.38	2.98 ^a ±0.05
U/hígado	6.11 ^a ±0.44	4.40 ^a ±0.83	4.51 ^a ±0.77	6.48 ^a ±0.98
Músculo				
mU/mg prot.	9.76 ^b ±1.23	13.57 ^a ±0.41	7.16 ^b ±0.79	8.08 ^b ±0.75
U/g tejido	0.50 ^a ±0.06	0.55 ^a ±0.06	0.36 ^a ±0.04	0.44 ^a ±0.04
Intestino				
mU/mg prot.	11.29 ^b ±0.46	13.87 ^a ±1.02	7.68 ^c ±1.49	11.72 ^b ±0.35
U/g tejido	0.67 ^a ±0.03	0.62 ^a ±0.04	0.39 ^c ±0.07	0.56 ^a ±0.02

C: control; GA: dieta con encapsulado tipo A; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes,* diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

Tabla 4.2.17. Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad T-L en distintas fracciones corporales de carpa a 18°C [Sustrato=0.16 mM].

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
Hígado				
mU/mg prot.	135.77 ^a ±9.90*	39.59 ^b ±5.78	33.16 ^b ±4.63	38.79 ^b ±3.07*
U/g tejido	10.66 ^a ±0.57*	2.78 ^b ±0.45	2.15 ^b ±0.27	2.67 ^b ±0.29*
U/hígado	22.68 ^a ±0.84*	4.48 ^c ±0.85	5.24 ^c ±0.36	8.35 ^b ±0.52*
Músculo				
mU/mg prot.	12.72 ^a ±0.71*	7.65 ^b ±0.84	8.68 ^b ±1.03*	9.46 ^b ±0.83*
U/g tejido	0.46 ^a ±0.05*	0.37 ^a ±0.04	0.35 ^a ±0.01*	0.47 ^a ±0.05*
Intestino				
mU/mg prot.	42.59 ^a ±2.28*	38.54 ^a ±1.24*	46.18 ^a ±3.28*	46.48 ^a ±8.54*
U/g tejido	3.16 ^a ±0.46	2.93 ^a ±0.21	3.12 ^a ±0.30	6.09 ^a ±2.26*

C: control; GA: dieta con encapsulado tipo A; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes, * diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

Tabla 4.2.18. Efecto de la disponibilidad de la lisina de la dieta sobre la actividad T-L en distintas fracciones corporales de carpa a 25°C [Sustrato=0.16 mM].

	DIETAS			
	C	G-D	G-L	G-A
Hígado				
mU/mg prot.	27.75 ^a ±1.36	27.30 ^a ±1.34	24.84 ^a ±3.76	17.42 ^b ±0.74
U/g tejido	2.23 ^a ±0.42	2.05 ^a ±0.21	1.78 ^a ±0.29	1.18 ^a ±0.04
U/hígado	5.66 ^a ±0.67	4.34 ^{ab} ±0.59	3.92 ^{ab} ±0.82	2.52 ^b ±0.67
Músculo				
mU/mg prot.	4.68 ^b ±0.10	6.81 ^a ±0.37	4.64 ^b ±0.28	4.09 ^b ±0.28
U/g tejido	0.24 ^a ±0.01	0.28 ^a ±0.03	0.23 ^a ±0.01	0.22 ^a ±0.01
Intestino				
mU/mg prot.	12.67 ^b ±0.70	27.05 ^a ±3.13	15.30 ^b ±0.87	12.51 ^b ±1.03
U/g tejido	0.73 ^b ±0.02	1.13 ^a ±0.21	0.72 ^b ±0.03	0.59 ^b ±0.05

C: control; GA: dieta con encapsulado tipo A; GL, dieta con lisina libre; GD, dieta deficiente en lisina. a, b, c: valores con distinta letra son significativamente diferentes, * diferencias significativas entre la dieta a 18°C (F) y 25°C (C). (Newman-Keuls test, $p < 0.05$)

DISCUSIÓN

Handwritten text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is faint and difficult to decipher but appears to be organized in a list or table format with several lines of text.

5.1.UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA EN DIETAS PARA TRUCHAS.

Dado que para conseguir una dieta claramente deficiente en lisina hemos tenido que recurrir a la inclusión mayoritaria de una fuente proteica vegetal, (harina de gluten de maíz), y a disminuir sensiblemente el contenido en harina de pescado, parece lógico que dirijamos nuestra atención, en primer lugar, hacia la aceptación de las dietas experimentales, un aspecto que podría haberse convertido en factor crucial para el éxito de este experimento, si no se hubieran conseguido ingestas suficientemente altas como para permitir tasas de crecimiento elevadas. En este sentido, la aceptación de las dietas ha sido buena, a juzgar por el porcentaje de alimento consumido diariamente (Tabla 4.1.1). Los valores, en el rango de los obtenidos por nosotros en otros experimentos, no difieren desde el punto de vista estadístico entre las distintas dietas, con la excepción de la dieta deficiente en lisina, que es ligeramente, aunque de forma significativa, inferior al resto. El hecho de presentar menor ingesta se puede interpretar aquí, no como rechazo a la dieta en sí, sino como una pérdida de apetito de los animales, uno de los primeros síntomas de la deficiencia en aminoácidos esenciales (Ketola, 1983). Por último, la adición de saborizante (betaína) a todas las dietas, ha favorecido la ausencia de rechazo de las dietas con mayor contenido en proteína vegetal.

Por lo que se refiere al crecimiento de los distintos lotes experimentales, hay que resaltar que la homogeneidad en el tamaño de los individuos que componían los lotes iniciales y la similitud entre estos, ha incrementado la precisión de los resultados de los ensayos en cuanto a crecimiento y utilización de la dieta. De hecho, el peso medio final de los lotes podría ser utilizado en este caso para comparar el crecimiento entre los mismos, puesto que las diferencias que se hayan son las mismas que cuando se usa un índice específico del crecimiento producido, como el TCI. Atendiendo, no obstante, a este último índice, que refleja el porcentaje de ganancia de peso diario, se pueden establecer tres divisiones entre los tratamientos. Por una parte, se sitúa la dieta control que promueve mayor crecimiento que las demás, de manera estadísticamente significativa, le sigue a ésta un grupo formado por todas las dietas a las que se les ha añadido lisina, bien libre o microencapsulada. Es ligeramente superior el crecimiento obtenido con la dieta que incorporaba las microcápsulas de tipo B, aunque no existen diferencias estadísticas entre los valores de los distintos lotes, que oscilan en torno a un valor de 2. Finalmente, como era de esperar por su menor ingesta, se sitúan los lotes que fueron alimentados con la dieta GD, deficiente en lisina. Sin embargo, estos resultados no son sólo consecuencia de la mayor o menor cantidad de alimento consumido, sino, también, de la diferente utilización nutritiva de las dietas. Así, se puede apreciar cómo existen diferencias en los índices de utilización de la dieta, tales como el Índice de Conversión o el Valor Productivo de la Proteína. Considerando estos índices, la dieta control se muestra nuevamente superior, pues es la que presenta mejor conversión de alimento en peso de pez y un mayor porcentaje de retención proteica. En definitiva, es una dieta que presenta mejor calidad de sus componente proteico que el resto, ya que es en este

elemento en el que únicamente difieren las dietas experimentales. Hay que resaltar que a la dieta control le sigue en todos los índices la dieta con lisina libre, con diferencias estadísticamente significativas entre ambas, pero también con el resto de las dietas, en la práctica totalidad de los índices. En cualquier caso, siempre es la dieta deficiente la que presenta índices inferiores y una más pobre utilización, haciéndose patente, una vez más, el efecto de la carencia en el aminoácido esencial.

Se hace evidente de esta manera, el efecto beneficioso sobre crecimiento y utilización de la dieta, de la adición del aminoácido en la que es deficiente, tal y como ha sido descrito numerosas veces (Cowey y Sargent, 1979; Thebault, 1985; Deshimaru, 1982; Chen et al., 1992). No obstante, conviene destacar que no se aprecia un claro efecto diferencial entre las dietas que incorporan la lisina protegida y la dieta con lisina libre. Todo ello pone de manifiesto una vez más, la excelente capacidad de los salmónidos para utilizar aminoácidos libres en su dieta (Kim et al., 1992a,b; Ketola, 1982; Tiews et al., 1976; Dabrowska y Wojno, 1977, Espe y Lied, 1994). Por otra parte, ninguna de las dietas ensayadas adicionadas de lisina ha promovido crecimientos o índices de utilización de la dieta semejantes a los de la dieta control, por lo que la adición del aminoácido no ha sido totalmente efectiva en este sentido. Sin embargo, si se observa la composición en aminoácidos de las dietas (Tablas 3.6 y 3.7), se aprecia que, pese a la incorporación de lisina (libre o microencapsulada), los aminogramas de la dieta control y del resto no coinciden totalmente, puesto que las proporciones que incorporan de harina de pescado y de gluten, son muy distintas. Así, la dieta control presenta mejores índices de aminoácidos esenciales y una relación AAEE/AANEE más alta que el resto de las dietas (Tabla 3.7). Asimismo, si comparamos el contenido en arginina de las dietas (Tabla 3.6) con las necesidades de este aminoácido calculadas por Ogino (1980) (Tabla 2.3) para esta especie, se puede apreciar que todas las dietas, salvo la control, se hayan justo en el límite, de hecho ligeramente por debajo, de las necesidades establecidas. Este hecho podría ser limitante para el crecimiento de las truchas y, junto con otras diferencias en el contenido de los demás aminoácidos esenciales, explicaría por qué la suplementación con lisina, aunque ha mejorado el rendimiento de las dietas, no las ha equiparado con la dieta control.

Por lo que respecta a las dietas que incluían lisina, sorprende comprobar cómo han existido diferencias a favor de la dieta con lisina libre, por lo que, en lo referente a Índice de Eficacia Alimentaria, Coeficiente de Eficacia en Crecimiento y Valor Productivo de la Proteína, se podría casi pensar en un efecto menos favorable de las microcápsulas sobre estos índices, puesto que esta es la única variable que, en principio, existe entre estas dietas; de hecho, tanto la determinación de la composición en macronutrientes (Tabla 3.4), como de aminoácidos (Tabla 3.6 y 3.7), han proporcionado valores virtualmente idénticos. Una explicación plausible a este fenómeno, podría radicar en que las microcápsulas no sean óptimamente utilizadas por el pez a nivel digestivo, aspecto que no se planteó Sierra (1995) que obtuvo en dorada índices de conversión y crecimiento significativamente superiores al suplementar proteína de soja con metionina encapsulada, mientras que la suplementada con

metionina libre no tuvo efecto. De hecho, si existiera una cierta dificultad en que las enzimas digestivas hidrolizaran la cubierta de las microcápsulas, la liberación de lisina de su interior disminuiría y, por tanto, los niveles reales de lisina disponible serían inferiores a los calculados y, por supuesto, a los que proporciona la dieta con lisina libre. En contra de esta posible explicación se sitúan la ausencia de referencias bibliográficas concretas, en este sentido y los valores de digestibilidad de la proteína de las dietas obtenidos experimentalmente en este ensayo (Tabla 4.1.4).

Los Coeficientes de Digestibilidad Aparente de la proteína de las dietas no mostraron diferencia alguna, ni desde el punto de vista estadístico, ni con posible significado funcional. No obstante, hay que hacer notar que la dieta control tiene una mayor proporción de harina de pescado (cuya proteína es menos digestible para la trucha que la de gluten de maíz (Moyano, 1990, Morales, 1992) y que, pese a ello, apenas si se refleja numéricamente en el CDA de su proteína (y en absoluto desde el punto de vista estadístico), con relación al resto de las dietas. Así pues, difícilmente cabría esperar que una menor digestibilidad de la cubierta de las microcápsulas se hiciera notar significativamente en el CDA de la proteína, cuando el total de las microcápsulas adicionadas a la dieta apenas supera el 1% de ésta. Grandes diferencias en la digestibilidad de la cubierta de las microcápsulas, podrían quedar enmascaradas por el error metodológico propio de la técnica de determinación de los Coeficientes de Digestibilidad Aparente y, sin embargo, podrían disminuir la cantidad de lisina disponible, hasta el punto en que se reflejara en los índices de utilización nutritiva de la dieta.

De hecho, cuando se calcula a partir del PPV y CDA el Valor Biológico de la proteína de las distintas dietas (Tabla 4.1.2), aparecen diferencias entre ellas, de forma que se establece una gradación ($C > GL > GB > GC > GA > GD$) que coincide, en líneas generales, con la que se puede observar en relación al Índice de Conversión o al Coeficiente de Eficacia en Crecimiento.

La comprobación de esta hipótesis requerirá un diseño específico que permita determinar experimentalmente la digestibilidad de las microcápsulas. En cualquier caso, se puede decir que para la trucha, y en nuestras condiciones experimentales, los métodos de encapsulación de la lisina que hemos utilizado, se muestran eficaces en cuanto a mejorar la utilización nutritiva de la dieta y el crecimiento de la trucha, con respecto a una dieta deficiente en este aminoácido. Si bien, la adición de lisina libre a la dieta sigue siendo una forma eficaz de suplementación en la trucha ya que los resultados son similares a los obtenidos con una dieta control y la encapsulación GB no los supera.

La composición corporal en macronutrientes (Tabla 4.1.3) de los animales de los distintos lotes presentó, sin excepción, un cierto grado de engrasamiento, con respecto al punto de partida del experimento, lo que supone la normal evolución de la composición corporal en esta especie. No obstante, el acúmulo graso fue ligeramente menor en los lotes

alimentados con las dietas control y GA, si bien, dada la similitud entre los valores, probablemente esta diferencia carezca de significado funcional concreto. Por otra parte, sorprende en principio, que también los animales alimentados con la dieta deficiente hayan acumulado grasa a un ritmo semejante al del resto de los lotes, pese a haber comido y crecido mucho menos. Pensamos que en realidad este es un efecto provocado en su mayor parte, por la disminución en el contenido proteico que sufren los animales, a consecuencia de una deficiente síntesis proteica motivada por la deficiencia en lisina. En la situación opuesta se encuentran los animales alimentados con la dieta control, lo cuales exhiben al final del experimento un ligero aumento en su contenido proteico, que al expresarse porcentualmente sobre la sustancia seca, es responsable de la ligera disminución que aparece en la composición grasa de los animales de estos lotes.

5.2.1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA EN DIETAS PARA CARPAS MANTENIDAS A 18°C.

Al igual que el apartado anterior, cabe comenzar éste, comentando la aceptación de las distintas dietas por los animales, si bien en este caso, el carácter omnívoro de la carpa disminuía las posibilidades de rechazo de los piensos por la inclusión de la harina de gluten de maíz. En este, como en el experimento anterior, no ha habido diferencias notables entre las dietas, con la excepción de la dieta deficiente en lisina que presentó una disminución de la ingesta de alimento cercana al 30% (Tabla 4.2.1), como consecuencia de la pérdida de apetito provocada por la carencia en un aminoácido esencial, y de la dieta GB que no fue demasiado bien aceptada por los animales, alcanzando valores de ingesta semejantes a los de la dieta deficiente. Probablemente, la cubierta grasa de las microcápsulas de esta dieta, provocó un cierto rechazo en los animales, que no pudo ser contrarrestado por el saborizante adicionado a la misma.

Por lo que respecta al crecimiento de los animales, la Tasa de Crecimiento Instantáneo (TCI), muestra diferencias con la trucha, no sólo porque presentan un crecimiento más lento, sino porque los lotes se agrupan de diferente manera. En este caso, no existen diferencias estadísticamente significativas, entre la dieta control y las dietas con microcápsulas de tipo A y C, creciendo los animales de este último caso, prácticamente lo mismo que los del lote control. Le siguen a estos lotes los alimentados con dieta con lisina libre y con microcápsulas de tipo B, exhibiendo ambos crecimientos idénticos. Finalmente, como era de esperar, y con una tasa de crecimiento realmente baja, se sitúan los animales alimentados con la dieta deficiente en lisina.

Todos los hechos anteriores apuntan a que en la carpa, a esta temperatura de cultivo, la deficiencia en lisina se manifiesta quizá de forma más severa que en la trucha, que utiliza mucho peor que ésta los aminoácidos libres adicionados a la dieta (este hecho es

suficientemente conocido (Nose, 1972; Schlicio y Nicolai, 1978; Yamada et al, 1981; Walton y Wilson, 1989; Murai et al, 1982; Plakas et al, 1980) y que la microencapsulación (al menos dos de los tipos ensayados por nosotros) demuestra ser eficaz en cuanto que produce una mejora del crecimiento, semejante, en algunos casos a la dieta control y muy superior a la dieta con lisina libre. Todo esto se refleja en los índices de utilización nutritiva del alimento. Por lo que respecta al Índice de Conversión y al Coeficiente de Eficacia en Crecimiento, ambos son similares entre las dietas Control y GC, que son las que presentan mejores índices de utilización. Por su parte, las dietas GA y GB son muy parecidas entre sí, aunque muestran índices de utilización de la dieta no tan buenos como las dietas anteriores y, finalmente, se sitúan las dietas GL y, muy distanciada, la GD.

Al igual que los índices anteriores, los referentes a la calidad de la proteína (VPP, CDA y VB), muestran ordenamientos de las dietas similares, con independencia de que en algún caso, las diferencias no alcancen significación estadística, debido a la dispersión de los resultados de las réplicas.

La proteína de la dieta control es, sin duda, la de mejor calidad, seguida de la de las dietas que incorporan lisina microencapsulada, de entre las que destaca la dieta con microcápsula de tipo C. Hay que reseñar que el porcentaje de proteína de la dieta deficiente (GD) que es retenido por el animal (PPV=5.1%), aproxima a estos lotes a condiciones de mantenimiento, en cuanto a balance proteico se refiere. No es de extrañar, pues, que en estas circunstancias, donde está afectado el recambio proteico (ver discusión más adelante), se vea también afectada la digestibilidad de la proteína de la dieta (Tabla 4.2.6), que es significativamente más baja que en el resto de las dietas, probablemente por una pérdida de capacidad digestiva enzimática o por alteraciones en las membranas de los enterocitos, que causarían problemas de absorción.

Así pues, la microencapsulación de aminoácidos, especialmente del tipo C, muestra ser, en este tipo de peces y a temperatura relativamente baja, un medio eficaz de suplementación de la proteína dietaria muy eficaz y con mayores perspectivas de uso inmediato que en salmónidos. Lamentablemente, y dado que la dieta control difiere de las demás dietas en otros aminoácidos esenciales, además de la lisina, queda en el aire si los mejores resultados obtenidos con esta dieta se deben a esta diferente composición de su proteína (incluyendo IAAE más favorables. Tablas 3.8 y 3.9) o a que la microencapsulación no sincroniza lo suficiente la absorción de los aminoácidos añadidos y los "proteicos". No obstante, la dinámica postprandial de aminoácidos en plasma, especialmente la de la lisina, arrojará, sin duda, luz sobre esta cuestión (ver discusión más adelante).

La composición de los cuerpos de los animales (Tabla 4.2.5) no muestra en este caso variaciones con significación estadística entre los distintos tratamientos y para los distintos parámetros analizados. Sin duda las bajas tasas de crecimiento exhibidas por la carpa a esta temperatura (18°C) no han permitido que las posibles diferencias se pusieran de manifiesto

durante la duración del periodo experimental. Sí se aprecia, sin embargo, como en el caso de la trucha, un cierto grado de engrasamiento general de los animales con respecto al punto inicial y que parece el propio de esta especie al ir aumentando su edad/tamaño.

5.2.2.UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA PROTEÍNA DE GLUTEN DE MAÍZ, SUPLEMENTADA CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA EN DIETAS PARA CARPAS MANTENIDAS A 25°C.

En este experimento, idéntico al comentado anteriormente en cuanto a dietas, homogeneidad de los lotes de animales, pesos iniciales, duración y desarrollo, se pretende ver si el factor temperatura, en una especie considerada de aguas cálidas, juega un papel determinante en los mecanismos de digestión de proteínas y absorción de los aminoácidos, de manera que se modifique la dinámica de liberación de lisina de las microcápsulas y, por consiguiente, sobre el rendimiento de las dietas, comprobando así, las posibilidades de uso de los microencapsulados para esta especie en condiciones óptimas de cultivo.

Los resultados que aparecen en las tablas 4.2.1 y 4.2.3, reflejan cómo el factor temperatura ha modificado parámetros tales como la ingesta, el crecimiento, etc., con relación al experimento anterior.

Es un hecho sobradamente conocido que en los peces, animales poiquiloterms, tanto las necesidades calóricas para mantenimiento, como la ingesta, aumentan al hacerlo la temperatura (Cho y Slinger, 1980; Brett et al., 1969). En este caso, los niveles de ingesta también aumentan con respecto al experimento realizado a menor temperatura, si bien hay que comentar que no siempre esta elevación de la cantidad de alimento ingerido alcanza significación estadística. Asimismo, hay que hacer una nueva salvedad con la dieta GB, que no modifica su ingesta con respecto al experimento anterior, por lo que se confirma su mala aceptación que ya comentábamos. Por lo que se refiere al crecimiento, juzgado a través de la Tasa Instantánea de Crecimiento (TCI), también aumenta lógicamente y lo hace en mayor medida de lo que justifica el aumento de la ingesta, por lo que los índices de conversión de las dietas también serán mejores. En todos los casos existen diferencias estadísticamente significativas, salvo en los lotes alimentados con la dieta GC, con respecto a sus homólogos mantenidos a 18 °C. En cuanto a las comparaciones entre lotes del propio experimento, la dieta control se destaca claramente de las demás, sin que, en este caso, haya ninguna otra que pueda considerarse similar en cuanto al crecimiento que promueve. A esta dieta le siguen las que incorporan microcápsulas, en especial las de tipo A y después, la dieta con lisina libre (GL), mientras que la dieta lisina deficiente (GD) muestra una tasa de crecimiento que supone aproximadamente un 25% de la de la dieta control y un 50% de la dieta con lisina libre.

En cuanto a los índices de utilización nutritiva de la dieta y de la proteína, siguen en líneas generales la tendencia comentada hasta aquí; es decir, mejoran en relación a los

animales que se mantuvieron en agua fría, excepto los producidos por la dieta GC que sufren un ligero empeoramiento. Para Kaushik (1981) esta mejora de la utilización de las dietas con la temperatura, en especial la mejor retención de nitrógeno, se debería más a un efecto del aumento de la ingesta, que a mejoras en el uso digestivo o metabólico de los nutrientes. En este sentido, Shcherbina y Kazlauskene (1971), aunque admiten que el aumento de la temperatura puede mejorar la digestibilidad global de la dieta en carpas, sin embargo, en lo referente a la proteína, sus resultados mostraron que el aumento de temperatura incluso disminuye ligeramente la digestibilidad de la misma. En nuestro caso ocurre justamente lo contrario, el Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la proteína aumenta al hacerlo la temperatura con todas las dietas experimentales, si bien, esta diferencia sólo alcanza la significación estadística en el caso de la dieta deficiente en lisina (GD). Así mismo, también aumenta la digestibilidad de la dieta en su conjunto (Tabla 4.2.6), salvo en el caso de los lotes alimentados con la dieta GB. Este efecto de la temperatura no es un hecho aislado, la mayoría de los autores admiten que la temperatura afecta a la digestibilidad de los nutrientes y a su absorción (Kaushik, 1986). En trucha arcoiris se ha comprobado que aumenta la digestibilidad de los nutrientes cuando la temperatura de cultivo asciende a 18 °C (Cho y Slinger, 1980; Choubert et al., 1982).

Al margen de la mejora más o menos general del crecimiento y de la utilización de los nutrientes de las dietas, el aumento de temperatura ha ocasionado en este experimento que se acentúen las diferencias entre la dieta control y las restantes, lo que sin duda es resultado de un incremento en las necesidades de mantenimiento y un metabolismo más activo (Hofer, 1979; Cho y Slinger, 1980). Estos fenómenos actúan de amplificadores de las diferencias existentes entre la proteína de la dieta control y las del resto, según comentábamos en el caso del experimento anterior. Por lo que se refiere a la acción de la suplementación con lisina libre, ésta sigue siendo eficaz y llega a mejorar en prácticamente un 100% el crecimiento de los animales y la utilización de la dieta, con respecto a la dieta deficiente. La microencapsulación de la lisina sigue dando mejores resultados que adicionarla de forma libre, aunque en este caso las diferencias existentes con los lotes alimentados con las dietas GB y GC se minimizan e, incluso, casi desaparecen en algunos índices. Hay que resaltar que, a diferencia del experimento anterior, los mejores resultados no los proporcionan las microcápsulas de tipo C, sino las de tipo A. Parece evidente, pues, que el aumento de temperatura ha modificado la velocidad de digestión y/o la de absorción de nutrientes (Hepher, 1988; Carneiro, 1992). En estas circunstancias, el retraso en la disponibilidad de la lisina que provocan las microcápsulas de tipo C, no parece ser suficiente para sincronizar la absorción de este aminoácido con el resto de los aminoácidos provenientes de la digestión de la proteína de gluten y, por tanto, los resultados obtenidos con esta dieta, se asemejan a los que produce la dieta con lisina libre. Por el contrario, todo parece indicar que las microcápsulas tipo A provocan un retardo mucho más adecuado a las condiciones de este experimento. Nos parece importante resaltar este último hecho, que no sólo confirma las posibilidades de utilización en este tipo de peces, de la microencapsulación de aminoácidos, como forma de suplementar proteínas carentes de los mismos, sino que abre nuevas

perspectivas en el sentido de que podrían utilizarse distintas cubiertas de microcápsulas para adecuar su efecto, en función de condiciones del cultivo, tales como la temperatura.

En cuanto a la composición corporal de los animales de este experimento (Tabla 4.2.5) no existe ningún hecho especialmente reseñable, salvo una cierta deplección proteica que muestran las carpas de los lotes alimentados con la dieta deficiente en lisina. Como en casos anteriores hay una tendencia al acúmulo de grasa en los tejidos, que en este caso es menor que en el experimento realizado a 18 °C, sin duda debido a que las mayores tasas metabólicas impuestas por la temperatura más alta, suponen un mayor gasto energético en mantenimiento, que no se ve totalmente compensado por el aumento de la ingesta experimentado en estos lotes con respecto a los del experimento anterior.

5.3. INFLUENCIA DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA DIETA Y DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH) EN HÍGADO DE TRUCHA Y CARPA.

La Glutámato Deshidrogenasa es una enzima que, en los peces, se ha considerado clave en el metabolismo proteico. Los peces presentan una cierta predisposición a utilizar las cadenas hidrocarbonadas de los aminoácidos como fuentes de energía (Cho y Kaushik, 1985; Fauconneau et al., 1986), estando conectado el paso final de la degradación de los aminoácidos con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a través de sólo tres parejas de aminoácidos - cetoácidos, siendo una de ellas la formada por glutamato y cetoglutarato (Walton, 1985). Por otra parte, la desaminación en hígado del glutámico mediante la GDH, supone la principal vía de formación de amoniaco en los peces (Cardenete y Moyano, 1988) y, por tanto, no es de extrañar que la determinación de la actividad de esta enzima se haya realizado numerosas veces para utilizarla como indicador de la utilización metabólica de los aminoácidos de la dieta (Cowey et al., 1974; Lupiáñez et al., 1989) y en consecuencia de la calidad de la proteína dietaria (Dean et al., 1985; Moyano et al., 1991). Sin embargo, los resultados no siempre han sido acordes con lo esperado y así, ni en trucha (Moyano et al., 1991), ni en anguila (Ahkarbach, 1995) se han podido establecer correlaciones claras entre esta actividad enzimática y otros índices de calidad proteica. Este parece ser nuestro caso, pues en el experimento 1.4, realizado con truchas, no se aprecia ninguna tendencia definida y las diferencias con significación estadística no parecen tener un sentido claro, aunque para el caso de la dieta control (de mejor calidad proteica, según comentamos) se podría esperar unos niveles de actividad más bajos y quizá lo contrario para la dieta deficiente.

Un comentario similar cabría hacer de la actividad de esta enzima realizada en las carpas. No se aprecian tendencias claras, con independencia de la forma de expresión de los resultados, y las diferencias entre lotes que alcanzan significación estadística son "a priori", difícilmente explicables. Este es el caso de los animales alimentados con la dieta deficiente en lisina, que presentan una actividad enzimática significativamente más reducida que el resto en el experimento realizado a 18°C. La menor ingesta de estos lotes no parece ser la

responsable de este fenómeno puesto que no difiere de otros alimentados con dietas con microcápsulas. De hecho, las ingestas proteicas no son excesivamente diferentes (Tabla 4.2.2). En cualquier caso, puede parecer paradójico que animales que sólo retienen el 7% de la proteína que absorben (VB, Tabla 4.2.6), presenten tasas de desaminación mas bajas que otros que llegan a retener hasta un 38%. Por lo que se refiere a los lotes mantenidos en agua más caliente (Experimento 2.4), tan sólo resaltar el mayor valor de actividad que produce la dieta GC, lo que podría coincidir con su peor utilización a nivel global. Parece pues, una vez más que la actividad de este enzima, al menos considerada de forma aislada, no es demasiado indicativa de la calidad de la proteína o, lo que es lo mismo, no refleja adecuadamente la intensidad del catabolismo aminoacídico, quizás porque haría falta una visión global de la reacción, controlando no sólo los cambios en la cantidad / actividad del enzima, sino los de concentración intracelular de sustrato. En este sentido, las dietas que se emplean en nuestros experimentos son extremadamente ricas en ácido glutámico, el gluten de maíz lo es (Tablas 3.8 y 3.9), y es difícil predecir el grado de interacción que se pueda producir entre esta disponibilidad de sustrato y los cambios que las diferentes calidades proteicas puedan provocar en este enzima (Moyano et al., 1991).

Por último, comentar que considerando globalmente las actividades en el caso de las carpas, se observa una tendencia clara, aunque a veces sin significación estadística, a que esta actividad desaminásica sea mayor en los lotes mantenidos a 18 °C. Estos datos, aunque en principio sorprendentes, concuerdan con los de las actividades proteásicas determinadas en hepatopáncreas, que se comentarán más adelante. Como en ese caso, y tal y como se discute en el apartado correspondiente, parece tratarse de una adaptación compensatoria de la menor actividad metabólica a bajas temperaturas. Así pues, resulta coherente que una mayor actividad proteásica en el tejido, pueda provocar un incremento en la actividad glutamato deshidrogenasa.

En resumen, podríamos considerar que la medida de la actividad GDH en hígado y hepatopáncreas de trucha y carpa respectivamente, no ha proporcionado la información que se esperaba acerca del catabolismo proteico y, por consiguiente, de las distintas calidades proteicas de las dietas, de tal forma que otros factores parecen enmascarar el efecto de los mencionados. Sí parece detectarse, en el caso de las carpas, un cierto grado de influencia de la temperatura sobre este parámetro.

5.4.1. DINÁMICA POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA DE TRUCHA:

La tasa de crecimiento obtenida, cuando los peces son alimentados con dietas en las que parte de la proteína es sustituida por aminoácidos puros, es generalmente inferior a la de aquellos alimentados con dietas de la misma composición, pero con los aminoácidos formando parte de la proteína de la dieta. Tal respuesta se ha visto en carpa (Aoe et al., 1970; Plakas et al., 1980; Murai et al., 1981, 1984; Kaushik y Dabrowski, 1983), pez gato (Wilson et al., 1978), sabalote (Coloso et al., 1988), corvinón ocelado (Moon y Gatlin, 1989), tilapia (Mazid et al., 1978) y trucha (Walton et al., 1986), siendo los resultados más marcados en peces agastros como la carpa y tilapia. Los resultados fueron atribuidos a diferencias en las tasas de absorción de los aminoácidos (Murai et al., 1987; Cowey y Walton, 1988), con una más pronta aparición de aminoácidos en plasma, así como niveles más altos (Yamada et al., 1981a) para las dietas con aminoácidos libres; siendo el exceso de aminoácidos catabolizado o, como se ha demostrado en la carpa, excretado directamente por orina (Murai et al., 1984). Yamada et al. (1981a) observaron que la evacuación gástrica de la trucha era más rápida al ser alimentada con una mezcla de aminoácidos, en parte como consecuencia de la absorción gástrica de los mismos aminoácidos. Si eso es lo que ocurre, después de alimentar a los peces con dietas que contengan gran proporción de aminoácidos puros, lo mismo se debería esperar que ocurriera cuando una fuente de proteína de baja calidad es suplementada y/o equilibrada por adición de aminoácidos libres, cuando el crecimiento obtenido es inferior al que produce la dieta control, como ocurre en los ensayos de suplementación realizados por Ketola (1982).

En diferentes experimentos se ha observado que la sustitución de proteínas de alto valor biológico por proteínas de bajo valor biológico, suplementadas con aminoácidos libres, no mantienen el crecimiento en muchos peces (Cowey y Sargent, 1979; Thebault, 1985) y crustáceos (Deshimaru, 1982; Chen et al., 1992), debido a la absorción más rápida de los aminoácidos libres respecto a los aminoácidos que forman parte de las proteínas como respuesta a esta situación se ha intentado reducir la velocidad de absorción intestinal de los aminoácidos libres envolviéndolos en caseína (Murai et al., 1981), agar (Cho y Woodward, 1985) o mediante microencapsulación (Sierra et al., 1995).

En los resultados de medida de la dinámica postprandial de aminoácidos en trucha y carpa, hemos observado diferencias notables, en cuanto al tiempo de aparición de las máximas concentraciones de aminoácidos, así como del efecto de retraso que produce el tipo de encapsulado, y también las diferencias provocadas por efecto de la temperatura del agua. Han sido variados los trabajos realizados en este tema, y las especies investigadas incluyen la trucha arcoiris (Nose, 1972; Schlicio y Nicolai, 1978; Yamada et al., 1981; Walton y Wilson, 1986), carpa (Murai et al., 1982; Plakas et al., 1980), tilapia (Yamada et al., 1982), pez gato (Wilson et al., 1985) anguila japonesa (Hayashi et al., 1982) y lubina (Thebault, 1985). Los resultados de estos estudios tienden a demostrar que existen diferencias entre

especies, aunque en gran parte debidas a los distintos diseños experimentales y temperaturas utilizadas. Si la evacuación gástrica se considera un importante factor en la regulación de la digestión proteica y posterior absorción de aminoácidos, es importante conocer que también puede verse afectada por la temperatura (Grove et al., 1978; Schade, 1982), tamaño del pez (Grove et al., 1978; Bromley, 1987), régimen de alimentación, composición de la dieta, etc. La densidad calórica de la dieta, por ejemplo, ha demostrado su capacidad para retrasar directamente el vaciamiento gástrico (Jobling, 1980).

Los resultados de la medida de las concentraciones de aminoácidos en plasma de trucha y carpa, tras la ingesta de las dietas experimentales, en las cuales el aminoácido estudiado (lisina) está adicionado en forma libre o bajo tres tipos de encapsulado, o bien formando parte de la proteína como en el caso de las dietas control y deficiente, confirman que la absorción es relativamente más lenta en especies de agua fría, como la trucha, que en peces de agua templada como la carpa. Este fenómeno, la relación de la absorción de nutrientes y la temperatura, ha sido investigado en profundidad. La aclimatación a una subida de temperatura implica un incremento en la absorción de nutrientes (Groot et al., 1983). Así mismo la evacuación gástrica y la velocidad de tránsito se incrementan con el aumento de la temperatura en la mayoría de teleosteos (Fange y Grove, 1979; Fauconneau et al., 1983). En comparación con la carpa, la absorción más lenta observada en trucha parece ser debida al efecto de la temperatura.

En nuestros ensayos con truchas, los valores máximos de concentración se obtuvieron entre las 12-14-16 horas después de la ingestión de la dieta. Walton y Wilson (1986) observaron que las concentraciones comenzaban a elevarse a partir de las dos horas después de la ingesta de una dieta de caseína, obteniendo los niveles más altos de aminoácidos a las 12 horas, y retornando a las concentraciones basales a las 24 horas. Nuestros resultados estarían en consonancia con los obtenidos por Walton y Wilson, con la diferencia de que los valores máximos se alcanzan algo después, en torno a las 14 horas. Esta diferencia puede haberse debido a la diferente composición de la dieta, o a la temperatura, 11°C en el experimento de Walton y Wilson y 15°C en nuestro caso). Según Dabrowski y Dabrowska (1981), en la trucha arco iris, la proporción en que cada aminoácido individual es absorbido, en cada zona del intestino, depende del tipo de proteína dietaria; lo que sugiere que la estructura primaria de cada proteína afecta a su tasa de digestión (Ash, 1985) y, por tanto, a la disponibilidad de los aminoácidos que libera en cada momento o lugar del tracto digestivo. Posteriormente, Dabrowski (1983) estudió en la carpa la diferente absorción de la proteína procedente de harina de pescado o de harina de soja, y encontró un distinto patrón de aminoácidos resultante de la más lenta absorción de la proteína de soja. Esta provocaba una concentración más baja de aminoácidos en el digestivo y una más baja absorción aparente, al compararla con lo que se producía en los animales alimentados con harina de pescado. Las diferencias en el patrón de aminoácidos absorbidos serían debidas a que la proteína vegetal (soja) fue peor digerida y menos eficientemente absorbida que la animal (harina de pescado).

Los máximos de concentración de lisina en plasma se obtuvieron a diferentes horas según el tipo de dieta ingerida. La dieta deficiente en lisina (G-D) produjo un pico de absorción entre las 12 y 16 horas. La suplementada con lisina encapsulada tipo A (G-A) presentó una pequeña subida a las 8 horas y otra mayor entre las 14 y 16 horas. La proximidad del primer pico (8 h) al de la dieta con lisina libre, (10 h.) nos hace pensar que parte de la lisina de los encapsulados estaba libre, absorbiéndose antes que el resto de la lisina suplementada y que estuvo encapsulada. La segunda elevación de los niveles plasmáticos fue mucho mayor que la primera y coincidió con la de Lys "proteica" ya que resultó un pico mayor que cuando los animales se alimentaron con dietas no suplementadas (control y deficiente). Cuando la suplementación se hizo con lisina encapsulada tipo B (G-B) se produjo una pequeña subida a las 8 horas (que la explicaríamos de la misma forma que en el caso de la G-A) y otra mayor entre las 12 y 14 horas, cuyos niveles presentan una "meseta", con niveles altos de Lys durante dos horas, coincidiendo con los máximos niveles de concentración de los AAE. La suplementada con el encapsulado tipo C (G-C) produjo una subida a las 8 (correspondiente a la de lisina libre y otra a las 14-16 horas, coincidiendo con los valores máximos de AAE y AAT. Aunque el perfil aminoacídico parece bueno no nos explicamos por qué estos animales no aprovecharon esta dieta más eficientemente. Con la suplementada con lisina libre (G-L) se produjo una subida mayor entre las 8 y 10 horas que correspondería a la lisina suplementada de forma libre, y otra subida leve entre las 14 y 16 horas, debida a la lisina "proteica". Los niveles de lisina en plasma, de los animales alimentados con la dieta deficiente, han sido muy bajos, sin presentar subidas sustanciales en el periodo de tiempo analizado, tan sólo una cierta elevación se mostró entre las 12 y 16 horas, posiblemente pertenecientes a las fuentes proteicas empleadas ya que coinciden con los máximos de AAT y AAE. A las 24 horas los niveles de aminoácidos alcanzaron valores basales en todos los casos.

Los máximos niveles plasmáticos de lisina obtenidos en los experimentos realizados con la trucha por Walton y Wilson (1986) se produjeron a las 4 horas después de la ingestión de una dieta de caseína, frente a otros AAE que lo hicieron a las 12h; retornando la lisina a niveles basales entre las 8-12 h, mientras que otros AAE no lo hicieron hasta las 48 horas. Esto concuerda con nuestros resultados ya que la lisina medida en nuestras truchas, aparece antes (10 h) que el máximo de la suma de AAE.

En las figuras presentadas en el apartado de resultados (4.1.3. a y b en pag.105), se puede observar que las formas de encapsular la lisina han provocado un retraso en su aparición en plasma. La microcapsula que dió mejores resultados de crecimiento (tipo B), se ha visto que es la que ha provocado una mayor coincidencia del perfil de lisina con el de la suma de AAE, dando lugar así a un mejor patrón aminoacídico en sangre y posiblemente también, en los lugares de síntesis. En cuanto a la dieta con lisina libre, el pico de lisina obtenido en la trucha a las 10 horas no estuvo muy alejado de los correspondientes a la suma de AAT y AAE (12 horas) debido a la más lenta absorción en esta especie, lo que puede

explicar el que estos animales crezcan mejor que otras especies con dietas que contienen aminoácidos libres .

Si relacionamos la dinámica de aminoácidos con el crecimiento observamos que no ha habido diferencias significativas en la tasa de crecimiento de las truchas alimentadas con las dietas suplementadas con lisina encapsulada o libre, mejorando en todos estos casos a la dieta no suplementada.

Existe bastante controversia actualmente en cuanto a las posibilidades reales de utilización de aminoácidos esenciales libres añadidos a la dieta, por las distintas especies de peces. Se admite de manera general que los salmónidos absorben y utilizan bien los aminoácidos libres de la dieta (Ketola, 1982; Murai et al., 1987), mientras que otras especies, como la carpa, muestran una menor capacidad (Kaushik y Dabrowski, 1983).

En las figuras 4.1.3 b y c, se representan la dinámica posprandial de la suma de aminoácidos esenciales (AAE) y totales (AAT). Para todas las dietas la tendencia que presentan los AAT es a subir por encima de los niveles basales a partir de las 12 horas, con máximos entre las 14 y 16 horas y bajadas posteriores hasta las 24 horas, presentando ya concentraciones próximas de nuevo a las basales. Los AAE siguieron la misma tendencia con la diferencia de que los máximos se alcanzaron a las 14 horas bajando hasta niveles basales a las 24 horas. Todas las dietas presentaron esta dinámica, como consecuencia a la absorción de los aminoácidos procedentes de las fuentes proteicas de la dieta (gluten de maiz y harina de pescado, ésta última en menor proporción).

5.4.2.DINÁMICA POSTPRANDIAL DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA DE CARPA:

Los niveles de aminoácidos libres en plasma (Lys, AAE y AAT) de las muestras tomadas a distintos tiempos después de la ingestión de la dieta correspondiente (hora cero) se localizan en la Tabla 4.2.7.y Figuras 4.2.3.a, b, c, d y f.

La diferente temperatura a la que se mantuvieron los animales, 18°C y 25°C, ha producido cambios en la dinámica postprandial de aminoácidos en plasma de carpa. La mayor temperatura condicionó una más rápida absorción de los aminoácidos y la consiguiente más rápida aparición de los máximos de sus concentraciones en plasma, estando en consonancia con lo dicho anteriormente de que la aclimatación a una subida de temperatura implica un incremento en la absorción de nutrientes (Groot et al., 1983) y que la evacuación gástrica y la velocidad de tránsito se incrementan con el aumento de la temperatura en la mayoría de los teleosteos (Fange y Grove, 1979; Fauconneau et al., 1983).

Los máximos de aparición de lisina en plasma se obtuvieron a tiempos diferentes según el tipo de dieta ingerida. A la temperatura de 18°C, la dieta control produjo una subida

lenta entre las 2, 4 y 6 horas, probablemente por proceder de la proteína de la dieta. La dieta deficiente en lisina (G-D), presentó unas concentraciones bajas de lisina en todo momento, apoyando la afirmación de la relación existente entre las concentraciones de aminoácidos en dieta y plasma (Nose, 1972; Plakas et al., 1980; Murai, 1982; Ogata, 1986 y Walton y Wilson, 1986). Cuando la dieta se suplementó con lisina encapsulada tipo A (G-A) se produjo un máximo a las 2 horas, más alto que el provocado por la dieta control. La dieta suplementada con lisina encapsulada tipo B (G-B) produjo subidas entre las 2, 4 y 6 horas. No se comprende por qué no han crecido más, debido a esta buena dinámica que presentan. Con la dieta suplementada con lisina encapsulada tipo C (G-C) las máximas concentraciones se alcanzaron a las 2 horas (con niveles mayores a la control), presentando niveles plasmáticos adecuados de lisina. Todas las dietas que incorporaron microcapsulas, superaron a la dieta suplementada con lisina libre en cuanto a crecimiento. Esto pudo ser debido a las mejoras provocadas en la dinámica de aminoácidos en sangre, que fueron parecidas a la dieta control. La suplementada con lisina libre (G-L) produjo máximos niveles a la hora y mínimos a las 4 horas que fueron los más bajos de todas las dietas.

En las carpas mantenidas a la temperatura de 25°C, la aparición de aminoácidos en plasma se adelantó respecto a las carpas mantenidas a 18°C. Para la dieta control las subidas se produjeron entre las 1 y 2 horas (lisina proveniente de la proteína de la dieta) y, a pesar de que la suma de AAE presentó máximos entre las 2-4 horas, la lisina lo hizo de las primeras. La dieta deficiente en lisina (G-D) presentó unos niveles de lisina muy bajos en todo momento con una pequeña subida a la hora, siendo ésto similar a lo ocurrido para las truchas alimentadas con este tipo de dieta. En la dieta suplementada con lisina encapsulada tipo A (G-A) los máximos se presentaron a la hora, alcanzando un nivel más alto que el provocado por la dieta control, y permaneciendo aún altos a las 2 horas. Para el caso de la dieta suplementada con lisina encapsulada tipo B (G-B) se produjo una pequeña subida a la 1/2 hora y otra mayor a las 2 horas, por lo que suponemos que el primer pico fue provocado por la lisina que no formó un encapsulado completo. La dieta suplementada con lisina encapsulada tipo C (G-C) presentó una subida a la 1/2 hora, que fue más alta que las de las dietas control, G-A y G-B. Finalmente, la suplementada con lisina libre (G-L) provocó un pico a la 1/2 hora. Plakas y Katayama, (1981) han demostrado que los aminoácidos, procedentes de una dieta que los contiene en forma libre, se absorben más rápidamente que cuando la dieta los contiene como caseína. Además, observaron que los aminoácidos eran retirados del plasma más rápidamente cuando la carpa ingeriere una dieta con aminoácidos libres, que cuando se alimenta con una dieta a base de caseína (Plakas et al, 1980). A las 24 horas como en nuestros ensayos los niveles de aminoácidos alcanzaron valores basales, en todos los casos. Hubo una pequeña subida a las 12 horas, posiblemente al apagarse la luz del acuario, que estaría de acuerdo con las afirmaciones de Carrillo et al. (1980) que, al medir los ritmos diurnos de aminoácidos en el plasma del pez dorado, observaron que todos los aminoácidos, excepto Val, Lys, y Tyr, cambiaban su concentración a lo largo del día. La concentración de Ser, Arg, Asp, Met, Glu, Ile y His dependían del fotoperíodo, alcanzándose la concentración máxima al llegar el período de oscuridad. Por tanto, factores ambientales,

como la luz, también deben ser tenidos en cuenta a la hora de estudiar la dinámica de aminoácidos en plasma, en relación al tipo y calidad de la dieta.

En la carpa, si los aminoácidos añadidos no se protegen adecuadamente, parece existir una asincronía entre las tasas de absorción y utilización de éstos y las de los aminoácidos procedentes de la digestión de las proteínas, con la consiguiente falta de disponibilidad simultánea necesaria para la síntesis proteica (Cowey y Walton, 1988).

Los principales hallazgos de todos estos estudios demuestran que, después de ser alimentados con dietas conteniendo proteínas completas, las concentraciones de aminoácidos, en sangre de especies de agua caliente (carpa, tilapia y pez gato), alcanza niveles máximos más rápidamente que las especies de agua fría (trucha arcoiris) (Nose, 1972; Schlisio y Nicolai, 1978; Plakas et al., 1980; Walton y Wilson, 1986). Los tiempos requeridos, para restablecer las concentraciones iniciales, también eran más cortos en las especies de agua caliente (Schlisio y Nicolai, 1978; Plakas et al., 1980); estas diferencias son probablemente debidas al efecto de la temperatura sobre la velocidad y eficacia de los procesos digestivos. De esta forma, en carpas alimentadas con una dieta basada en caseína, la concentración de aminoácidos en plasma aumentó al nivel máximo 4 horas después de comer, volviendo a niveles de ayuno a las 8-16 horas (Plakas et al, 1980). En pez gato (Wilson et al, 1985) y tilapia (Yamada et al, 1981), la concentración de aminoácidos en suero comenzó a aumentar a las 2 horas de la comida, manteniéndose alta hasta las 12 horas, para volver a los niveles de ayuno a las 24 horas. En contraste, truchas arcoiris alimentadas con dietas a base de harina de pescado (Nose, 1972) o caseína (Walton y Wilson, 1986), presentaron un nivel máximo de concentración de aminoácidos a las 12 horas después de la comida, en tanto que los niveles de ayuno no se restablecieron hasta las 48 horas.

En carpas alimentadas con una dieta a base de proteína completa (caseína), la concentración máxima se alcanzó a las 4 horas, salvo en el caso de la Arg, que lo hizo a las 2 horas (Plakas et al, 1980). Cuando se les alimentó con una dieta a base de aminoácidos puros, la mayoría de ellos alcanzó los niveles máximos entre las 2 y las 4 horas, estando de acuerdo con los tiempos obtenidos en nuestros ensayos; sin embargo, ciertos aminoácidos, (Arg, Lys, His, Met y Phe) lo hicieron a las 2 horas (Plakas et al, 1980) adelanto que también apoyaría nuestros resultados. Murai et al. (1982), en carpas y con una dieta de caseína-gelatina, obtuvo la máxima concentración de aminoácidos totales en plasma entre las 3 y 4 horas, y cuando la dieta consistió en una mezcla de gelatina y aminoácidos la concentración más alta, en el total de aminoácidos, se adelantó a 1-1.5 horas.

La diferente eficacia, en el uso de aminoácidos libres, de unas especies frente a otras, parece deberse, al menos en parte, a la diferente relación entre los tiempos de absorción de aminoácidos libres/proteicos, respectivamente: 2.5/4.5 horas para la carpa (Plakas et al., 1980), 2/4 horas para tilapia (Yamada et al., 1982) y 12/ 24-36 horas para la trucha (Yamada et al., 1981a), 3-4/6 horas para la trucha (Murai et al., 1987).

Murai et al. (1981) fueron capaces de obtener crecimientos comparables en alevines de carpa alimentados con una dieta de gelatina suplementada con aminoácidos esenciales recubiertos de caseína y una dieta control de caseína-gelatina. Los peces alimentados con una dieta a base de aminoácidos recubiertos o encapsulados de caseína lograron mejorar, en más de 4 veces, el crecimiento y, en 2 veces, la eficacia de conversión de alimento respecto a los que ingirieron una dieta de gelatina suplementada con el mismo nivel de aminoácidos libres. Estos investigadores sugieren que la mejora en el crecimiento habría que atribuirla al retraso de la absorción de los aminoácidos cubiertos con caseína, que se liberarían aproximadamente al mismo tiempo que los procedentes de la digestión de la proteína de la dieta, dando como resultado una mayor coincidencia de todos ellos y, por tanto, del "pool" de aminoácidos adecuado para una síntesis proteica óptima.

El apoyo a esta hipótesis se obtuvo por comparación de los cambios postprandiales en aminoácidos libres como Trp y Leu en plasma, después de la ingestión de dietas que contenían caseína con aminoácidos cubiertos y no cubiertos (Murai et al, 1982b). La mejora en la tasa de crecimiento obtenida por revestimiento con caseína, de los aminoácidos libres de la dieta (Murai et al., 1981, 1982), fue atribuida a la mejora en el patrón disponible de ciertos aminoácidos en plasma, como resultado de minimizar la variación en las tasas de absorción de algunos aminoácidos, dando lugar a una simultánea disponibilidad de aminoácidos para la síntesis proteica. Estos resultados muestran la importancia de un balance adecuado de aminoácidos, para asegurar una eficiencia óptima en la utilización nutritiva de la proteína.

En contraste con los resultados obtenidos por Murai et al. (1982), Cowey y Walton (1988), mediante incorporación a la dieta de aminoácidos o proteína marcados, observaron que la aparición de aminoácidos en plasma podía retrasarse al recubrirlos con albúmina, acercándose los tiempos de disponibilidad plasmática a los de los aminoácidos procedentes de la digestión de la proteína entera de la dieta. Los aminoácidos marcados procedentes de la dieta en que se encontraban recubiertos con albúmina, también permanecieron más tiempo (24 h), mostrando tasas de absorción más lentas que facilitaron la utilización de los aminoácidos para la síntesis de proteínas plasmáticas en el hígado.

Por otra parte, Teshima et al. (1986) observaron que el crecimiento de larvas de langostino (*P.japonicus*) alimentadas con dietas microparticuladas suplementadas con arginina libre era comparable al obtenido con alimento vivo, pudo ser debido al uso de carragenato como aglutinante de la dieta que produjera el mismo efecto que un microencapsulado. Hew y Cuzon (1982) demostraron que la suplementación con lisina de dietas de caseína-gelatina tenía un efecto positivo en el crecimiento de juveniles de langostino; sin embargo, la misma dieta con arginina no tuvo el mismo efecto. Pero Teshima et al. (1992) con la adición de metionina a dietas de soja-gelatina no mejoró el crecimiento de juveniles de langostino que suponen debido a una baja palatabilidad de dichas dietas. Deshimaru (1981) tampoco obtuvo mejoras en el crecimiento de éstos animales al suplementar dietas de caseína-albúmina con

arginina.

Si los peces se alimentan con una dieta nutricionalmente completa, excepto para uno de los aminoácidos esenciales, entonces ocurren varias respuestas bioquímicas. Brookes et al. (1972) y Lewis et al. (1977) mantienen que animales alimentados con dietas que contienen niveles de un aminoácido esencial por debajo de sus necesidades, una alta proporción de ese aminoácido se utilizaría para síntesis proteica, por lo que su concentración tisular y su utilización metabólica sería baja. Estos modelos de respuesta se han observado al determinar las concentraciones séricas de Met, Lys y Thr en el pez gato (Wilson et al., 1977, 1978; Hardin et al., 1977) y a nivel muscular para la Arg en la trucha (Kaushik, 1979). Sin embargo, esta tendencia no se observó para las concentraciones séricas de His, Arg, Phe, Leu y Val (Wilson et al., 1980) ni para la Lys en otro estudio realizado en el pez gato (Robinson et al., 1980, 1981), ni cuando se consideran los niveles plasmáticos o hepáticos de Arg, Lys y Trp en la trucha (Walton et al., 1984a, b, 1986).

Varios investigadores han demostrado las posibilidades de la suplementación de proteínas deficientes con aminoácidos libres, para su aplicación en dietas prácticas para peces. Rumsey y Ketola (1975) encontraron que la suplementación de una dieta que contenía harina de soja como única fuente proteica, mejoró sensiblemente el crecimiento de la trucha arcoiris. Sin embargo, la adición de Met, Lys, His y Leu, individualmente o en varias combinaciones, siempre cubriendo las necesidades teóricas de la trucha, no tuvo efecto. Similares resultados se observaron en el salmón atlántico (*Salmo salar*) (Ketola, 1982). Otros investigadores han obtenido también mejoras del crecimiento, mediante la suplementación de dietas prácticas con aminoácidos esenciales, en la trucha arcoiris (Tiews et al, 1976; Dabrowska y Wojno, 1977) y la carpa común (Murai et al, 1982a, 1986; Viola et al, 1982).

En el pez gato, los primeros ensayos fueron incapaces de demostrar la utilidad de la suplementación aminoacídica (Andrews y Page, 1974; Andrews et al, 1977); sin embargo, estudios posteriores han demostrado la utilización de la lisina empleada en la suplementación de dietas de harina de cacahuete (Robinson et al, 1980b) y de la metionina suplementada en dietas a base de harina de soja (Murai et al, 1982a).

A lo largo de esta discusión se han comentado las posibilidades de mejorar la disponibilidad postprandial de los aminoácidos que, con distintos fines, se incluyen en fórmulas experimentales y comerciales para peces. Una alternativa muy versátil es la de encapsular los aminoácidos con cubiertas de composición y grosor variable. Con estos fines, se abordaron estos ensayos y, como resultado, se seleccionó la microcapsula o encapsulado tipo A para carpas y tipo B para truchas, con el objeto de aprovechar sus efectos sobre el retraso de la aparición postprandial de la lisina, empleada en la suplementación de proteína de gluten. La disponibilidad de lisina, ajustada a la evolución postprandial de los aminoácidos "proteicos", debe mejorar sensiblemente el patrón aminoacídico que presenta la proteína de gluten sin suplementar. Un más adecuado patrón, a nivel de los lugares de síntesis proteica,

debe traducirse en una mejora de la utilización nutritiva de la proteína para crecimiento. El aspecto práctico de ésta forma de suplementación, junto al estudio del recambio proteico tisular, como mecanismo básico de crecimiento dependiente de la disponibilidad de aminoácidos, serán objeto de discusión y análisis en las páginas siguientes.

5.5. INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN DE PROTEÍNA DE GLUTEN CON LISINA LIBRE O ENCAPSULADA SOBRE EL RECAMBIO PROTEICO EN HÍGADO Y MÚSCULO BLANCO DE LA TRUCHA Y DE LA CARPA.

5.5.1. Influencia de la temperatura sobre el recambio proteico hepático y muscular de la carpa

La mayoría de las publicaciones, que describen los efectos de la temperatura sobre la fisiología, metabolismo y crecimiento, se han limitado a considerar peces adaptados a una determinada temperatura pero mantenidos con alimentación *ad libitum*. Este diseño no es el ideal, sobre todo teniendo en cuenta que, a través del efecto de la temperatura sobre la ingesta (Jobling, 1988), los resultados obtenidos pueden estar notablemente influenciados por el tamaño de ración. En lo que respecta al recambio proteico tisular, se sabe que la menor ingesta de proteína y energía (Peragón et al., 1994), así como una disminución del tamaño de la ración (von der Decken y Lied, 1989) reduce la síntesis proteica muscular; por el contrario, el aumento de la ración, desde el 1 al 4% del peso corporal, aumenta linealmente el recambio proteico (síntesis y degradación), con un incremento progresivo de la retención de proteína y del crecimiento (Houlihan et al., 1989). Para evitar problemas de interpretación de resultados, ambos grupos de carpas, aclimatadas previamente (60 días) a temperaturas de 18 y 25°C, fueron mantenidas, durante las 3 semanas del ensayo, con una alimentación pareada (en g/100g de peso corporal).

La disminución del contenido de ADN, en hígado y músculo blanco, y el aumento de la concentración de ARN hepático y en menor medida muscular, por aclimatación de la carpa a la temperatura de 18°C, asociada a una mayor capacidad de síntesis (C_s : mg ARN/g proteína), significativa para todas las dietas en hígado y sólo para la soja suplementada con lisina libre en músculo, tendría el sentido de compensar la menor actividad de transducción (K_{RNA}) registrada a la temperatura más baja. Simultáneamente, la mayor relación ARN/ADN, observada a 18°C, está indicando un aumento de la capacidad transcripción por unidad celular, tanto a nivel hepático como muscular, que contribuye a llegar a la conclusión de que se ha producido un proceso de aclimatación compensatorio al disminuir la temperatura, con el objeto de asegurar el suministro de proteínas funcionales y estructurales en circunstancias de presumible menor actividad metabólica.

Un aumento de la síntesis de glucoproteínas, de carácter anticongelante, ha sido observada en peces polares, cuando la temperatura cae por debajo de 0°C, y que depende de la síntesis de ARN-m específico cuyo contenido aumenta notablemente (Pickett et al., 1983). La compensación de la síntesis proteica con una menor temperatura, aunque fué demostrada *in vitro* (Haschemeyer, 1969; Kent y Prosser, 1980; Jankowsky et al., 1981) e *in vivo* (Haschemeyer, 1968; Das y Prosser, 1967), en varias especies, no pudo ser demostrada en trucha (Owen, 1975) o carpa (Saez et al., 1982) mediante estudios *in vitro*. Dicha compensación tampoco ha sido observada en *Opsanus tau*, tras la valoración de la velocidad fraccional de síntesis (K_s), por administración de una dosis amplia de fenilalanina marcada, donde la K_s , a una temperatura de 10°C, presentó valores seis y tres veces inferiores, en hígado y músculo esquelético respectivamente, frente a los valores obtenidos a 20°C (Pocrnjic et al., 1983). En nuestro estudio, la menor diferencia entre los valores de K_s , en el hígado y músculo blanco de la carpa, para ambas temperaturas (0,7-0,8 y 2-3 veces mayor a 25°C, respecto a los valores a 18°C), podría indicar un cierto efecto compensatorio en la carpa, cuyo posible mecanismo se discute en este apartado, o también una diferente sensibilidad a la temperatura, en función de que ingieran (carpa) o no (*Opsanus tau*) alimento. En este sentido, se puso de manifiesto la influencia de la aclimatación a la temperatura sobre la síntesis proteica muscular en truchas bien alimentadas (Fauconneau et al., 1981).

Parece lógico que la demostración de la existencia o no de un mecanismo, que compense la menor tasa de síntesis proteica a bajas temperaturas con una mayor capacidad para la síntesis, contemple la medida de la síntesis de proteínas a distintas temperaturas, en peces aclimatados a dos temperaturas extremas. Con este planteamiento de diseño experimental, Watt et al. (1988) demostraron, en carpas aclimatadas a 8 y 28°C, que para un rango de temperaturas, comprendido entre 8 y 34°C, la tasa de síntesis proteica en músculos blanco y rojo era, para cada temperatura, superior en las carpas aclimatadas a 8°C, e independientemente de que las carpas estuvieran bien alimentadas o en ayuno. Hay que subrayar que la síntesis, medida a las mismas temperaturas de aclimatación, fué superior en las carpas aclimatadas a 28°C, lo que enfatiza la importancia de este diseño para demostrar respuestas adaptativas de tipo compensatorio.

La disminución de la temperatura ambiental, respecto a los valores óptimos para la carpa considerados alrededor de 25°C, produjo una disminución significativa del recambio proteico en hígado y músculo. En estudios recientes realizados en bacalao aclimatados a 5 y 15°C, y alimentados con una ración similar que descarta la influencia de la cantidad de ingesta, no se observaron diferencias significativas, después de 40 días de aclimatación, en la síntesis proteica de ventrículo, estómago, intestino y branquias. La falta de resultados, en relación al comportamiento del hígado y músculo del bacalao, no nos permite profundizar en el posible diferente comportamiento de ambas especies. En la carpa se observó una tendencia al aumento del contenido hepático y muscular de ARN, en las carpas alimentadas a 18°C, al igual que se había observado en los citados tejidos del bacalao (Houlihan et al.,

1993). Según hipótesis de Goolish et al. (1984), el aumento de ARN tisular, en carpas aclimatadas al agua fría, compensaría una reducción en la actividad de transducción del ARN a bajas temperaturas. La reducción de la eficiencia de síntesis proteica o capacidad de transducción (K_{RNA} : g proteína sintetizada/día/g ARN), en hígado y músculo de las carpas mantenidas a 18°C, apoyaría la citada hipótesis; es decir: una menor capacidad de transducción o eficacia del proceso (K_{RNA}), al disminuir la temperatura, tiende a compensarse con una mayor concentración tisular de ARN.

A pesar de una cierta actividad compensatoria, la síntesis proteica (K_s) hepática y muscular fue mayor en las carpas mantenidas a 25°C. Este resultado coincide con las determinaciones realizadas por Watt et al. (1988), a la misma temperatura a la que se encontraban aclimatadas las carpas, que no muestran compensación hasta que las determinaciones, de carpas aclimatadas a 8 y 28°C, no se hagan a una misma temperatura. Además, se ha observado un aumento del transporte de aminoácidos (Haschemeyer, 1968; Persell y Haschemeyer, 1980), así como de la velocidad de elongación de las cadenas polipeptídicas (Mathews y Haschemeyer, 1978; Haschemeyer y Mathews, 1982) y del contenido del factor de iniciación EIF₁ (Harmon et al., 1984) al aumentar la temperatura ambiente, lo que se traduce en una mayor velocidad de síntesis proteica, tanto *in vitro* (Saez et al., 1982; Pannevis y Houlihan, 1992) como *in vivo* (Pocrnjic et al., 1983). De forma general se puede decir que la velocidad de síntesis aumenta con la temperatura, con Q_{10} de 2,5, como ha sido sugerido para peces por Fauconneau (1985). Existe evidencia reciente que sugiere que un aumento de la temperatura del agua puede producir un aumento de los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento (Barrett y McKeown, 1989; Bjornsson et al., 1989), lo que contribuiría a estimular la síntesis proteica tisular.

5.5.2. Recambio proteico hepático y muscular en trucha y carpa

El recambio proteico hepático, tanto en trucha como en carpa, e independientemente de la temperatura, fue mayor que en músculo blanco. Los parámetros indicativos de la velocidad fraccional de síntesis y degradación (K_s y K_D), así como la capacidad de síntesis (C_s : mg ARN/g proteína) fueron superiores en el hígado; sin embargo, la eficacia de la retención proteica (ERP: $(K_G/K_S) 100$) fue mayor en el músculo. Estos resultados eran de esperar teniendo en cuenta que el hígado es un tejido regulador, en el que la fracción del recambio destinada a mantener las funciones orgánicas es mayor que la invertida en crecimiento, de ahí su mayor K_s y C_s y menor ERP (hasta el 10,26% en carpa y hasta el 11,54% en la trucha). El músculo, por el contrario, es el mayor depósito proteico asociado al crecimiento y la proporción retenida, de la proteína sintetizada, es muy alta (hasta el 81,44% en la carpa y hasta el 99,24% en la trucha). La mayor velocidad fraccional de síntesis de proteínas en el hígado, respecto al músculo blanco, es un hecho observado en todas las especies de peces estudiadas por distintos grupos (Pocrnjic et al., 1983; Houlihan et al., 1986, 1988; McMillan y Houlihan, 1989; Peragón et al., 1992, 1994; Akharbach,

1995; Sierra, 1995). El músculo esquelético, especialmente el músculo blanco, es el tejido más eficiente en términos de retención proteica y su K_s está directamente relacionada con la velocidad de crecimiento (Houlihan et al., 1988), presentando una clara sensibilidad a la etapa de desarrollo (Peragón, 1993) y a dietas cuya disponibilidad de aminoácidos condiciona el crecimiento, como ha sido observado en trucha (Fauconneau, 1985; Peragón et al., 1992, 1994), anguila (Akharbach, 1995) y dorada (Sierra, 1995).

En células eucariotas, la velocidad de síntesis proteica es función del número y actividad de los ribosomas, en un determinado tejido (Pain y Clemens, 1980). En consecuencia, una mayor K_s debe estar relacionada con una mayor concentración tisular de ARN-r y, de hecho, las concentraciones de ARN se han relacionado con la velocidad de crecimiento de los peces (Bullow, 1987; Busacker et al., 1990). Al ser el ARN-r mayoritario, un 85% del total según Sugden y Fuller (1991), tanto en peces (Leipoldt et al., 1984) como en mamíferos (Reeds, 1987), el contenido total de ARN se utiliza como estimación de la síntesis proteica tisular (Millward et al., 1981; Preedy et al., 1988). Una interrelación directa entre ingesta, K_s y concentración tisular de ARN ha sido establecida recientemente en peces marinos (Houlihan et al., 1989, 1993) y de agua dulce (McMillan y Houlihan, 1992). La mayor concentración de ARN en el hígado de la anguila (Akharbach, 1995), dorada (Sierra, 1995) y trucha (Peragón et al., 1992, 1994) está asociada a una mayor K_s hepática, respecto a los valores detectados en músculo blanco, lo que coincide con los resultados obtenidos para trucha y carpa en este trabajo.

Las formas más adecuadas de relacionar el contenido tisular de ARN con la velocidad de síntesis (K_s), son la capacidad (C_s) y eficacia ($K_{RNA}: (K_s/C_s)100$) del proceso. El mayor contenido de ARN en hígado de carpa y trucha está directamente relacionado con una mayor velocidad (K_s), capacidad (C_s) y eficacia (K_{RNA}) de la síntesis proteica, respecto a los valores registrados en músculo blanco. En este sentido, se expresan también los resultados obtenidos en trucha (Fauconneau et al., 1990; McMillan y Houlihan, 1988, 1989; Peragón et al., 1992, 1994), anguila (Akharbach, 1995) y dorada (Sierra, 1995).

5.5.3. Influencia de la deficiencia de lisina sobre el recambio proteico hepático y muscular de trucha y carpa

La deficiencia de un aminoácido esencial limita la síntesis proteica a las disponibilidades del aminoácido que está en menor proporción. La síntesis proteica requiere que todos los aminoácidos estén presentes, simultáneamente, en los lugares de síntesis y en cantidades adecuadas. En consecuencia, una deficiencia limitaría la respuesta de crecimiento a las disponibilidades del aminoácido esencial más limitante, siendo catabolizado el resto que excede la capacidad del proceso.

En la trucha, la deficiencia de lisina produjo un retraso en la velocidad de crecimiento (K_G), debido tanto a una disminución significativa de la velocidad de síntesis (K_S) como al aumento asociado de la velocidad de degradación (K_D). Estos cambios tuvieron lugar en músculo blanco, el tejido que mejor representa la velocidad de crecimiento en relación al recambio proteico (Houlihan et al., 1988; Peragón, 1993); sin embargo, el hígado, por su carácter de tejido regulador, no experimentó cambios significativos en las velocidades de recambio. Una menor K_S muscular ha sido observada también en la anguila (Akharbach, 1995) y dorada (Sierra, 1995), en respuesta a dietas deficientes en varios aminoácidos (lisina, metionina, histidina y treonina) y metionina respectivamente. La respuesta del hígado de trucha fue similar a la de la dorada (Sierra, 1995), especies en las que no se produjo una alteración significativa del recambio proteico en respuesta a la deficiencia de un aminoácido esencial.

En carpa, la deficiencia de lisina condicionó también un retraso de la velocidad de crecimiento, en ambas temperaturas (18 y 25°C), a través de una disminución de la velocidad fraccional de síntesis proteica muscular. Es conocida la estrecha relación entre K_S de músculo blanco y crecimiento (Houlihan et al., 1988; Peragón, 1993). La velocidad de degradación cursó de forma opuesta, de tal forma que, en respuesta a la deficiencia, la K_D muscular aumentó o se mantuvo, a 25 y 18°C respectivamente, mientras que, en relación a K_S , aumentó para las dos temperaturas. En hígado, sin embargo, el comportamiento del recambio proteico fue diferente y en función de la temperatura ambiente. A 18°C el hígado de la carpa experimentó un aumento de las velocidades de síntesis y degradación, mientras que a 25°C la deficiencia provocó una disminución de ambos parámetros.

La limitación de la síntesis proteica por deficiencia aminoacídica ha sido demostrada *in vitro*, en distintos tipos de células (Jagus et al., 1981). En hepatocitos de rata, la deficiencia produce una menor velocidad de síntesis al inhibirse la formación del complejo de iniciación 43S, inhibición que es reversible por adición de los aminoácidos que faltan al medio de cultivo (Everson et al., 1989). En trucha y carpa, mantenidas a sus temperaturas óptimas de 15 y 25°C respectivamente, la deficiencia produjo una disminución de K_S y K_D en hígado y una disminución de K_S , asociada aun aumento de K_D , en el músculo blanco. La menor temperatura (18°C) indujo en la carpa una aclimatación consistente en una reducción de K_S sin modificaciones importante de K_D en el músculo blanco y un efecto opuesto en el hígado donde aumentaron K_S y K_D . En relación con estos resultados, la dorada respondió igual que la trucha y la carpa con reducción de K_S y K_D en hígado y disminución de K_S , asociada a un mantenimiento o a un aumento de K_D , en músculo blanco (Sierra, 1995); sin embargo, en carpas sometidas a una disminución de temperatura (18°C) el hígado presentó un comportamiento similar al de la anguila (a 25°C) con aumento de K_S y K_D , mientras que el músculo presentó una respuesta semejante a la obtenida en trucha, dorada y carpa (25°C).

Por otra parte, en el hígado de truchas deficientes en lisina, la concentración de ARN

y la capacidad de síntesis proteica (C_s), así como la eficacia de la retención de proteína (ERP), fueron las más bajas de las cuatro dietas ensayadas, a pesar de la mejor eficacia de la síntesis (K_{RNA}) y mayor cantidad de proteína sintetizada por unidad celular (K_{DNA}). El músculo blanco, aún cuando presentó un comportamiento similar al del hígado, al experimentar una reducción significativa de la concentración de ARN, de C_s y de ERP, la eficacia de la síntesis (K_{RNA}) y la síntesis proteica por unidad celular (K_{DNA}) no experimentaron cambios significativos, respecto a la dieta control. Por otra parte, la capacidad de transcripción (ARN/ADN) se redujo en un 40%, por efecto de la deficiencia, en hígado y músculo blanco.

La recuperación de los contenidos de ARN, ADN y ARN/ADN, en hígado y músculo, por suplementación con lisina, alcanzó valores control cuando la adición de lisina se hace en forma de microcapsulas. El crecimiento siguió una respuesta similar y las dietas suplementadas aumentaron la tasa de crecimiento hasta los valores control. La síntesis proteica es función del número y actividad de los ribosomas (Pain y Clement, 1980) y la concentración de ARN, en su mayor parte ribosómico (Sugden y Fuller, 1991), es un índice de la tasa de síntesis (Millward et al., 1981; Preedy et al., 1988), de ahí que el contenido en ARN se relacione directamente con la síntesis proteica (McMillan y Houlihan, 1992; Houlihan et al., 1989, 1993) y el crecimiento (Busacker et al., 1990) de los peces. Al igual que el contenido en ARN, la capacidad de síntesis (C_s : ARN/proteína) se relaciona con la velocidad de síntesis (Houlihan et al., 1993).

En carpas, mantenidas a 18°C, la deficiencia cursó en hígado con una disminución de la retención de proteína (EPR), sin cambios significativos en la capacidad de síntesis (C_s), aunque con un aumento de la eficacia del proceso (K_{RNA}). En músculo blanco, la disminución de K_s se relaciona con menor K_{RNA} y K_{DNA} que se traducen en una disminución de la retención de proteína para crecimiento, independientemente de la temperatura. A 25°C el hígado de la carpa se comportó como el músculo blanco. Ni el contenido en ARN ni la capacidad de síntesis (C_s : ARN/proteína) muscular se modificó por influencia de la dieta o la temperatura; tan sólo en carpas mantenidas a 25°C el contenido hepático de ARN fue mayor para la dieta control, aunque sin llegar a modificar C_s . La capacidad de transcripción (ARN/ADN) no se modificó por influencia de la dieta, a 18°C, mientras que se redujo en hígado y músculo de carpas deficientes en lisina y mantenidas a 25°C.

El aumento del contenido de ARN en los hígados de carpas que ingieren dietas a base de gluten, hasta los valores máximos de la dieta control, podría considerarse un efecto compensatorio de aclimatación al igual que se ha observado para la síntesis de glucoproteínas en peces polares al descender la temperatura ambiente (Pickett et al., 1983). Las altas tasas de síntesis en este tejido, respecto a la dieta control, sustentarian este planteamiento, aunque no llegara a demostrarse en los estudios realizados en la carpa por Saez et al. (1982). El aumento de la concentración hepática de ARN, en carpas a 18°C alimentadas con proteína de gluten, hasta valores control, estaría de acuerdo con el aumento de ARN observado por

Houlihan et al. (1993) en distintos tejidos del bacalao al disminuir la temperatura. Según Goolish et al. (1989) dicho aumento de ARN tendería a compensar una reducción en la actividad de transcripción de ARN a bajas temperaturas y, en relación con todo ello, no se observaron modificaciones de la capacidad de transcripción (ARN/ADN) a 18°C y sí una reducción a 25°C, en situación de deficiencia en lisina.

En relación a los resultados obtenidos, el músculo blanco de la mayoría de las especies de peces, se confirma como tejido especialmente sensible a las condiciones de crecimiento (Houlihan et al., 1988), en nuestro caso provocadas por la disponibilidad de un aminoácido esencial. El hígado, por otra parte, tiene un comportamiento más de acuerdo con su papel de tejido regulador, respondiendo de forma diferente a las circunstancias de crecimiento, especialmente de temperatura, para cuyas variaciones el sentido de una diferente respuesta no está claro por el momento.

En los mamíferos, la deficiencia aminoacídica también se manifiesta *in vivo* por una disminución de la síntesis de proteínas. En cerdos se ha demostrado una disminución de K_s hepática y muscular (Cortamira et al., 1991), así como de la K_s corporal (Salter et al., 1990) en respuesta a dietas deficientes en aminoácidos, que se revierte por adición a la dieta de los aminoácidos deficitarios (Salter et al., 1990). La disponibilidad de todos los aminoácidos en cantidades adecuadas supone ajustar la composición de la dieta a las necesidades de un patrón aminoacídico óptimo para la síntesis (Wang y Fuller, 1989), que se ve claramente afectado en deficiencia pero que puede mejorarse con una adecuada suplementación de aquellas fuentes proteicas cuyos aminoácidos estén por debajo de las necesidades o creando desbalance entre ellos.

La suplementación de proteínas es una práctica habitual en la fabricación de dietas comerciales para peces (Tacon et al., 1983). Sin embargo, la suplementación realizada como es habitual, por adición a la dieta de los aminoácidos libres/puros en que es deficitaria, raramente tiene el éxito esperado y los índices de conversión y crecimiento que resultan son normalmente inferiores a los obtenidos con una dieta control (Murai et al., 1986, 1989; Sierra, 1995). Una posible causa de estos fracasos parece estar en la asincronía que supone la más rápida absorción y disponibilidad postprandial del aminoácido suplementado en forma libre (Yamada et al., 1982; Thebault, 1985; Murai et al., 1987a; Cowey y Walton, 1988; Sierra, 1995). La asincronía supone desbalances y, en consecuencia, el catabolismo de los aminoácidos que excedan el patrón para síntesis lo que resulta en una alteración del proceso (Cowey y Walton, 1988), independientemente de que la causa inicial sea un desbalance (Fauconneau, 1985) o una deficiencia aminoacídica (Akharbach, 1995; Sierra, 1995).

La suplementación de la proteína de gluten de maíz con lisina, libre o microencapsulada, produjo en la trucha un aumento de la velocidad de crecimiento hasta valores control, lo que pone de manifiesto que no es necesaria la encapsulación para promover un aumento significativo de la utilización nutritiva de esta fuente proteica, a

diferencia de lo que ocurre en dorada, por ejemplo, donde la suplementación de la proteína de soja debe hacerse con metionina microencapsulada (Sierra et al., 1993) para asegurar una disponibilidad adecuada de este aminoácido, ya que la suplementación con metionina libre/pura no llega a tener un efecto positivo, por asincronía postprandial del aminoácido suplementado, como también ha observado Thebault (1985) en la lubina. No obstante, otras especies, como la anguila, presentan un tipo de respuesta similar a la de la trucha y, como ejemplo, la suplementación de proteína de girasol con varios aminoácidos esenciales produce aumentos significativos del contenido de ARN, velocidad (K_S) y eficacia (K_{RNA}) de la síntesis y retención (ERP) de proteína (Akharbach, 1995).

La mejora del crecimiento de la trucha se reflejó en los parámetros de recambio proteico. En este sentido, aumentó la K_S muscular hasta valores control, independientemente de la forma de suplementación, mientras que en el hígado no se produjeron cambios significativos en el recambio proteico. No obstante, se detectó en los hígados de truchas alimentadas con dieta suplementada con lisina un aumento del contenido de ARN y ADN, así como de la capacidad de transcripción (ARN/ADN) y de síntesis proteica (C_S) que, aunque no llegaron a modificar K_S , explican una mayor velocidad de crecimiento (K_G) hepático. Es probable que estos pequeños cambios sean responsables del aumento de la síntesis de proteínas exportables que se produce en la trucha tras incluir en albúmina los aminoácidos libres de la dieta (Cowey y Walton, 1988).

En músculo, los valores de K_G , K_S y K_D obtenidos para dietas suplementadas, con lisina libre o encapsulada, fueron iguales a los control y mayores que los de la dieta no suplementada. No obstante, se observó un ligero efecto positivo de la microencapsulación que se tradujo en valores intermedios (entre control y +lisina-libre) de contenido en ARN y capacidad de síntesis, pero que no llegan a modificar K_S ni la eficacia de la retención proteica.

La suplementación efectiva de una fuente proteica produce siempre un aumento de la síntesis proteica muscular, como ha sido demostrado en trucha (Fauconneau, 1985), carpa (esta Memoria), anguila (Akharbach, 1995), dorada (Sierra, 1995) y mamíferos (Salter et al., 1990), al aumentar proporcionalmente más la síntesis que la degradación (Akharbach, 1995), llegando incluso a no producirse variaciones de K_D (Sierra, 1995) como es habitual que ocurra en los mamíferos (Millward et al., 1986).

Las pequeñas diferencias observadas en algunos parámetros que definen la actividad del recambio proteico tisular, en función de que la suplementación se realice con lisina libre o microencapsulada, son probablemente debidas a que la disponibilidad de todos los aminoácidos coincide en los lugares de síntesis proteica. Lo que no sabemos es hasta que punto la temperatura o determinados aspectos del metabolismo aminoacídico de la trucha permiten retrasar la disponibilidad y/o utilización de la lisina suplementada en forma libre, como para dar lugar a unos resultados tan parecidos a los obtenidos con lisina

microencapsulada. Es conocida la mejor utilización que de los aminoácidos libre hace la trucha (Fauconneau, 1988; Stone et al., 1989; Espe y Njaa, 1991; Kim et al., 1992a,b) y el salmón (Espe y Lied, 1994), en relación a especies más templadas como la carpa (Kaushik y Dabrowski, 1983; Yamada et al., 1988) o la lubina (Thebault et al., 1985). Una prueba de la influencia de la temperatura sobre la disponibilidad postprandial de lisina en la carpa, en relación a los aminoácidos "proteicos" de la dieta, se aporta en este trabajo.

Como resultado del estudio de la dinámica postprandial de los aminoácidos, en función de que la dieta a base de gluten esté o no suplementada con lisina libre o encapsulada, en el que se observó una clara influencia de la temperatura sobre la disponibilidad de lisina para crecimiento, se abordó la determinación de actividades de recambio proteico en hígado y músculo de carpas mantenidas a 18 ó 25°C.

La suplementación no modificó el recambio proteico hepático a 18°C ni los contenidos de ARN y ADN, ni la capacidad de transcripción (ARN/ADN) ni la de síntesis proteica (ARN/proteína), así como tampoco influyó sobre la eficacia del proceso (K_{RNA}) o la síntesis proteica por unidad celular (K_{DNA}). La única modificación destacable fue el aumento del contenido y retención de proteína que cursaron paralelos a la tasa de crecimiento hepático (lisina deficiente < +lisina libre < +lisina encapsulada < control). La falta de diferencias significativas hace difícil atribuir, a alguno de los parámetros evaluados, las consecuencias sobre el crecimiento. Los resultados serían consecuencia de una pequeña pero relativamente mayor K_D y menor contenido de ARN en carpas deficientes. La lisina microencapsulada estimuló ligera pero suficientemente más la K_S que la K_D y, además, los hígados de estas carpas tuvieron un mayor contenido de ARN. De hecho, las concentraciones de ARN se han relacionado con el crecimiento de los peces (Bulow, 1987; Busacker et al., 1990) y, como la mayoría del ARN es ribosómico, el contenido de ARN se emplea, a menudo, como estimación de la síntesis proteica (Millward et al., 1981; Preedy et al., 1988; Houlihan et al., 1993).

A 25°C, temperatura próxima al óptimo de esta especie, la influencia de la forma de suplementación sobre el recambio proteico hepático y muscular se expresó claramente. La suplementación con lisina libre aumentó K_S y K_D hepáticas, mientras que en el músculo blanco K_S se mantuvo ligeramente incrementada y K_D disminuyó. La suplementación con lisina microencapsulada aumentó K_S y disminuyó K_D en el músculo, tanto respecto a la dieta deficiente como a la suplementada con lisina libre, pero no llegó a alcanzar los valores control. En hígado, la suplementación con lisina microencapsulada aumento K_S y K_D hasta valores control.

Como dato destacable, al comparar los resultados obtenidos con trucha y carpa, tenemos que, a 15 y 18°C respectivamente, las dietas a base de gluten no presentaron diferencias significativas en el recambio proteico hepático, independientemente de suplementar o no la dieta. En el músculo de ambas especies la suplementación efectiva

aumentó la síntesis y retención de proteína. En relación a K_S la suplementación con lisina fué efectiva para la trucha tanto en forma libre como encapsulada, mientras que en la carpa, ya a 18°C, K_S y K_{RNA} muscular sólo se incrementaron cuando la suplementación se hizo con lisina microencapsulada, mientras que la lisina libre no tuvo efecto; sin embargo, la capacidad de síntesis y retención proteica, al igual que la tasa de crecimiento, fueron iguales para ambas formas de suplementación. Estos resultados, sobre todo si se considera el recambio proteico muscular, en relación directa con la tasa de crecimiento (Houlihan et al., 1988; Peragón, 1993), plantean la importancia de la temperatura como factor condicionante de la disponibilidad y utilización de los aminoácidos suplementados, a la vez que se pone de manifiesto la mayor capacidad de la trucha para responder a la suplementación ya que se pueden llegar a obtener tasas de crecimiento (K_G) muy próximas a las obtenidas con una dieta control a base de proteína de pescado y en línea con la mayor capacidad de los salmónidos para utilizar dietas a base de aminoácidos libres (Espe y Njaa, 1991; Cho et al., 1992; Kim et al., 1992a,b; Espe y Lied, 1994).

Cuando se consideran los resultados obtenidos con carpas mantenidas a 25°C, en el rango de las temperaturas óptimas para su cultivo, la respuesta de crecimiento, estudiada a nivel de recambio proteico hepático y muscular, es esencialmente diferente de la obtenida a 18°C, ampliándose las consecuencias de la forma de suplementación y estableciendo claramente las ventajas de retrasar la absorción, por encapsulación de los aminoácidos empleados en la suplementación de fuentes proteicas alternativas, como han demostrado algunos investigadores (Murai et al., 1982a,b,c ; Sierra, 1995).

A 25°C el hígado de carpa tuvo valores de recambio proteico (K_S y K_D) que, a partir de los más bajos, correspondientes a la dieta deficiente, aumentaron a valores intermedios para la suplementación con lisina libre, y llegaron a alcanzar valores iguales a los del grupo control cuando la suplementación de la proteína de gluten se hizo con lisina microencapsulada. Los valores de K_S y K_D cursaron en relación directa con los de K_{RNA} y K_{DNA} . Los datos para músculo blanco son, desde el punto de vista práctico, más interesantes ya que la síntesis proteica muscular se correlaciona con el crecimiento (Houlihan et al., 1988; Peragón, 1993).

En el músculo, K_D disminuyó progresivamente (Control < +lisina encapsulada < +lisina libre < deficiente) al aumentar K_G , mientras que K_S presentó una secuencia opuesta: deficiente = +lisina libre < +lisina encapsulada < control. La capacidad de transcripción (ARN/ADN) y la síntesis por unidad celular (K_{DNA}) presentaron una respuesta en el mismo sentido que K_S .

Como los resultados obtenidos en hígado y músculo, de carpas mantenidas a 25°C, son muy similares, vamos a basar la discusión fundamentalmente en los resultados obtenidos en músculo, dado que el recambio proteico muscular guarda una estrecha relación con el crecimiento (Houlihan et al., 1988; Peragón, 1993). Con estos planteamientos básicos, los

resultados coinciden con los obtenidos, por otros miembros de nuestro grupo, en dorada y anguila. La suplementación de proteína de soja con metionina encapsulada, ya que la forma libre no tuvo efecto, mejoró la eficacia de la síntesis (K_{RNA}) asociada a una mayor tasa de síntesis proteica (Sierra, 1995). En la anguila, la suplementación de la proteína de girasol, con aminoácidos esenciales en forma libre, aumentó el contenido de ARN, así como K_S , K_{RNA} y la eficacia de la retención de proteína, que llegaron a alcanzar los valores control (Akharbach, 1995). Los efectos de la temperatura, sobre el recambio proteico de la carpa, no se debieron a una menor ingesta ya que los animales tuvieron una alimentación pareada (en g/100 g pez), entre otras razones porque el tamaño de la ración está descrito que afecta al contenido de ARN y a la velocidad de síntesis, como ha sido observado en el abadejo carbonero (Rosenlund et al., 1984) y en el bacalao (von der Decken y Lied, 1989). Lo mismo ocurre si disminuye la cantidad de proteína y energía ingeridas, al reducir la capacidad de transcripción y la síntesis proteica (Peragón, 1993).

Creemos interesante comentar que, a diferencia de la dorada, otras especies como carpa (esta Memoria), trucha (esta Memoria) y anguila (Akharbach, 1995) respondieron a la suplementación con una reducción de K_D , que contribuye a aumentar la incorporación de proteínas al crecimiento. En animales terrestres también se han observado respuestas diferentes; así, mientras el cerdo responde a la suplementación con un aumento de K_D relativamente menor que el aumento de K_S (Salter et al., 1990), el pollo responde a la suplementación de proteína de soja con una reducción significativa de K_D mientras que K_S muscular y hepática no llegaron a modificarse (Nieto et al., 1994). La reducción de K_D parece ser responsable del aumento en la retención de proteína en las aves (Klasing y Calvert, 1987). Los peces parecen tener una respuesta más parecida a la de los mamíferos en los que, de acuerdo con Millward et al. (1986), el músculo crece o se atrofia como resultado de cambios de K_S mientras que K_D no se afecta o presenta cambios proporcionalmente más pequeños.

La falta de éxito de la suplementación con aminoácidos libres ha sido atribuida a la absorción precoz del aminoácido suplementado (Sierra, 1995); sin embargo, aún cuando en la trucha se haya observado una más rápida aparición postprandial (Murai et al., 1987a,b; Cowey y Walton, 1988; esta Memoria), en la carpa no se ha observado una influencia de la encapsulación sobre el retraso de los aminoácidos libres incluidos en la dieta (Murai et al., 1982), aunque se observó una mejora del balance aminoacídico postprandial, una contradicción que aceptan Murai et al. (1982) y que, además, se repite en esta memoria. Sea cual sea el mecanismo (por establecer), la encapsulación mejora el balance aminoacídico y estimula el crecimiento, estableciéndose una correlación positiva entre ambos, hasta valores del orden de los que resultan de alimentar carpas con una dieta control.

La estrategia de retrasar la absorción de los aminoácidos empleados en la suplementación de fuentes proteicas alternativas ha demostrado su eficacia en carpa (Murai et al., 1982a,b,c), trucha (Cowey y Walton, 1988) y dorada (Sierra, 1995). La obtención,

por este procedimiento, de una estimulación del crecimiento, al mejorar el patrón aminoacídico postprandial, es evidente. Con esta estrategia, también se han utilizado con éxito plasteinas de soja en la alimentación de tilapia (Teshima y Kanasawa, 1988) y langostino (Teshima et al., 1992).

De los resultados obtenidos se deduce que la síntesis proteica, sobre todo a nivel del músculo blanco, es lo suficientemente sensible a la calidad proteica, definida por la disponibilidad postprandial de aminoácidos, como para ser considerada como alternativa para estimar el valor biológico de una fuente proteica. A los datos de correlación entre aminoácidos tisulares y de la dieta (Wilson et al., 1981, 1985; Ogata, 1986, Sierra, 1995), empleados con frecuencia en la determinación de necesidades aminoacídicas (Sierra, 1995), hay que añadir la mayor correlación del crecimiento con el patrón aminoacídico plasmático que con el de la dieta (Murai et al., 1986). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado por primera vez (Akharbach, 1995; Sierra, 1995; esta Memoria) la relación entre deficiencias aminoacídicas concretas y el recambio proteico hepático y muscular, así como las consecuencias que sobre el recambio tiene la forma de suplementación (libre o encapsulada) de fuentes proteicas alternativas. Los resultados han sido muy prometedores y el ajuste de la disponibilidad postprandial de dietas suplementadas puede tener importantes repercusiones estratégicas, al ampliar las posibilidades de inclusión de nuevas fuentes proteicas. Además, la modulación de la disponibilidad postprandial es muy versátil, por modificación de la composición y grosor de la cubierta. Por otra parte, la mejora de la utilización proteica para crecimiento reduciría la eliminación de productos de desecho al medio. Por todo ello creemos haber planteado una nueva forma de abordar la problemática de la nutrición proteica de los peces, mediada por estudios básicos a un nivel más íntimo, en la que pretendemos seguir profundizando.

5.5.4. Influencia de la suplementación de la proteína de gluten de maíz, con lisina libre o microencapsulada, sobre las actividades proteásicas del complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC), en la trucha y la carpa.

El recambio proteico es un proceso cíclico en el que los aminoácidos, procedentes de la digestión proteica, se suman al *pool* general para ser reutilizados en el proceso de síntesis. Además, hay que tener en cuenta que tanto el crecimiento como la pérdida tisular de proteínas no necesariamente supone un aumento de la velocidad de síntesis y degradación respectivamente, sino que las variaciones en la retención de proteína pueden estar motivadas por cambios adaptativos de uno o ambos procesos. Aún cuando se dispone de métodos fiables para valorar K_s , como el empleado en este trabajo (Garlick et al., 1980), la determinación de K_D , a corto plazo, *in vivo*, no dispone de un método adecuado (Waterlow et al., 1978) y la estimación por diferencia entre K_s y K_G no está exenta de crítica y ha sido ampliamente

discutida en mamíferos (Garlick et al., 1980) y ectotermos (Houlihan, 1991) donde se agudiza esta problemática por su menor velocidad de crecimiento y actividad metabólica.

La diferente velocidad de recambio de los distintos tejidos, cuyo protagonismo en el crecimiento es igualmente variado, puede implicar que posean mecanismos adaptativos distintos ya que, mientras hígado e intestino son tejidos de alta velocidad de recambio (McMillan y Houlihan, 1989) y de carácter regulador, como lo es el hígado fundamentalmente, el músculo esquelético está más directamente implicado en el crecimiento (Houlihan et al., 1988; Peragón, 1993) y presenta una menor actividad de recambio y mayor retención proteica (McMillan y Houlihan, 1989; Peragón et al., 1994; Akharbach, 1995; Sierra, 1995).

A falta de una metodología adecuada, para valorar la degradación proteica tisular, hemos abordado una aproximación directa y objetiva a este proceso mediante la determinación de la actividad proteásica no-lisosomal que reside en el complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC). Este complejo citoplasmático, compuesto de subunidades (Orlowski et al., 1990), presenta tres actividades endopeptidásicas que actúan a nivel del extremo carboxílico de los restos de aminoácidos aromáticos (actividad tipo quimotripsina, CT-L), básicos (actividad tipo tripsina, TL) y ácidos (actividad peptidil-glutamil-peptidasa, PGPH), (ver: Rivett, 1989 y Orlowski, 1990). De estas actividades, la PGPH parece ser la más directamente implicada en la degradación de proteínas (Orlowski y Michaud, 1989).

El complejo MPC está presente en todas las células eucariotas, lo que indica el interés de su conservación a lo largo de la evolución y está aparentemente involucrado en las vías ubiquitin-dependiente y ubiquitin-independiente de la proteólisis intracelular (Rechsteiner, 1987; Eytan et al., 1989; Driscoll y Goldberg, 1990). Sus funciones no son muy conocidas pero parece ser esencial para el crecimiento y la proliferación celular (Fujiwara et al., 1991). Además, el hecho de que esté involucrado en la proteólisis ATP-dependiente (Tanaka et al., 1988; McGuire et al., 1988; Matthews et al., 1989) sugiere un papel clave en el recambio proteico intracelular. Sus altas concentraciones citoplasmáticas (Hendil, 1988) plantea interrogantes sobre su papel regulador y la influencia que pueda tener la composición de la dieta en sus actividades proteásicas.

Los resultados de esta Memoria demuestran, junto a los obtenidos en ensayos similares con otras especies (Folco et al., 1992, Akharbach, 1995; Sierra, 1995) que el MPC de hígado, músculo blanco e intestino posee las actividades proteásicas demostradas en otros organismos (Rivett, 1989; Orlowski, 1990).

De las actividades proteásicas detectadas en la trucha, las más elevadas fueron las del intestino, el hígado presentó actividades intermedias y el músculo blanco fué el tejido con menor actividad en cada una de ellas. Esta distribución de actividades ha sido también

demostrada en *Micropogon opercularis* (Folco et al., 1992), *Sparus aurata* (Sierra, 1995) y *Anguilla anguilla* (Akharbach, 1995). Sin embargo, en la carpa, la mayor o menor actividad fluctuó ampliamente en los tres tejidos y en función de la temperatura, siendo el hígado, por regla general, el tejido que presentó actividades ligeramente más elevadas.

En carpas mantenidas a diferente temperatura, de las actividades proteásicas determinadas, la actividad hepática fué la más elevada. Hay que tener en cuenta que, en esta especie, el tejido hepático está muy infiltrado por tejido pancreático, de tal forma que no pueden diseccionarse y la actividad, por tanto, es de hepatopáncreas y esta es posiblemente la razón por la cual la distribución de actividades, respecto a otras especies (Folco et al., 1992; Akharbach, 1995; Sierra, 1995), se altera en la carpa a favor de una mayor actividad en hepatopáncreas. No obstante, las medidas de actividad son específicas y no habría que pensar, por el momento, en una contaminación con actividades de enzimas digestivos procedentes del páncreas. Otra diferencia, respecto a otras especies, es la gran similitud de las actividades en músculo blanco e intestino, cuando el recambio proteico intestinal es presumiblemente más elevado, como ha sido demostrado en estudios de medida directa (McMillan y Houlihan, 1989).

Las actividades proteásicas de hígado, músculo blanco e intestino de trucha presentaron la misma tendencia: una menor actividad hepática en los peces alimentados con la dieta suplementada con lisina microencapsulada, una relación inversa con calidad proteica de la dieta y crecimiento en el músculo blanco y una mayor actividad proteásica intestinal en truchas control. En cuanto a la menor actividad proteásica hepática, obtenida para la dieta suplementada con lisina microencapsulada, no existe una explicación en base a los resultados de recambio, donde K_s y K_D fueron iguales para todas las dietas; además, la tasa crecimiento de las truchas alimentadas con esta dieta fué la misma que la del grupo control.

Es interesante el hecho de que la mayor actividad proteásica (PGPH y CT-L), del músculo blanco de la trucha, se registró para los peces alimentados con una dieta deficiente en lisina, coincidiendo con la mayor K_D muscular para este grupo. El aumento de la disponibilidad de lisina, al suplementar la dieta deficiente, disminuyó la actividad proteásica y K_D al mismo tiempo que estimuló el crecimiento hasta valores control. Una respuesta diferente fué obtenida en anguilas alimentadas con fuentes proteicas deficientes en aminoácidos esenciales, en cuyo músculo disminuyeron las tres actividades del complejo MPC al disminuir la calidad proteica de la dieta y su utilización para crecimiento (Akharbach, 1995). También en la dorada, la peor calidad proteica indujo una menor actividad proteásica de tal forma que, al suplementar la proteína de soja con metionina, aumentó K_s mientras K_D mantuvo sus valores absolutos aunque relativamente aumentados respecto a K_s , al aumentar la velocidad de crecimiento (Sierra, 1995).

Tanto en la anguila (Akharbach, 1995) como en la dorada (Sierra, 1995), la calidad proteica se relacionó directamente con cambios de K_s y actividad proteásica, mientras las

variaciones de K_D fueron menos importantes. En cualquier caso, el paralelismo encontrado en músculo blanco de anguila y dorada estaría de acuerdo con el planteamiento de Waterlow et al. (1978) de que la síntesis de proteasas es una proporción más o menos constante de la síntesis proteica total, explicación que no es aplicable a los cambios de actividad observados en la trucha.

Dejando aparte la situación especial de deficiencia, en la que el crecimiento sufre un freno importante y la proteína muscular es movilizada, para atender la necesidad de proteínas funcionales, las dietas de proteína de gluten suplementada con lisina y la dieta control mantuvieron constantes las velocidades de síntesis y degradación para una misma tasa de crecimiento, lo que supone el mantenimiento de la proporción de ambos procesos en relación a la velocidad de crecimiento, como se ha demostrado ampliamente en peces donde K_S y K_D musculares cursan de forma paralela (Houlihan et al., 1987, 1988, 1989; Peragón, 1993; Akharbach, 1995; Sierra, 1995). Sin embargo, tuvo lugar una disminución progresiva de las actividades proteásicas al suplementar la dieta deficiente, siendo menor la actividad para las dietas control y +lisina-mic roencapsulada lo que contribuiría al mayor crecimiento observado para las tres dietas con una disponibilidad de lisina adecuada a las necesidades de la trucha. Esta respuesta tampoco es explicable según el planteamiento de Waterlow et al. (1978) y es necesario un estudio más profundo para saber si la respuesta de la trucha es realmente diferente a la de anguila (Akharbach, 1995) y dorada (Sierra, 1995) y por qué.

En las carpas mantenidas a 25°C, temperatura en el rango óptimo para esta especie, las actividades registradas en el hígado fueron diferentes según la actividad de que se trate. La actividad PGPH correspondiente al grupo control no resultó ser diferente de la de las carpas alimentadas con dietas suplementadas con lisina, mientras que a la dieta deficiente respondieron con un aumento de actividad asociada a la menor K_D hepática de las registradas. Por otra parte, la actividad tipo quimotripsina (CT-L) tuvo una respuesta coincidente con K_D , para las cuatro dietas estudiadas que, además, cursó paralela a las variaciones de K_S , poniendo de manifiesto la relación directa de esta actividad con la tasa de recambio proteico hepático.

En el músculo blanco, de carpas a 25°C, las actividades proteásicas registradas (PGPH, CT-L y TL) cursaron paralelas a K_D y de manera inversa a K_S , por lo que el mecanismo que explica cambios paralelos de actividad proteásica y K_S , por el que la síntesis de proteasas es una fracción constante de la síntesis total (Waterlow et al., 1978), no sería de aplicación en este caso. No obstante, la relación directa con K_D hace pensar que, independientemente del mecanismo implicado, la determinación de las actividades del complejo MPC pueda ser una medida directa, al menos cualitativa, de la velocidad de degradación proteica intracelular, como ha sido sugerido por Orłowski y Michaud (1989) y hemos comentado al principio de este apartado.

Las actividades intestinales cursaron paralelas a las del músculo blanco, destacando

siempre la mayor actividad obtenida para la dieta deficiente que disminuye, aproximándose a la control, cuando se suplementa la proteína de gluten con lisina. Este paralelismo entre hígado y músculo, observado también en la dorada (Sierra et al., 1995), puede estar relacionado con el paralelismo observado en el recambio proteico de ambos tejidos en relación con la edad (Goldspink y Kelly, 1984; Goldspink et al., 1984) y las circunstancias nutritivas (McNurlan et al., 1982; Sugden y Fuller, 1991).

En carpas aclimatadas a 18°C los resultados de las diferentes actividades proteásicas hepáticas fueron muy dispares. Así, mientras la actividad PGPH fue inferior para la dieta deficiente, la actividad CT-L presentó los valores más altos para las dietas deficiente y +lisina-libre y una más alta actividad T-L fue detectada en el grupo control. Estos resultados no coinciden en todos los casos con el más alto recambio (K_S y K_D) obtenido para las dietas a base de gluten, haciendo difícil el llegar a una conclusión.

En el músculo blanco, las actividades proteásicas (expresadas en mU/mg de proteína) disminuyeron al alimentar carpas con dieta deficiente en lisina, al igual que se ha observado para la deficiencia de metionina en la dorada (Sierra et al., 1995). Además, dichas actividades experimentaron una tendencia a recuperar valores normales cuando la proteína de glutense suplementó con lisina. En cualquier caso, se obtuvo una clara diferencia entre el grupo control y los alimentados con dietas a base de harina de gluten, con una ligera menor calidad proteica y, por tanto, menor K_G y K_S . En consecuencia, para las actividades proteásicas del músculo blanco, de carpas a 18°C, podemos hablar de una actividad proporcional, en términos de calidad de la fuente proteica incluida en la fórmula, a la velocidad de síntesis y al crecimiento, congruente con la afirmación de Waterlow et al. (1978) de que la síntesis de proteasas es una proporción, aproximadamente constante, de la síntesis proteica total.

En relación con el músculo esquelético se afirma que un aumento de la velocidad de crecimiento está asociado a un aumento coordinado de K_S y K_D en los mamíferos (Reeds, 1989). En la anguila se ha comprobado que esta relación es válida para K_G y K_S mientras K_D no experimenta cambios importantes, en respuesta a la calidad proteica de la dieta (Akharbach, 1995), lo que coincide, en gran parte, con los resultados obtenidos en la carpa. La actividad PGPH no se modificó en respuesta a la composición de la dieta, manteniendo su relación con K_D , mientras que las actividades CT-L y T-L presentaron una relación directa con K_S y K_G , pero no con K_D .

Además de las observaciones realizadas en mamíferos (Reeds et al., 1985; Millward, 1989), en los peces también se ha demostrado un aumento de K_S y K_D , muscular y corporal, con una mayor tasa de crecimiento (Houlihan et al., 1987, 1988, 1989; Langar et al., 1993; Langar y Guillaume, 1994). Aunque K_D , de carpas aclimatadas a 18°C, prácticamente no experimentó cambios en respuesta a la calidad proteica de la dieta, las variaciones observadas de las actividades CT-L y T-L, paralelas a K_S , deberían interpretarse como un aumento de

la actividad de degradación proteica.

Las actividades proteásicas intestinales fueron similares a las del músculo blanco, con las que presentan algunas diferencias de respuesta a la composición de la dieta. En este sentido, las actividades PGPH y CT-L, correspondientes a carpas alimentadas con dietas a base de gluten de maíz suplementado o no con lisina, fueron significativamente menores que las correspondientes de la dieta control, presentando la actividad CT-L intestinal una respuesta cualitativa y cuantitativamente similar a la del músculo blanco. La actividad T-L no se modificó en respuesta a cualquiera de las dietas ensayadas. A diferencia de otras especies, las actividades proteásicas de intestino y músculo no fueron muy diferentes, especialmente para la actividad CT-L y PGPH, tendiendo a aproximarse aún más a la temperatura ambiental óptima de 25°C. Estos resultados no coinciden con los de Folco et al. (1992), obtenidos con la especie marina *Micropogon opercularis* que presentó actividades muy diferentes entre músculo e intestino, siendo las del primero mucho menores. Además, según los estudios de recambio proteico tisular, realizados en trucha por McMillan y Houlihan (1989), K_s intestinal resultó ser cuarenta veces mayor que K_s de músculo blanco.

Al igual que en la anguila (Akharbach, 1995) y la dorada (Sierra, 1995), la calidad proteica de la dieta influyó en la actividad proteásica intestinal disminuyendo las actividades PGPH, CT-L y T-L en las carpas alimentadas con proteína de gluten suplementada o no con lisina y mantenidas a 18°C. Una respuesta del recambio proteico intestinal, similar a la del músculo blanco, sería de esperar, por lo que podríamos considerar como prueba de esa respuesta la obtenida con las actividades del complejo MPC, similares en ambos tejidos. En mamíferos existe evidencia de un paralelismo en las respuestas del recambio proteico en intestino y músculo esquelético (Goldspink y Kelly, 1984; Goldspink et al., 1984; Sugden y Fuller, 1991). En peces carecemos de pruebas directas a favor de ese posible paralelismo entre ambos tejidos.

Por último, un breve comentario acerca de la influencia de la temperatura sobre las actividades proteásicas de los tejidos de la carpa. Las mayores actividades proteásicas, medidas siempre a 25°C, que se detectaron en las carpas aclimatadas a 18°C parecen estar relacionadas con una tendencia al aumento del contenido de ARN y de la capacidad de síntesis (C_s), mayor en hígado que en músculo blanco, para compensar una menor actividad de transducción (K_{RNA}) a baja temperatura. La aclimatación a una menor temperatura depende, en peces polares, de la síntesis de ARN-m específicos para la síntesis hepática de glucoproteínas con carácter anticongelante (Pickett et al., 1983). La compensación adaptativa de la síntesis proteica a menor temperatura ha sido demostrada *in vitro* (Haschemeyer, 1969a; Kent y Prosser, 1980; Jankowsky et al., 1981) e *in vivo* (Haschemeyer, 1968; Das y Prosser, 1967); pero no en trucha (Owen, 1975) o carpa (Saez et al., 1982), en estudios *in vitro*.

A favor de la falta de influencia de la aclimatación sobre la síntesis proteica tenemos las investigaciones realizadas por Houlihan et al. (1993) que si bien no observaron cambios

en la síntesis proteica sí detectaron un aumento del contenido tisular de ARN, utilizado por muchos autores como índice de actividad del proceso (Bulow, 1987; Busacker et al., 1990; Houlihan et al., 1993), en varios tejidos del bacalao aclimatado a baja temperatura. Según hipótesis de Goolish et al. (1984), el aumento de ARN tisular, en carpas aclimatadas a aguas frías, compensaría una reducción en la actividad de transducción del ARN a bajas temperaturas, como la observada en nuestro ensayo. A todo lo anterior hay que añadir la mayor relación ARN/ADN, considerada como índice de la capacidad de transcripción, en hígado y músculo de carpas aclimatadas a 18°C.

En definitiva, y como respuesta de aclimatación, se ha producido una reacción compensatoria, tendente a neutralizar la menor actividad metabólica a bajas temperaturas, consistente en un aumento de la síntesis de proteínas concretas entre las que estarían las subunidades con actividad proteásica del complejo MPC, de tal forma que, la valoración de actividades a una misma temperatura (25°C), resulta en una mayor actividad proteásica para las carpas aclimatadas a una temperatura (18°C) por debajo del rango de temperaturas óptimas (p.e. 25°C) de esta especie.

Dado que la determinación de la tasa de degradación proteica tisular, por diferencia entre K_s y K_G , no está exenta de crítica (Garlick et al., 1980; Houlihan, 1991), se ha optado por una determinación más directa, al menos desde un punto de vista cualitativo, de la respuesta adaptativa del proceso de degradación proteica tisular, mediante la estimación de las actividades proteásicas del complejo MPC, para tener así una visión más completa de las adaptaciones del recambio proteico a situaciones que supongan alteraciones de la tasa de crecimiento. Estudios previos de nuestro grupo, realizados en anguila y dorada, revelaron la capacidad adaptativa de las actividades proteásicas del complejo MPC a situaciones nutritivas con influencia sobre el crecimiento y el recambio proteico hepático y muscular. Sin embargo, los resultados observados en trucha y carpa no han sido todo lo expresivos que se esperaba y aunque en muchos casos la relación con el recambio proteico se expresa claramente, en otros tal relación no se manifiesta. No obstante, creemos que con estos trabajos se inicia una nueva aproximación a los mecanismos íntimos del crecimiento, en relación a la disponibilidad de aminoácidos y otras variaciones en la composición de la dieta, además de otras circunstancias que directa o indirectamente afectan a los procesos básicos del crecimiento.

CONCLUSIONES

Conclusiones relacionadas con la trucha

- 1.- De los métodos de encapsulación utilizados, el realizado con una cubierta grasa (tipo B) dió los mejores resultados. La encapsulación mejoró siempre el crecimiento y la utilización nutritiva de la proteína con respecto a la dieta no suplementada, pero no supuso una mejora respecto a los resultados obtenidos con la dieta suplementada con lisina libre, lo que confirma la capacidad de los salmónidos para utilizar los aminoácidos libres de la dieta.
- 2.- Los valores máximos de concentración de AAE y AAT se obtuvieron entre las doce y dieciseis horas después de la ingestión de la dieta. Los máximos de concentración de lisina en plasma se obtuvieron a distintas horas según la forma de suplementación de la lisina. La suplementada con el tipo B presentó la mayor coincidencia con los máximos niveles de AAE. La dieta suplementada con lisina libre se observó el máximo entre las 8-10 horas, los tres tipos de encapsulados retrasaron la absorción de la lisina respecto a suplementación con lisina libre.
- 3.- Para la trucha, los métodos de encapsulación del tipo B se mostraron los más eficaces en cuanto a mejora de disponibilidad del patrón aminoacídico en plasma, y por tanto en crecimiento, si bien la forma de suplementación con lisina también se mostró eficaz. Cualquier tipo de suplementación con lisina mejoró la utilización del gluten por los animales.
- 4.- El recambio proteico hepático, medido como velocidad fraccional de síntesis (K_s), degradación (K_D) de proteína, fue mayor en hígado que en músculo blanco. Del mismo modo, la concentración tisular de ARN y ADN, así como la capacidad y eficacia de la síntesis proteica, fueron mayores en el hígado. Sin embargo, tamaño celular y eficacia de la retención de proteína fueron unas nueve veces superiores en el músculo blanco.
- 5.- La velocidades fraccionales de síntesis (K_s) y degradación (K_D) de proteína en hígado de trucha no afectaron significativamente en función de que la proteína de gluten se suplementara o no con lisina. Sin embargo, el menor contenido de ARN y la consiguiente disminución de la capacidad de transición (ARN/ADN) y de síntesis proteica disminuyeron por deficiencia de lisina. Estos valores no mejoraron por suplementación con lisina libre pero sí con lisina encapsulada llegando a igualar los valores control. Como resultado, la tasa de crecimiento (K_G) hepático fue menor para la dieta deficiente e intermedia para la dieta suplementada con lisina libre, siendo significativamente superior para la dieta control y la suplementada con un encapsulado de lisina.
- 6.- Como consecuencia de la deficiencia en lisina se produjo una disminución de la tasa de crecimiento (K_G), producida por una menor velocidad fraccional de síntesis (K_s) acompañada de una mayor degradación proteica (K_D). Simultáneamente, la deficiencia provocó una disminución de los contenidos de ARN, ADN y proteína, asociados a una menor capacidad de transcripción (ARN/ADN) y de síntesis proteica, traducidas, finalmente, en una

más baja eficacia de retención proteica para crecimiento. La forma de suplementar con lisina no modificó notablemente los parámetros de recambio proteico muscular y, en consecuencia, se alcanzaron tasas de síntesis, eficacia de retención proteica y crecimiento del orden de las obtenidas con la dieta control.

7.- Las actividades proteicas, peptidil-glutamil-peptidasa (PGPH) y tipo quimotripsina (CT-L), determinadas en la trucha fueron más altas en intestino, intermedias en hígado y menores en músculo. La actividad hepática no se modificó en función de la disponibilidad de lisina; sin embargo, las del músculo blanco presentaron una relación directa con la velocidad fraccional de degradación, mayor en carpas deficientes, intermedia en las suplementadas con lisina libre y menor en carpas alimentadas con la dieta control y la suplementada con lisina encapsulada. La actividad proteica intestinal fue menor, para cualquiera de las dietas a base de gluten, respecto a la dieta control.

Conclusiones relacionadas con la carpa

8.- En el caso de la carpa, todas las formas de encapsulación han mejorado el crecimiento y la utilización nutritiva de la proteína, con respecto a la dieta deficiente e, incluso, con la que incorporaba lisina libre, con independencia de la temperatura ensayada. Hay que hacer la salvedad de la dieta GB (encapsulado de tipo B) que fue mal aceptada por los animales.

Así pues, en la carpa, la encapsulación de aminoácidos como medio de suplementación de dietas deficientes, es un método más eficaz que la adición de aminoácidos libres.

9.- En función de la temperatura ensayada, varía el tipo de encapsulado que produce los mejores resultados en cuanto a crecimiento y utilización nutritiva de la proteína, lo que es reflejo de distintas dinámicas postprandiales de absorción de aminoácidos.

Este hecho abre nuevas perspectivas para el uso de los encapsulados, ya que parece posible modificar su efecto mediante cambios en la composición de la cubierta y adecuarlo a distintas condiciones de cultivo, tales como la temperatura.

10.- Todas las dietas que incorporaron encapsulados, superaron a la dieta suplementada con lisina libre en cuanto a crecimiento en carpa. El encapsulado que dió mejores resultados en esta especie fue el tipo A presentando una mayor aproximación a la suma de AAE y AAT.

11.- La diferente temperatura a la que se mantuvieron los animales ha producido cambios en la dinámica postprandial de aminoácidos. La temperatura más alta condicionó una más rápida absorción de los aminoácidos y la consiguiente más rápida aparición de los máximos de sus concentraciones en plasma.

12.- Las máximas concentraciones de AAE Y AAT en las carpas mantenidas a 18°C se obtuvieron entre las 4 y 6 horas después de la ingesta de las dietas. En carpas mantenidas

a 25°C las máximas concentraciones fueron entre las 2 y 4 horas.

13.- Con independencia de la temperatura, el recambio proteico del hígado de la carpa fue mayor que el del músculo blanco. Del mismo modo, la concentración tisular de ARN y ADN, así como la capacidad de síntesis fueron mayores en el hígado. La mayor eficacia del proceso (K_{RNA}) y la mayor síntesis por unidad celular (K_{DNA}) en hígado de carpa sólo se manifestó claramente a la temperatura óptima de 25 °C. La eficacia de la retención proteica fue mayor en hígado de carpas a 18°C, como respuesta reguladora de tipo compensatorio, mientras que la eficacia fue mayor en el músculo blanco de las carpas mantenidas a 25°C que presentaron también una mayor tasa de crecimiento.

14.- La tasa de crecimiento (K_G) hepático de la carpa, menor en deficiencia de lisina, se incrementó por suplementación con lisina libre y aún más por suplementación con lisina encapsulada, aunque sin llegar a alcanzar los valores control, a cualquiera de las temperaturas ensayadas. Sin embargo, el recambio presentó una respuesta diferente en relación a la temperatura de aclimatación. A 18 °C se incrementó por igual el recambio proteico para cualquiera de las dietas que contenían gluten, mientras que a 25 °C el recambio, menor por deficiencia, se incrementó al suplementar con lisina, alcanzando valores control cuando la suplementación se hizo en forma de lisina encapsulada. En todos los casos la velocidad de degradación fue directamente proporcional a la velocidad de síntesis.

15.- La alimentación a temperatura subóptima (18 °C) disminuyó la tasa de crecimiento (K_G), velocidad de recambio (K_S y K_D) y la eficiencia de la síntesis en hígado de carpa. Sin embargo, como mecanismo compensatorio, aumentó el contenido de ARN, el tamaño celular (proteína/ADN), la capacidad de transcripción (ARN/ADN) y de síntesis (C_S), así como la eficacia de retención de proteína.

16.- La tasa de crecimiento (K_G) y síntesis proteica (K_S), en músculo blanco de carpa, menor en deficiencia de lisina, mejoró por adición de lisina libre a 25 °C pero no a 18 °C. La suplementación con lisina encapsulada incrementó síntesis proteica y crecimiento a ambas temperaturas, aunque sin llegar a alcanzar los valores control. La velocidad fraccional de degradación cursó de manera inversa a la de síntesis, independientemente de la temperatura ambiental. La capacidad de síntesis no se modificó por influencia de la dieta pero la eficacia de la síntesis (K_{RNA}), menor en carpas deficientes, se incrementó por suplementación con lisina encapsulada a las dos temperaturas ensayadas. Se estableció una correlación directa entre tasa de crecimiento, tasa de síntesis, eficacia de la síntesis, síntesis por unidad celular y eficiencia de la retención de proteína entre cualquier par de estos parámetros y de cada uno con las dietas deficiente, + lisina-libre, + lisina-encapsulada y control.

17.- La aclimatación a 18 °C disminuyó, en músculo blanco, las tasas de crecimiento (K_G), la síntesis proteica (K_S) y la eficacia de la síntesis (K_{RNA}) para todas las dietas, sin afectar claramente la capacidad del proceso (C_S). A diferencia del hígado, que es un tejido

regulador, el músculo blanco no presentó una clara compensación adaptativa a menor temperatura y aunque aumentó la capacidad de transcripción (ARN/ADN) y el tamaño celular (proteína/ADN), la eficacia de retención proteica fue menor que a 25 °C.

18.- Las actividades del complejo multicatalítico de la proteinasa (MPC), peptidil-glutamil-peptidasa (PGPH), tipo quimotripsina (CT-L) y tipo tripsina (T-L), determinadas a las temperaturas de 25 °C, en hígado, músculo e intestino, de carpas mantenidas a 18 ó 25 °C, fueron significativamente más altas en carpas alimentadas a la menor temperatura. A diferencia de la trucha, la carpa, a su temperatura óptima, presentó unas actividades más altas en hígado, mientras que las de intestino y músculo fueron muy similares. A 18 °C las actividades PGPH y T-L fueron parecidas en hígado e intestino y menores en músculo, mientras que la actividad CT-L fue similar en intestino y músculo y mayor en hígado.

19.- Las actividades proteásicas del músculo de carpas mantenidas a 18 °C, mantuvieron una cierta proporción con la velocidad fraccional de síntesis (K_s) de este tejido, en función del tipo de dieta, mientras que a 25 °C la relación fue más estrecha con la velocidad fraccional de degradación (K_D). El intestino presentó variaciones, en función de la dieta, que cursaron de manera similar a las del músculo esquelético.

20.- La actividad de la glutamato deshidrogenasa hepática no ha reflejado los cambios de calidad proteica de las distintas dietas, aunque sí ha sido sensible a la temperatura a la que se mantuvieron las carpas.

REFERENCIAS

- Akharbach, H., (1995).** Valoración de diversas materias primas como fuentes de energía y nutrientes esenciales para el crecimiento de la anguila europea (*A. anguila*). *Tesis doctoral*. Universidad de Granada.
- Akiyama, T.; Murai, T.; Hirasawa, Y. y Nose, T. (1984).** Supplementation of various meals to fish meal diet for chum salmon fry. *Aquaculture*, 37: 217-222.
- Alexis, M.N.; Paparaskeva-Papatsoglou, E. y Teochar, V. (1985).** Formulation of practical diets for rainbow trout made by partial or complete substitution of fish meal by poultry by-products and queratin plant by-products. *Aquaculture*, 50: 61-76.
- Andrews, J.W. y Page, J.W. (1974).** *J. Nutr.* 104: 1091-1096.
- Andrews, J.W. y Page, J.W. (1975).** The effects of frequency of feeding on culture of catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 104 (2), pp. 317-321.
- Andrews, J.W., Page, J.W. y Murray, M.W. (1977).** Supplementation of a semipurified casein diet for catfish with free amino acids and gelatin. *J. Nutr.*, 107, pp. 1153-1156.
- Andrews, J.W., Murray, M.W. y Davis, J.M. (1978).** Influence of dietary fat and environmental temperature on digestible energy and absorbability of animal fat in catfish diets. *J.Nutr.* 108: 749-752.
- Anwar, A., Ishak, M.M., El Zeiny, M. y Hassanen, G.D.I. (1982).** *Aquaculture*, 28:321-325.
- AOAC (1985).** Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, D.C. 1018 pp.
- Aoe, H., Masuda, I., Abe, I., Saito, T., Toyoda, T. y Kitamura, S. (1970).** Nutrition of protein in young carp. I. Nutritive value of free amino acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36: 407-413. NP-53.
- Aoe, H., Ikeda, T. y Saito, T. (1974).** Nutrition of protein in young carp. II. Nutritive value of protein hydrolyzates. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40 (4):375-379. NP-54.
- Appelbaum, S. (1985).** Rearing of the Dover sole, *Solea solea* L., through its larvals stages using artificial diets. *Aquaculture* 49: 209-221.
- Appelbaum, S. (1989).** Can inert diets be used more successfully for feeding larval fish?. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 36 (4): 435-437.
- Appelbaum, S. y Van Damme, P. (1988) .** The feasibility of using exclusively dry diet for rearin of Israeli *Clarias gariepinus* B. larvae and fry. *J.Applied. Ichthyol.* 4: 105-110.
- Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, J.W. y Welch, W.J. (1988).** Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease compex. *Nature*, 331,pp. 192-194.
- Austreng, E. (1978).** Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*, 13: 265-272.

- Austreng, E. y Refstie, T. (1979). Effect of varying dietary protein level in different families of rainbow trout. *Aquaculture*, 18: 145-156.
- Austreng, E., Skrede, A. y Eldegard, A. (1980). *Aquaculture* 19: 93-95.
- Arai, S. (1981). *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.* 47: 547-550.
- Asgard, T. y Austreng, E. (1985a). Dogfish offal, ensiled or frozen, as feed for salmonids. *Aquaculture*, 49: 289-305.
- Asgard, T. y Austreng, E. (1985b). Casein silage as feed for salmonids. *Aquaculture*, 48:233-252.
- Ash, R. (1980). Hydrolytic capacity of the trout (*Salmo gairdnerii*) intestinal mucosa with respect to three specific dipeptides. *Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 173-176.
- Ash, R. (1985). Protein digestion and absorption in feeding and nutrition of fish (Cowey, C.B., Bell, J.B. and Mackie, A.M. Eds.). pp. 69-94, Academic Press, London.
- Atherton, W.D. y Aitken, A. (1970). *Comp. Biochem. Physiol.* 36: 719-747.
- Barrett, B.A. y McKeown, B.A. (1989). Plasma growth hormone levels in *Salmo gairdnerii*: studies on temperature and the exercise intensity / duration relationship. *Comp. Biochem. Physiol.* 94A:791-794.
- Barrington, E.J.W. (1957). The alimentary canal and digestion. In: *The Physiology of fishes.* (Brown M.E. ED.), pp. 109-161. New York, Academic Press.
- Beamish, F.W.H. y Thomas, E. (1984). Effects of dietary protein and lipid on nitrogen loss in rainbow trout. *Aquaculture*, 41: 359-371.
- Bergot, F. (1976). Demonstration par le rouge de ruthenium d'invaginations profondes de la membrane plasmique apicale des enterocytes dans l'intestin posterieur chez la truite arc-en-ciel. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 16: 37-42.
- Bergot, F. (1979a) Effects of dietary carbohydrates and on their mode of distribution in glycaemia in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64: 543-547.
- Bergot, F. (1979b). Problemes particuliers posés par l'utilisation des glucides chez la truite arc-en-ciel. *Ann. Nutr. Alim.*, 33: 247-257.
- Bjornsson, B.T., Thorarensen, H., Hirano, T., Ogasawara, T. y Kristinsson, J.B. (1989). Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 82,pp. 77-91.
- Blow, A.M.J., Van Heyningen, R., y Barrett, A.J. (1975). *Biochem. J.* 145, 591-599.

- Boge, G.; Rigal, A. y Peres, G. (1978). Extension a un melange d'acide amines et d'oligopeptides des conclusions concernant l'influence des variations de temperature sur l'absorption d'un acide amine simple (le glycocolle). *Cahiers Lab. Hydrobiol.*, Montereau.
- Boge, G.; Rigal, A. y Peres, G. (1979). A study of the energized transport mechanisms of glycine absorption by the rainbow trout (*salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 64: 537-541.
- Boge, G.; Rigal, A. y Peres, G. (1981a). A study of in vivo glycine absorption by feed and fasted rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *J. Exp. Biol.* 91: 285:292.
- Boge, G.; Rigal, A. y Peres, G. (1981b). Rates of in vivo intestinal absorption of glycine and glycol-glycine by rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 69:455-459.
- Bonete, M. J.; Manjón, A.; Llorca, F. E., Iborra, A.J. (1984). Acid proteinases in fish. I. Comparative study of extraction of cathepsins B and from *Mujil auratus* muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B: 203-206.
- Borlongan, I.G. (1992). Dietary requirements of milkfish (*Chanos chanos Forsskal*) juveniles for total aromatic amino acids. *Aquaculture*, 102: 309-317.
- Bouche, G. y Vellas, F. (1975). The speed of renewal of the proteins of liver, muscle and plasma in carp (*Cyprinus carpio*) submitted to total and prolonged starvation. *Comp. Biochem. Physiol.* 51A: 185-193.
- Bouguenec, V. (1992). Oligochaetes (Tubificiade and Enchytracidae) as food in fish rearing: a review and preliminary test. *Aquaculture*, 102: 201-217.
- Bowen, S.H. (1981). Digestion and assimilation of periphytic detrital aggregate by *Tilapia mossambica*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110: 239-245.
- Braunstein, A. (1957). Les voies principales de l'assimilation et dissimulation de l'azote chez les animaux. *Adv. Enzymol.* 19: 335-377.
- Brett, J.R. y Groves, T.T.D. (1979a). Physiological energetics. En: W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett, eds. *Fish. Physiology*, vol. VIII. pp. 280-352. Academic Press Inc., Nueva York.
- Brett, J.R. y Groves, T.D.D. (1979b). Physiological energetics. En: *Fish Physiology. VIII. Bioenergetics and Growth* (W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett, Eds.). Academic Press, New York. pp. 279-352.
- Brett, J.R. y Higgs, D.A. (1970). Effect of temperature on the rate of gastric digestion in fingerlings sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in relation to temperature and ration size. *J.Fish.Res.Can.* 26: 2363-2394.
- Brett, J.R. y Zala, C.A. (1975). Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. *J.Fish. Res. Bd. Can.*, 32, pp. 2479-2486.

- Brett, J.R., Shelbourn, J.E. y Shoop, C.T. (1969). *J.Fish.Res. Can.* 26:2363-2394.
- Bromley, P.J., (1987). The effects of food type, meal size and body weight on digestion and gastric evacuation in turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.*, 30, pp. 501-512.
- Brookes, I., Owens, F. y Garrigus, E. (1972). Influences of amino acids levels in the diet upon amino acids oxidation by the rat. *J. Nutr.* 102: 27-36.
- Buclon, M. (1974). Bioelectrical potentials and the transfer of amino acids across the digestive epithelium of the tanche (*Tinca tinca* L.). *J. Physiol.*, Paris, 68: 157-180.
- Buclon, M.; Baubet, R. y Peres, G. (1964). Recherches sur l'absorption intestinale des acides amines chez le poisson. III. La cinetique de l'absorption de l'acide l-glutamique, de la L-leucine et de la L-methionine par l'intestin de la tanche (*Tinca tinca* L.). *Bull. Soc. Sci. Vet. Med. Comp.*, 66: 293-298.
- Bulow, F.J., (1987). RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: A review. En: *Age and Growth of Fish*, (Ed. R.C. Summerfelt y G.E. Hall), Iowa State Univ. Press, Ames, USA.
- Busacker, G.P., Adelman, I.R. y Goolish, E.M. (1990). Growth. En: *Methods for Fish Biology*, (Ed. C.B. Schreck y P.B. Moyle), American Fisheries Society, Bethesda MD, pp. 363-387.
- Busconi, L.; Folco, E.J.; Martone, C.B.; Trucco, R.E y Sánchez, J.J. (1984). Identification of two alkaline proteases and a trypsin inhibitor for muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). *FEBS. Lett.*, 176: 211-214.
- Cardenete, G. (1983). Consecuencias nutritivas de la sustitución energética de la proteína dietaria por grasa y/o hidratos de carbono en la trucha. *Tesis Doctoral*. Univ. de Granada. Granada, España. 224 pp.
- Cardenete, G. y Moyano, F.J. (1988). El amoniaco en los peces. I. Aspectos metabólicos y excreción. *Ars. Pharmaceutica* XXIX (2): 163-172.
- Cardenete, G., García, M. y Zamora, S. (199) *Ars. Pharmaceutica* XXVII (2): 119-128.
- Cardenete, G.; Garzón, A.; Moyano, F.J. y De la Higuera, M. (1991). Nutritive utilization of earthworm protein by fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Proc. IV Int. Symp. on Fish Nutrition and Feeding. Biarritz, Francia. (abstr.)
- Carneiro, J. (1992). Interactions of temperature and dietary levels of protein and energy in pagu. II-Effects on digestibility of protein and transit time through the gastrointestinal tract. *Proc. V Int. Symp. on Fish Nutrition and Feeding*. Santiago, Chile. (abstr.)
- Carrillo, M., Zanuy, S. y Herrera, E. (1980). Daily rhythms of aminoacid levels in the plasma of goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 67A, pp. 581-586.
- Castilla, C. (1974). Influences de l'insuline, du glucagon et du cortisol, sur quee ques aspects du metabolisme glucidique et proteique chez la carpe. *These 3eme cycle*. Univ. P. Sabatier. Toulouse.

- Caulton, M.S. (1977). The effect of temperature on routine metabolism in *Tilapia rendalli* Boulenger. *J. Fish Biol.* 11: 549-553.
- Ceriotti, G., (1952). A microchemical determination of desoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 198, pp. 297-301.
- Chance, R.E.; Mertz, E.T. y Halver, J.E. (1964). Nutrition of salmonids fishes. XII. Isoleucine, leucine, valine and phenylalanine of chinook salmon and interrelations between isoleucine and leucine for growth. *J. Nutr.*, 83:177-185.
- Chaney, A. L. y Marbacht, E.P. (1962). Modified reagent for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8 (2): 130-132.
- Chang, T.M., Mac Intosh, F. y Mason, S.G. (1966). Semipermeable aqueous microcapsules I. Preparation and properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 44: 115-128.
- Chen, H.Y., Leu, T. y Roelants, I. (1992). Effective supplementation of arginine in the diets of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 108, pp.87-95.
- Chiu, Y.N., (1984). Arginine metabolism in rainbow trout fingerlings: requirements, biosynthesis and interactions with dietary electrolytes and basic amino acids. *PhD thesis, Cornell University, New York*.
- Chiu, Y.N., Austic, R.E. y Rumsey, G.L. (1987). Interactions among dietary minerals, arginine and lysine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiol. Biochem.*, 4 (1), pp.45-55.
- Chiu, Y.N., Austic, R.E. y Rumsey, G.L. (1988). Effect of feeding levels and dietary electrolytes on the arginine requirement of rainbow trout (*Salmo gairneri*). *Aquaculture*, 69: 79-91.
- Chiou, J.Y. y Ogino, C. (1975). Digestibility of starch in carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 41: 465-466.
- Cho, C.Y. (1979). En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, vol.II. pp. 239-247. (J.E. Halver y K. Tiews, Eds., Heeneman GmbH). Berlin.
- Cho, C.Y. (1983). Nutrition and Fish Health. En: *A guide to integrated fish health management in the great lake Basin* (F.P. Meyer, J.W. Warren y T.G. Carey, Eds.). Great Lakers Fishery Commission, AM Arbor, Michigan. Spec. Publ. 83-2, 272 pp.
- Cho, C.Y. y Kaushik, S.J. (1985). Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. En: *Nutrition and Feeding in Fish* (C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell, Eds.). Academic Press, London. pp. 95-117.
- Cho, C.Y. y Slinger, S.J. (1978). 1977 Annual Report. pp. 24-35. Editado por Fish Nutrition Laboratory, University of Guelph.
- Cho, C.Y. y Slinger, S.J. (1979). Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (J.E. Halver y K. Tiews Eds.), vol. II. Heenemann Verlagsgesell, Berlín. pp. 239-247.

- Cho, C.Y. y Slinger, S.J. (1980). Effect of water temperature on energy utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Proc. 8th Symp. on Energy Metabolism*. Cambridge, U.K. pp. 287-291.
- Cho, C.Y. y Woodward, W. (1985). Assessment of dietary arginine requirements of young rainbow trout by growth parameters and post prandial serum urea levels. Abstracts XIII. Int. Cong. Nutr. Brighton U.K. Satellite Symp. Biochemical assessment of nutritional requirements and availability in fish.
- Cho, C.Y.; Bayley, H.S. y Slinger, S.J. (1976). Energy metabolism in growing rainbow trout: Partition of dietary energy in high protein and high fat diet. *Proc. 7th Symp. on Energy Metabolism*. Vichy, France. pp. 299-302.
- Cho, C.Y.; Slinger, S.J. y Bayley, H.S. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 25-41.
- Cho, C.Y.; Cowey, C.B. y Watanabe, T. (1985). Finfish nutrition in Asia. Methodological approaches to research and development. *International Development Research Centre*, Ottawa, Ontario, Publ. NO. IDRC-233a, 154 pp.
- Cho, C.Y., Kaushik, S. y Woodward, B. (1992). Dietary arginine requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, vol.102, n° 1, pp. 211-216.
- Choubert, G.; De la Noue, J. y Luquet, P. (1982a). Digestibility in fish: improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture*, 29: 185-189.
- Choubert, G.Jr, Fauconneau, B. y Luquet, P. (1982b). Influence d'une élévation de température sur la digestibilité de la matière sèche, de l'énergie chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii*). *Reprod. Nutr. Develop.* 22: 941-949.
- Cohen, T.; Gertler, A. y Birk, Y. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*). I. Purification of physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B.. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B: 639-646.
- Coloso, R.M; Benitez, L.V. y Tiro, L.B. (1988). The effect of dietary protein-energy levels on growth and metabolism of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Comp. Biochem. Physiol.*, 89A: 11-17.
- Cortamira, N.O., Seve, B., Lebreton, Y. y Ganier, P. (1991). Effect of dietary tryptophan on muscle, liver and whole-body protein synthesis in weaned piglets: relationship to plasma insulin. *Br. J. Nutr.*, 66, pp. 423-435.
- Cowey, C. B. (1975). Aspects of protein utilization by fish. *Proc. Nutr. Soc.* 34: 57-63.
- Cowey, C.B (1979). Protein and amino acids requirements of finfish. *Proc. World Symp. on Finfish Nutr. and Fish Feed Technol.* Berlin Vol. I. pp. 3-16.
- Cowey, C.B. (1980). Protein metabolism in fish. EN. *Protein Deposition in Animals*, (ED. P.J. Buttery y D.B. Lindsay), Butterworths, London, pp. 271-288.

- Cowey, C.B (1981). The food and feeding of captive fish. En: *Aquarium System*, (A.D. Hawkins Ed.), Academic Press, Londres, pp. 223-246.
- Cowey, C.B. y Luquet, P. (1983). Protein metabolism and Nutrition. pp. 365-384. (M. Arnal, R. Pion y D. Bonin, Eds.). INRA, París.
- Cowey, C.B. y Sargent, J.R. (1979). Nutrition. En: *Fish Physiology. VIII. Bioenergetics and Growth* (W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett, Eds.). Academic Press, New York. pp. 1-69.
- Cowey, C.B. y Tacon A.G.J. (1983). Fish Nutrition. Relevance to invertebrates. *Proc. Second. International Conference on Acuaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition* (Pruder G.D., Landgon, C. y Conkkin, W.M.S. Eds.). Special publication nº2, pp. 13-30.
- Cowey, C.B. y Walton, M.J. (1988). Studies on the uptake of (¹⁴C) amino acids derived from both dietary (¹⁴C) protein and dietary (¹⁴C) amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *J. Fish Biol.*, 33, 293-305.
- Cowey, C. B.; De la Higuera, M. y Adron, J.W. (1977a). The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 38: 385-395.
- Cowey, C. B.; Knox, D.; Walton, M. J. y Adron, J. W. (1977b). The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout. *Br. J. Nutr.*, 38: 463-470.
- Creach, Y. (1972). Le jeûne experimental chez la carpe: metabolisme azoté et equilibre hydromineral. *Thèse Doct. Sci.*, Univ. Toulouse.
- Crueger, W. y Crueger, A. (1984). Biotechnology: a textbook of industrial microbiology. *T.D. Brock Ed.*, Science Tech. Inc., Madison, 308 pp.
- Dabrowska, H. (1984). Effect of dietary protein on the free amino acid content in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) muscles. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 77A, nº 3, pp. 553-556.
- Dabrowska, H. y Wojno, T. (1977). Studies on the utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) of feed mixtures containing soya bean meal and addition od amino acids. *Aquaculture*, 10, pp. 297-310.
- Dabrowski, K. (1979). The role of proteolytic enzymes in fish digestion. En: *Cultivation of fish fry and its live food*. (Styczynska-Jurewicz, E.; Backiel, T.; Jaspers, E. y Persoone G. Eds.). Vol. 4, pp. 107-126. European mariculture society. Bredene, Belgica.
- Dabrowski, K., (1982). Postprandial distribution of free amino acids between plasma and erythrocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72A, pp. 753-764.
- Dabrowski, K. (1983a). Lysine requirement for common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. *IV Int. Symp. Protein Metabolism and Nutrition*, Clermont-Ferrand (France), Ed. INRA Publ., 1983, pp. 473-476.

- Dabrowski, K. (1983b). Digestion of protein and amino acid absorption in stomachless fish, common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 74A, n°2, pp. 409-415.
- Dabrowski, K. (1983c). Comparative aspects of protein digestion and amino acid absorption in fish and other animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 74A, n°2, pp. 417-425.
- Dabrowski, K. y Dabrowska, H. (1981). Digestion the protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and also absorption of amino acids within the alimentary tract. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 69A, 99-111.
- Dahlmann, B., Kuehn, I., Rutschmann, M. y Reinauer, H. (1985). *Biochem. J.* 228, 161- 170.
- Das, A.B. y Krishnamoorthy, R.V. (1968). Biochemical changes of muscle proteins in goldfish (*Carassius auratus*) during thermal acclimation. *Experientia*, 25: 594:595.
- Das, A.B. y Prosser, C.L. (1967). Biochemical changes in tissues of goldfish acclimated to high and low temperature I. Protein synthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 21, 449-467.
- De la Higuera, M. (1987). Requerimientos de proteína y aminoácidos en peceS. En: *Nutrición en Acuicultura* (J.E. Espinosa de los Monteros y U. Labart, Eds.), vol. II. Plan Form. Tec. Sup. Acuic. CAYCIT, Madrid.pp. 53-98.
- De la Higuera, M. y Cardenete, G. (1987). Fuentes alternativas de proteína y energía en acuicultura. En: *Nutrición en Acuicultura* (J.E. Espinosa de los Monteros y U. Labart, Eds.), vol. II. Plan Form. Tec. Sup. Acuic. CAYCIT, Madrid. pp. 59-129.
- De la Higuera, M. y Cardenete, G. (1993). La proteína en la nutrición de los peces. En: *Acuicultura marina. Fundamentos biológicos y Tecnología de la producción*. Ed. Universidad de Barcelona. pp. 195-219.
- De la Higuera , M., Murillo, A., Varela, G. y Zamora, S. (1977). The influence of high dietary fat levels on protein utilization by the trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 56: 37-41.
- De la Higuera, M., Sanchez-Muniz, F.J., Mataix, F.J. y Varela, G. (1981). Nitrogen utilization by rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fed on the yeast *Hansenula anomala*. En: *Nutrition of salmonid fishes VI. Protein requeriments of chinook salmon at two water temperatures*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69: 583-586.
- De la Higuera, M.; Garcia-Gallego, M.; Sanz, A.; Cardenete, G.; Suarez, M.D. y Moyano, F.J. (1988). Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 37-50.
- Delong, D.C., Halver, J.E. y Mertz, E.T. (1958). Nutrition of salmonid fishes VI. Protein requeriments of chinook salmon at to water temperatures. *J.Nutr.* 65: 589-598.
- Deshimaru, O. (1981). Studies on nutrition and diet for prawn *Penaeus japonicus* . Mem. Kagoshima Prefect. Fish. Exp. Stn. 12: 1-118.

- Deshimaru, O. (1982). Protein and amino acids nutrition of the prawn *Penaeus japonicus* In: Pruder G.D. Langdon C.J. y Conklin D.E. Eds.). *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University Press, Baton Rouge, L.A. pp. 106-123.
- Dresdner, K., Barker, L. A., Orłowski, M. y Wilk, S. (1982). *J. Neurochem.* 38, 1151-1154. (citado por Orłowski, M. ,1990).
- Driscoll, J. y Goldberg, A.L. (1990). The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-KDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J. Biol. Chem.* 265: 4789-4792.
- Dupree, H. K. y Halver, J.E. (1970). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 99: 90-97.
- Elliot, J.M. (1982). The effects of temperature and ration size on the growth and energetics of salmonids in captivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 B: 81-91.
- Espe, M. y Lied, E. (1994) Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixtures of free amino acid to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis? *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 107A, n° 1, pp. 249-254.
- Espe, M. y Njaa, L.R. (1991). Growth and chemical composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) given a fish meal diet or a corresponding free amino acid diet. *Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernaering*, IV (2),pp. 103-110.
- Espe, M., Lied, E. y Torrissen, K. (1993). Changes in plasma and muscle free amino acids in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 105A, n°3, pp. 555-562.
- Eytan, E.; Ganoth, D.; Armon, T. y Hershko, A. (1989). ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7751-7755.
- Evans, D. (1984). Modes of ammonia transport across fish gills. *Abstract B26, Ist Int. Cong. Comp. Physiol. Biochem.*, Liege, Belgium.
- Everson, W.V., Flaim, K.E., Susco, D.E., Kimball, S.R. y Jefferson, I.S. (1989). Effect of amino-acid deprivation on initiation of protein synthesis in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 256,pp. C18-C27.
- Falkenburg, P.E., Haass, J, Kloetzel, P.M., Niedel, J.K., Kopp, F., Huehn, I. y Dahlmann, B. (1988). *Drosophila* small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase. *Nature*, 331, pp. 190-192.
- Fange, R. y Grove, D. (1978). Digestion. En: *Fish Physiology*, vol. VI. W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (Eds). Academic Press, New York, pp. 161-260.
- Fange, R. y Grove, D (1979). Digestion. En: *Fish Physiology. VIII Bioenergetics and Growth* (W.S.Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett, Eds.). Academic Press, New York. pp. 162-241.

- FAO (1983) *Fish feeds and feeding in developing countries*. UNDPL/FAO, ADCP/REP/83/18, 97 pp.
- Fauconneau, B. (1980). Synthèse protéique in vivo chez la truite arc en ciel (*Salmo gairdnerii* R) Metabolisme de la leucine. Influence de la température. *Tesis Doctoral Ing.*, pp. 110, INA, París.
- Fauconneau, B., (1984). The measurement of whole body protein synthesis and larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B: 845-850.
- Fauconneau, B., (1985). Protein synthesis and protein deposition in fish. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, (Ed. C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.C. Bell), pp. 17-45. Academic Press London.
- Fauconneau, B., (1988). Partial substitution of protein by a single amino acid or an organic acid in rainbow trout diets. *Aquaculture*, 79, pp. 29-36.
- Fauconneau, B. y Arnal, M. (1985). In vivo protein synthesis in different tissues and the whole body of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R). Influence of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82A, pp. 179-187.
- Fauconneau, B., Arnal, M. y Luquet, P. (1981). In vivo protein synthesis in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.) muscle. Effect of temperature acclimatization. *Reprod. Nutr. Develop.*, 21, pp. 293-301.
- Fauconneau, B., Choubert, G., Blanc, D., Breque, J. y Luquet, P. (1983). Influence of environmental temperature on flow rate of food stuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture*, 34, pp. 27-39.
- Fauconneau, B., Breque, J. y Bieller, C. (1989). Influence of feeding on protein metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 79: 29-36.
- Fauconneau, B. P., Aguirre, J. y Blanc, J.M. (1990). Protein synthesis in different tissues of mature rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). Influence of triploidy. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97C, pp. 345-352.
- Fauconneau, B., Basseres, B. y Kaushik, S.J. (1992). Oxidation of phenylalanine and threonine in response to dietary arginine supply in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A, pp. 395-401.
- Fernández, C. (1994). Diseño de alimentos microencapsulados para el inicio de la alimentación de peces marinos. respuesta trófica de las larvas de dorada (*Sparus auratus*, L) ante este tipo de alimentación. *Tesis Doctoral*, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Cádiz. pp.163.
- Fischer, Z. y Lipka, J. (1983). The role of amino acids in the nitrogen metabolism of artificially fed carp. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 30, 4: 363-379.
- Fleck, A. y Munr, H.N. (1962). Precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thanhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochem. Biophys. Acta.*, 55: 571.

- Folco, E.J.; Busconi, L.; Martone, C.B.; Trucco, R.E. y Sanchez, J.J. (1984). Action of two alkaline proteases and trypsin inhibitor from white croaker skeletal muscle in the degradation of myofibrillar proteins. *FEBS Lett.*, 176: 215-219.
- Folco, E.J.; Busconi, L.; Martone, C.B. y Sanchez, J.J. (1988a). Multicatalytic proteinase in fish muscle. *Archs Biochem. Biophys.*, 267: 599-609.
- Folco, E.J.; Busconi, L.; Martone, C.B.; Trucco, R.E. y Sanchez, J.J. (1988b). Activation of an alkaline proteinase from fish skeletal muscle by fatty acids and sodium dodecyl sulphate. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91: 473-476.
- Folco, E.J.; Busconi, L.; Studdert, C.; Casalongue, C.A. y Sanchez, J.J. (1992). Distribution of multicatalytic proteinase in fish tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102B (2): 311-313.
- Fowler, L.G. (1980) Substitution of soy bean and cotton seed products for fish meal in diets fed to chinook and coho salmon. *Prog. Fish Cult.*, 42: 87-91.
- Fowler, L.G. (1990). Feather meal as a dietary protein source during parr-smolt transformation in fall chinook salmon. *Aquaculture*, 89: 301-314.
- Fraisse, M.; Woo, N.Y.S.; Noaillac, I. y Murat, I.C. (1981) Distribution pattern of digestive enzyme-activities in the intestine of the catfish (*Ameiurus nebulosus* L.) and the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Bioc. A.* 70: 443-446.
- Fujita, Y., Yamamoto, T., Rikimaru, T., Evisawa, H. y Inoue, G. (1981). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 27: 129-147.
- Fujiwara, T., K. Tanaka, E. Orino, T. Yoshimura, A. Kumatori, T. Tamura, C.H. Shung, T. Nakai, K. Yamagushi, S. Shun, A. Kakizuka, S. Nakanishi y A. Ichahara, (1991). "Proteosomes are essential for yeast proliferation. cDNA cloning and gene disruption of two major subunits". *J. Biol. Chem.*, 265, p. 16604-16613.
- Furuichi, M. y Yone, Y. (1982) Availability of carbohydrate in nutrition of carp and red searn bream. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 48: 945-948.
- Gallagher, M. L. (1984). Protein and energy as dietary components of feeds for aquaculture operations involving striped bass hybrids. pp. D170-189. En: B.J. Copeland editor. *University of North Carolina. Sea Grant College Program Proposal for 1985-1987, vol. 2.* University of North Carolina. EEUU.
- Gallagher, M.L. y Degani, G. (1988). Poultry meal and poultry oil as sources of protein and lipid in the diet of European eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, 73, 177-187.
- Gallagher, M.L. y Matthews, A. M. (1987). Oxygen consumption and ammonia excretion of the american eel, *A. rostrata*, fed diets with varying protein energy ratios and protein levels. *J. World Aquacult. Soc.*, 18: 107-112.
- Gallagher, M. L.; Kane, E. y Beringer, R. (1984). Effect of size on composition of the American eel (*Anguilla rostrata*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78: 533-536.

- García, M., Zamora, S., López, M.A. (1981). The influence of partial replacement of protein by fat in the diet on protein utilization by the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 68: 457-460.
- Garlick, P.J., McNurland, M.A. y Preedy, V.R. (1980). A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of ³H-Phenylalanine. *Biochem. J.*, 192: 719-723.
- Garzón, A., Peragón, J., Hidalgo, M.C., Cardenete, G., Lupiáñez, J.A. y De la Higuera, M. (1992). Influence of dietary lysine availability on the fractional rates of protein synthesis and degradation in liver and white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Actas del V Symp. Int. sobre Nutrición y Alimentación de Peces*, Chile, 1992. pp. 72.
- Goldspink y Kelly, (1984). Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from the foetus to senility. *Biochem. J.*, 217: 507-516.
- Goldspink, D.F., Lewis, S.E.M. y Kelly, F.J. (1984). *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish*. Toba, Japon. pp. 315-324.
- Gomes, E.F. y Kaushik, S.J. (1989). Incorporation of lupin seed meal, colzaoro or triticale as protein/energy substitutes in rainbow trout diets. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish*. Toba, Japon. pp. 315-324.
- Goolish, E.M., Barron, M.G, y Adelman, I.R (1984). Thermoacclimatory response of nucleic and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. *Can. J. Zool.*, 62, 2164-70.
- Gras, J.; Gudefin, Y. y Chagney, F. (1978). Free amino acids and ninhydrine positive substances in fish. I. Muscle and skin of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B: 369-372.
- Gras, J.; Gudefin, Y., Chagney, F. y Perrier, H. (1982). Free amino acids and ninhydrine positive substances in fish. II. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B. 845-847.
- Groot, J.A.; Albus, H.; Bakker, R. y Dekker, K. (1983). Changes in sugar transport and in electrophysiological characteristics of intestinal preparations of temperature acclimated goldfish (*Carassius auratus* L.). *J. Comp. Physiol.* 151: 163-170.
- Grove, D.J., Loizides, I. y Nott I. (1978). Station amount, frequency of feeding and gastric emptying rate in *Salmo gairdnerii*. *J. Fish Biol.*, 12: 507-516.
- Guillaume, J., Stephan, G., Messenger, J.L. y Garin, D. (1984). *Ichthyophysiological ActA*. 8: 204-211.
- Guillaume, J., Stephan, G. y Aldrin, J.F. (1985). *Ichthyophysiological Acta* 9: 169-176.
- Hallinan, T., Fleck, A. y Munro, H.N. (1963). Loss of ribonucleic acid (RNA) into lipid solvents after acid precipitation. *Biochim. Biophys. Acta* 68: 131-133.

- Halver, J.E., Bate S. L.S. y Mertz, E T. (1964) Protein requirements of sockeye salmon and rainbow trout. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 23: 1778.
- Harding, D.E.; Allen, O.W.JR. y Wilson, R.P. (1977). Sulfur amino acid requirement of channel catfish: L-methionine and L-cystine. *J. Nutr.*, 107: 2031-2035.
- Harmon, C.S., Proud, C.G. y Pain, V.M. (1984). Effect of starvation, diabetes and acute insuline tratment on the regulayion of polypeptide chain initiation in rate skeletal muscle. *Biochem. J.*, 223: 687-696.
- Harper, A.E.; Benevenga, N.J. y Wohlhueter, R.M. (1970). Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.*, 50: 428-458.
- Haschemeyer, A.E.V. (1968). Compensation of liver protein synthesis in temperature acclimated toadfish, *Opsanus tau*. *Biol. Bull.* 135, 130-140.
- Haschemeyer, A.E.V. (1969). Rates of polypeptide chain assembly in liver *in vitro*: relation to the mechanism of temperature acclimation in *Opsanus tau*. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 62, 128-135.
- Haschemeyer, A.E.V. (1983). A comparative study of protein synthesis in notothenids and icefish at palmer station, Antarctica. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76B: 541-543.
- Haschemeyer, A.E.V. (1985). Cold adaptation and genome organization in an Antartic fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 523-530.
- Haschemeyer, A.E.V, y Mathews, R.W.. (1982). Effect of temperature extremes on protein sysnthesis in liver of toadfish, *Opsanus tau*, in vivOo. *Biol. Bull.* 162: 18-27.
- Haschemeyer, A.E.V, y Smith, M.A.K. (1979). Protein synthesis in liver, muscle and gill of mullet (*Mugil cephalus* L.) in vivo. *Biol. Bull.* 156: 93-102.
- Haschemeyer, A.E.V., Persell, R. y Smith, M.A.K. (1979). Effect of temperature on protein synthesis in fish of the Galapagos and Perlas Islands. *Comp. Biochem. Physiol.*, 64B: 91-95.
- Hase, J., Kobashi, K., Nakai, K., Mitsui, K., Iwata, K. y Takadera, T. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 611, 205-213.
- Hawkins, A.D., (1985). Relationships between the synthesis and breakdown of protein dietary absorption and turnover of nitrogen and carbon in the blue mussels *Mytilus edulis*. *Oecologia*, 66, pp. 42-49.
- Hawkins, A.J.S., Wilson, I.A. y Bayne, B.L. (1987). Thermal responses reflect protein turnover in *Mytilus edulis* L. *Funtional EcoL.* 1: 339-351.
- Hayashi, S.; Kawabat, M. Itakura, T. y Ooshiro, Z. (1982). Changes of some carbohydrates and aminoacids in the blood of eel after feeding. *Mem. Fac. Fish, Kagoshima Univ.*, 31: 259-266.

- Hayworth, L. (1983). Microencapsulacion process. *UK Patent GB 2 103 568 A*.
- Heming, T.A. (1982). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 184-190.
- Heming, T.A, McInerney, J.E. y Alderdin, D.F. (1982). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1574-1562.
- Hendil, K.B. (1988). *The 19S multicatalytic 'prosome' proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. Biochem. Int.*, 17: 471-478.
- Heinrikson, R.L. y Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 136, pp. 65-74.
- Hepher, B. (1988) *Nutrition of Pond Fishes*. Cambridge University Press, Cambridge. 388 pp.
- Hershko, A. y Ciechanover, A. (1982). *Annu. Rev. Biochem.* 51, 335-364.
- Hew, M. y Cuzon, G. (1982). Effects of dietary lysine and arginine levels, and their ratio, on the growth of *Penaeus japonicus* juveniles. *J. World Maricult. Soc.* 13: 154-156.
- Hickling, C.F. (1966). On the feeding process in the white amur, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Zool.* 140:408-419.
- Hidalgo, F. y Alliot, E. (1988). Influence of Water Temperature on Protein Requirement and Protein Utilization in Juvenile Sea Bass, (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 72: 115-129.
- Hidalgo, F., Alliot, K. y Thebault, L. (1987). Methionine and cystine supplemented diets for juvenile Sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 64:209-217.
- Hilton, I.W. (1983). Potential of freeze dried worm meal as a replacement for fish meal in trout diet formulation. *Aquaculture*, 32: 277-283.
- Hilton, I.W. y Slinger, S.L. (1981) Nutrition and feeding of rainbow trout. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 55: 15 pp.
- Hofer, R. (1979). The adaptation of digestive enzymes to temperature season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L. proteases. *J. Fish Biol.* 15: 373-379.
- Hofer, R. (1982). Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. *Comp. Biochem. Physiol.* 72A: 55-63.
- Hofer, R. y Schiemer, F. (1981). Proteolytic activity in the digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia (BerL.)* 48: 342-345.
- Hofer, R. y Sturmbauer, C. (1985). Inhibition of trout and carp alpha-amylase by wheat. *Aquaculture*, 48: 277-283.
- Hofer, R.; Dalla Via, G.; Troppmair, J. y Giussani, G. (1982). Differences in digestive enzymes between cyprinid and non-cyprinid fish. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* 40: 201-208.

- Houlihan, D.F., (1991). "Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics". En: *Advances in Comparative and Environmental Physiology* Vol.7, (Ed. R. Gilles), Springer-Verlag, Berlín, p. 1-43.
- Houlihan, D.F. y Laurent, P. (1987). Effect of the exercise training on the performance, growth and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.*, 44: 1614-1621.
- Houlihan, D.F.; McMillan, D.N. y Laurent, P. (1986). Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in rainbow trout: effects of body size. *Physiol. Zool.*, 59: 482-493.
- Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C. y Noble, B.S. (1987). The effects of nutrient intake on protein turnover in cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 96, pp. 482-493.
- Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C. y Noble, B.S. (1988). Growth rates and protein turnover in atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish Aquatic. Sci.*, 45, pp. 951-964.
- Houlihan, D.F., Hall, S.J. y Gray, C. (1989). Effects of ration on protein turnover in coD. *Aquaculture*, 79, pp. 103-110.
- Houlihan, D.F., Mathers, E.M. y Foster, A. (1993). Biochemical correlates of growth rate in fish. En: *Fish Ecofisiology*, (Ed. J.C. Rankin y F.B. Jensen), Chapman & Hall Fish and Fisheries Series 9, London, 1993.
- Hossain, M.A. y Jauncey, K. (1989). Studies on the protein, energy and amino acid digestibility of fish meal, mustard oilcake, linseed and sesame meal for common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Aquaculture*, 83: 59-72.
- Hughes, S.G. (1985). Evaluation of glutamic acid and glycine as sources of nonessential amino acids for lake trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81: 669-671.
- Hughes, S.G. (1988). Assessment of lupin flour as a diet ingredient for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 379-385.
- Hughes, S.G. (1991). Use of lupin flour as a replacement for full-fat soy in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 93: 57-62.
- Hughes, S.G. y Rumsey, G.L. (1983). Dietary requirements of essential branched-chain amino acids by lake trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 812-817.
- Hughes, S.G.; Rumsey, G.L. y Neshelm, M.C. (1984). Effects of dietary excesses of branched chain amino acids on the metabolism and tissue composition of lake trout (*Salvelinus fontinalis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78A: 413-418.
- Huisman, E.A. (1976). Food conversion efficiencies at maintenance and production levels for carp, *Cyprinus carpio L.* and rainbow trout, *Salmo gairdnerii R.*. *Aquaculture*, 9: 259-276.

- Jagus, R., Anderson, W.F. y Safer, B. (1981).** The regulation of initiation of mammalian protein synthesis. *Prog. Nuc. Ac. Res. Mol. Biol.*, 25, pp. 127-183.
- Jankowsky, H.D., Hotopp, W. y Vsiansky, P. (1981).** Effects of assay and acclimation temperatures on incorporation of amino acids into protein of isolated hepatocytes from the european eel, *Anguilla anguilla* L.. *J. Therm. Biol.* 6, 201-208.
- Jauncey, K. (1981).** The effects of barying dietary composition on mirror carp (*Cyprinus carpio*) maintained in thermal effluents and laboratory recycling systems In: Proceedings of world symposium on aquaculture in heated effluent and recirculation systems, Vol.II, pp. 247-261. Berlin, Heenemann.
- Jauncey, K. (1982).** The effects of barying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture*, 27: 43-54.
- Jobling, M., (1980).** Gastric evacuation in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of dietary energy level and food composition. *J. Fish Biol.*, 17, pp. 187-196.
- Jobling, M., (1981).** Some effects of temperature, feeding and body weight on nitrogenous excretion in young plaice *Pleuronectes platessa* L.. *J.Fish. Biol.*, 18, pp. 87-96.
- Jobling, M. (1983).** Growth studies with fish-over coming the problems of size variation. *J. Fish Biol.*, 22: 153-157.
- Jobling, M., (1988).** A review of the physiological and nutritional energetics of cod *Gadus morhua*, L., with particular reference to growth under farmed conditions. *Aquaculture*, 70, pp. 1-19.
- Jones, K.A. (1989)** The palatability of amino acids and related compounds to rainbow trout, *Salmo gairdneri* R.. *J.Fish Biol.*, 34: 149-160.
- Jones, D.R. y Randall, D.J. (1978).** The respiratory and circulatory systems during exerciseS. En: Fish Physiology. Hoar, W.S. y Randall, D.J. (Eds.). Vol. 7 pp 425-492. Academic Press. Nueva York y Londres.
- Jones, D.A., Munford, J.G. y Gabbot, P.A. (1974).** Microcapsules as artificial particles for aquatic filter feeders. *Nature* (London) 247: 233-235.
- Jones, D.A., Möller, T., Campbell, R., Munford, J. y Gabbott, P. (1976).** Studies on the design and acceptability of microencapsulate diets for marine particle feeders. Univ. Colleg. North. Wallis, Contrib. n° 44.
- Jones, D.A., Kanazawa, A. y Abdel Rahman, S. (1979a).** Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 17 (1) : 33-43.
- Jones, D.A., Kanazawa, A. y Ono, K. (1979b).** Studies on the nutritional requeriments of the larval stage of *Penaeus japonicus* using microencapsulated diets. *Mar. Biol.* 54: 261-267.

- Jones, D.A., Holland, D. y Jabborie, S. (1984). Current status of microencapsulated diets for aquaculture. *Appl. Biochem. Technol.* 10: 275-288.
- Jones, D.A., Kurmaly, K. y Arshard, A. (1987). Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture* 64: 133-146.
- Jürss, K. (1978). The effects of pyridoxine deficiency on aminotransferase activity in liver and white muscle of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61B: 385-389.
- Jürss, K. (1979). Effect of temperature Salinity, and feeding on amino transferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 64B: 213-218.
- Kamler, E. y Kato, T. (1983). Efficiency of yolk utilization by *Salmo gairnerii* in relation to incubation temperature. and egg size. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 30: 271-306.
- Kanazawa, A., Teshima, S. Inamori, S., Sumida, S. y Iwashita, T. (1982). Rearing of larval red sea bream and ayu with artificial diets. *Mem. Fac. Fish.*, Kagoshima Univ. 31: 183-192.
- Kapoor, B.G.; Smit, H. y Verighina, I.A. (1975) The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.*, 13: 109-239.
- Kaushik, S.J., (1979). Application of a biochemical method for the estimation of amino acid needs in fish: Quantitative arginine requirements of rainbow trout in different salinities. En: *Finfish nutrition and fish feed technology, Vol. I.* J.E.Halver and K.Tiews (Editores), Heenemann, Berlin, pp. 197-202.
- Kaushik, S.J. (1980) Influence of nutritional status on the daily pattern of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reprod. Nutr. Develop.*, 20: 1751-1765.
- Kaushik, S.J. (1981) . Influence of the rise in temperature on the nitrogen excretion on rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.) En: *Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems* (K. Tiews, Ed.) 1. Heenemann Gmbh and Co. Berlín. pp. 77-89.
- Kaushik, S. (1986) Environmental effect on feed utilization. *Fish. Physiol. and Biochem.*, vol. 2, nº 1-4, pp. 131-140.
- Kaushik, S. (1990). Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fish. En: *Mediterranean Aquaculture*, (Ed. R. Flos, L. Tort y P. Torres), Ellis Horwood Limited, 1990.
- Kaushik, S. y Dabrowski, K. (1983) Nitrogen and energy utilization in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) fed casein, amino acids or a protein-free diet. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 23 (4), 741-754.
- Kaushik, S.J. y Faconneau, B. (1984) Effect of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79A: 459-462.
- Kaushik, S.J. y Gomes, E.F. (1988). Effect of frequency of feeding on nitrogen and energy balance

- in rainbow trout under maintenance conditions. *Aquaculture* 73: 207-216.
- Kaushik, S. y Luquet, P. (1977)** Study of free amino acids in rainbow trout in relation to salinity changeS. II.- Muscle free amino acids during starvation. *Ann. Hydrobiol.*, 8 (3), 375-387.
- Kaushik, S. y Luquet, P. (1979)** Influence of dietary amino acid patterns on the free amino acid contents of blood and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.) *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol.64B, pp. 175-180.
- Kaushik, S.J. y Luquet, P. (1980).** Influence of bacterial protein incorporation and sulphur amino acid supplementation to such diets on growth of rainbow trout, *Salmo gairdnerii* R.. *Aquaculture*, 19: 163-175.
- Kaushik, S.J. y Oliva-teles, A. (1985)** Effects of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout.. *Aquaculture*, 50: 89-111.
- Kaushik, S.J., Harache, Y. y Luquet, P. (1977).** *Ann. Hydrobiol.*, 8: 145-151.
- Kaushik, S.J., Dabrowski, K.R., Dabrowska, H., Olah, E. y Luquet, P. (1983).** Utilization of dietary urea in rainbow trout. *Ann. Nutr. Metab.*, 27: 94-106.
- Kaushik, S.J., Faconneau, B. y Blanc, D. (1984).** A study of nitrogen excretion and oxygen consumption in 5 half-sibling families of rainbow trout. *Reprod. Nutr. Develop.* 24: 431-438.
- Kaushik, S.J, Luquet, P., Blanc, D. y Paba, A. (1988).** Studies on the nutrition of the siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). I. Utilization of digestible carbohydrates by sturgeon. *Aquaculture* 76: 97-107.
- Kaushik, S. J., Medale, F., Fauconneau, B. y Blanc, D. (1989).** Effect of digestible carbohydrates on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Aquaculture* 79: 63-74.
- Kaushik, S., Breque, J. y Blanc, D. (1994)** Apparent amino acid availability and plasma free amino acid levels in siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 107A, n° 2, pp. 433-438.
- Kawai, S. e Ikeda, S. (1972)** Studies on digestive enzymes of fishes. II Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 38: 265-270.
- Kawai, S. e Ikeda, S. (1973).** Studies on digestive enzymes of fishes. III Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 39: 819-923.
- Kent, J. y Prosser, C.L. (1980).** Effects of incubation and acclimation temperature on incorporation of U14C glycine into mitochondrie protein of liver cells and slices from green sunfish *Lepomis cyanellus* . *Physiol. Zool.* 53, 293-304.
- Ketola, H.G. (1982)** Amino acid nutrition of fishes: requirements and supplementation of diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 17-24.

- Ketola, H.G. (1983). Requirements for dietary lysine and arginine by fry of rainbow trout J. Anim. Sci. 56: 101-107.
- Kihlberg, R. (1972). Ann. Rev. Microbiology, 26: 427-466.
- Kim, K.I.; Kayes, T.B. y Amundson, C.H. (1983) Protein and arginine requirements of rainbow trout. Fed. Proc., 42: 2198 (abstr.).
- Kim, K.I.; Kayes, T.B. y Amundson, C.H. (1991) Purified diet development and re-evaluation of the dietary protein requirement of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 96: 57-67.
- Kim, K.I.; Kayes, T.B. y Amundson, C.H. (1992a) Requirements for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 101: 95-103.
- Kim, K.I.; Kayes, T.B. y Amundson, C.H. (1992b) Requirements for lysine and arginine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 106: 333-344.
- Kim, Y.K. (1974) Determination of true digestibility of dietary protein in carp with chromic oxide containing diet. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 40: 651-653.
- Kitamikado, M. y Tachino, S. (1960a) Studies on the digestive enzymes of rainbow trout. II. Proteases. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 26: 685-690.
- Kitamikado, M. y Tachino, S. (1960b) Studies on the digestive enzymes of rainbow trout. III. Esterases. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 26: 691-694.
- Kitamikado, M. y Tachino, S. (1960c) Studies on the digestive enzymes of rainbow trout. I. Carbohydrases. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 26: 679-684.
- Klasing, K.C. y Calvert, C.C. (1987). Growth characteristics protein synthesis, and protein degradation in muscle from fast and slow growing chickens. *Poultry Science*, 66, pp. 1189-1196.
- Kloppel, T.M. y Post, G. (1975). Histological alterations in tryptophan deficient rainbow trout. *J. Nutr.* 105: 861-866.
- Knights, B. (1985). En: *Fish Energetics-New Perspectives* (P. Tyler y P. Calow, Eds.), pp.309-340. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Kreeger, D.A. y Langdon, C.J. (1994). Digestion and assimilation of protein by *Mytilus trossulus* fed mixed carbohydrate/protein microcapsules. *Mar. Biol.* 118: 479-488.
- Krogdahl, A. (1989) Alternative protein sources from plant contain antinutrients affecting digestion in salmonids. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish*. Toba, Japan. pp. 253-261.
- Kurmaly, K., Jones, D.A., Yule, A.R. y East, J. (1989). Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae from protozoa 1 to postlarva 1, on live feeds artificial diets and combination of food. *Aquaculture* 81: 27-45.

- Kuz'mina, V.V.(1978). Membrane digestion in cyclostomes and fishes. *J. Ichthyol.* 18(4): 599-611.
- Lacombe, C. (1973). Influence du facteur thermique sur quelques paramètres du métabolisme azoté et hydrominéral chez la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). Thèse Univ. Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Lall, S.P. y Bishop, F.J. (1979). Studies of the nutrients requirements of rainbow trout *Salmo gairdneri* grown in sea water and fresh water En: *Advances in aquaculture*. pp. 580-584, (T.V.R. Pillay y W.A. Dill Eds.). Fishing News Books, Ltd. Farham, Surrey.
- Lall, S.P., Adams, N.J. y Hines, J.A. (1984). *Abstr. Symp. Feeding and Nutrition in Fish*, Aberdeen, 1984.
- Langar, H. y J. Guillaume, (1994). "Effect of feeding pattern and dietary protein source on protein synthesis in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)". *Comp. Biochem. Physiol.*, 108A, p. 461-466.
- Langar, H., J. Guillaume, R. Métailler y B. Fauconneau, (1993). "Augmentation of protein synthesis and degradation by poor amino acid balance on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)". *J. Nutr.*, 123, p. 1754-1761.
- Langdon, C.J. (1989). Preparation and evaluation of protein microcapsules for a marine suspension-feeder, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, 102: 217-224.
- Lee, D.L. y Putnam, G.B. (1973) The responses of rainbow trout varying protein/energy ratios in a test diet. *J. Nutr.*, 103: 916-922.
- Leipoldt, M., Kellner, H.G. y Stark, S. (1984). Comparative analysis of ribosomal RNA in various fish and other vertebrates: Hidden breaks and ribosomal function in phylogenetically tetraploid species of cyprinidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B, 769-777.
- Levy, M. y Andry, M. (1991). Mixed-walled microcapsules made of cross-linked proteins and polysaccharides: preparations and properties. *J. Microencapsulation* 8: 335-347.
- Lewis, a, peo, E., Cunningham, P. y Moser, B. (1977). Determination of optimal dietary proportions of lysine and tryptophan for growing rats based on growth, food intake and plasma metabolites. *J. Nutr.* 107: 1361-1368.
- Lied, E. y Braaten, B. (1984). The effect of feeding and starving and different ratios of protein energy to total energy in the fed on the excretion of ammonia in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78A: 49-52.
- Lied, E. y Rosenlund, G. (1984). The influence of the ratio of protein energy to total energy in the feed on the activity of protein synthesis in vitro, the level of ribosomal RNA and RNA/DNA ratio in white trunk muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A: 489-494.

- Lied, E.; Rosenlund, G.; Lund, B. y Von der decken, A. (1983). Effect of starvation and refeeding on in vitro protein synthesis in white trunk-muscle of atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 76B: 777-781.
- Lied, E.; Lie, O. y Lambertsen, G. (1985). Nutritional evaluation in fish by measurement of in vitro protein synthesis in white trunk muscle tissue. En: *Nutrition and feeding in fish*. (Cowey, C.B.; Mackie, A.M. y Bell, S.G., eds.). Academic Press. Londres.
- Loughna, P.T. y Goldspink, G. (1984). The effects of starvation upon protein turnover in red and white muotomal muscle of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.*, 25: 223-230.
- Loughna, P. T. y Goldspink, G. (1985). Muscle protein synthesis rates during temperature in a eurythermal (*Cyprinus carpio*) and a stenothermal (*Salmo gairdneri*) species of teleost. *J. Exp. Biol.*, 118: 267-276.
- Lowenstein, J. (1972). Ammonia production in muscle and other tissues. The purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev.* 52: 382-413.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.
- Lu, J.D. y Keveren, N. R. (1975). The feability of using waste materials as supplemental fish feed. *Prog. Fish-Cult.*, 37: 241-244.
- Lubochinsky, B. y Zalta, J.P. (1954). Microclosage colorimétrique de l'azote ammoniacal.
- Luquet, P. y Kaushik, S.J. (1981). Besoins en proteines et en acides aminés. En: *Nutrition des poissons* (Fountain, M. Ed.). C.N.R., París, 171-183.
- Luczynski, M., Zaporowski, R. y Golonka, J. (1986). Rearin of european grayling, *Thymallus thimallus* L. , larvae using dry and live food. *Aquacult. Fish. Management.* 17: 275-280.
- Lyndon, A.R., Davidson, I. y houlihan, D.F. (1993) Changes in tissue and plasma free amino acid concentrations after feeding in Atlantic cod. *Fish. Physiol. and Biochem*, vol. 10, n° 5, pp. 365-375.
- Marcotte, G., De la noüe, J. (1984). In vitro intestinal absorption of glycine and L-alanine by rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Rich. *Comp. Biochem. Physiol.* 79:209-213.
- Mathews, R. y Haschemeyer, A.E.V. (1978). Temperature dependency of protein synthesis in toadfish liver in vitro. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61B: 479-484.
- Matthews, W.; Driscoll, J.; Tanaka, K.; Ichihara, A. y Goldberg, A.L. (1989). Involvement of proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*: 86: 2579-2601.
- Maynard, L.A. y Loosli, J.K. (1969) *Animal Nutrition*. Mc Graw-Hill, New York. 613 pp.

- Maynard, L.A. y Loosli, J.K.; Hintz, H.F. y Warner, R.G. (1979) *Animal Nutrition*. Mc Graw-Hill, New York. 602 pp.
- Mazid, M.A.; Tanaka, Y.; Katayama, T.; Simpson, K.L. y Chichester, C.O. (1978). Metabolism of amino acids in aquatic animals. III. Indispensable aminoacids for *Tilapia zilli*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44: 739-742.
- McBean, R.L.; Neppel, M.J. y Goldstein, L. (1968). Glutamate dehydrogenase and ammonia production in the eel. *Comp. Biochem. Physiol.*, 18: 909-920.
- McCallum, I.M. y Higgs, D.A. (1989). An assessment of processing effects on the nutritive value of marine protein sources for juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 77: 181-200.
- McGuire, M.J.; Reckelhoff, J.F.; Croall, D.E. y De martino, G.N. (1988). An enzyme related to the high molecular weight multicatalytic proteinase, macropain, participates in a ubiquitin-mediated, ATP-stimulated proteolytic pathway in soluble extract of BHK 21/c 13 fibroblastes. *Biochim, Biophys.* 967: 195-203.
- McLeese, J.M. y Stevens, E. (1982). The effects of acclimation temperature, assay temperature, and ration on the specific activity of trypsin and chymotrypsin from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 631-634.
- McMillan, D.N. y D.F. Houlihan, (1988). The effect of refeeding on tissue protein synthesis in rainbow trout. *Physiol. Zool.*, 61(5), pp. 429-441.
- McMillan, D.N. y D.F. Houlihan, (1989). Short-term responses of protein synthesis to re-feeding in ranbow trout. *Aquaculture*, 79, pp. 37-46.
- McMillan, D.N. y D.F. Houlihan. (1992). Protein synthesis in trout liver is stimulated by both feeding and fasting. *Fish Physiol. Biochem.*, 10(1), pp. 23-34.
- Mcnurlan, M.A., E.B. Fern y P.J. Garlick, (1982). "Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo". *Biochem. J.*, 204, p. 831-838.
- Meade, J. (1985). Allowable ammonia for fish culture. *Prog. Fish Cult.*, 47: 135-145.
- Medale, F. (1985). Influence d'une réduction du taux d'oxigene de l'eau pendant une période prolongée sur certains aspects du métabolism azoté chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* R). *These 3éme cycle* Univ. Paul Sabatier, Toulouse.
- Meyers, S.P. (1971). Crustacean ration formulation research. *Feedstuffs Lond.* 43 (28) :27.
- Meyers, S.P. (1979). Formulation of water-stable diet for larval fishes. En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (J.E. Halver y K. Tiews Eds.), vol. IL. Heenemann Verlagsgesel, Berlín. pp. 13-20.
- Mikodan, Y.; Yamamoto, M. y Shimido, W. (1963). Studies on muscle of aquatic animals. XXXIX. Protease in fish muscle. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 29: 776-780.

- Mikodan, Y.; Toyohara, H. e Ikeda, S. (1983). On the existence of acid neutral and alkaline proteinase in fish muscle. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 49: 109-112.
- Millikin, M.R. (1982). Quantitative and qualitative nutrient requirements of fish. A review. *Fish. Bull.* 80:655-686.
- Millikin, M.R. (1983). Interactive effects of dietary protein and lipid on growth and protein utilization of age-0 striped bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 185-193.
- Millward, D.J., (1989). The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture*, 79, pp. 1-28.
- Millward, D.J. y Rivers, J. (1988). The nutritional role of indispensable amino acids and the metabolic basis for their requirements. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 42, 367-393.
- Millward, D.J., Garlick, P.J., Stewart, R., Nnanyelugo, D.O. y Waterlow, J.C. (1975). Skeletal muscle growth and protein turnover. *Biochem.J.*, 150, pp. 235-243.
- Millward, D.J., Garlick, P.J., Nnanyelugo, D.O. y Waterlow, J.C. (1976). The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem.J.*, 156, pp. 185-188.
- Millward, D.J., Brown, J.G. y Odedra, G. (1981). Protein turnover in individual tissues with special emphasis on muscle. En: *Nitrogen metabolism in man*, (Ed. J.C. Waterlow y J.M.L. Stephen), Appl Sci Publ, Londres.
- Millward, D.J, Bates, P.C, Coyer, P., Cox, M., Dalal, S., Jepson, M. y Pell, J. (1986). The effect of dietary energy and protein on growth as studied in animal models. In: S.J. Foman y W. Heird (Eds), *Energy and Protein Needs During Infancy*. Academic Press, New York, NY, pp. 127-156.
- Ming, F.W. (1985). Ammonia excretion rate as an index for comparing efficiency of dietary protein utilization among rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) of different strains. *Aquaculture* 46: 27-35.
- Mohsen, A.A. y Lovell, R.T. (1990). Partial substitution of soybean meal with animal protein sources in diets for channel catfish. *Aquaculture*, 90: 303-311.
- Moon, H.Y. y D.M. Gatlin III. (1989). Amino acid nutrition of the red drum (*Sciaenops ocellatus*): determination of limiting amino acids and development of a suitable amino acid test diet. *Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Toba 28 Ago.-1 SepT., Japón, 1989, pp. 201-208.
- Morales, A.E. (1993). Valoración de la utilización nutritiva de materias primas alternativas a la harina de pescado como componentes de dietas comerciales para la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- Morishita, T.; Noda, H.; Kitamikado, H.; Takahashi, T. y Tachino, S. (1964) The activity of the digestive enzymes in fish. *J. Fac. Fish.*, University of Mie (Japón), 6 (2), 239-246.

- Moyano, F.J. (1990) Utilización nutritiva de fuentes proteicas vegetales por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral. Univ. Granada. Granada, España. 236 pp.
- Moyano, F.J.; Cardenete, G (1988). El amoníaco en los peces II. Aspectos tóxicos. *Ars. Pharmaceutica*, Tomo XXIX, nº 2, 1.
- Moyano, F.J.; Hidalgo, F. y De la Higuera, M. (1987). Influencia de la calidad y contenido en nutrientes de la dieta sobre diversas actividades enzimáticas digestivas en la trucha arco iris. *Cuad. Marisq. Publ. Tec.* 12.89-94.
- Moyano, F.J.; Cardenete, G. y De la Higuera, M. (1991) Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A: 759-762.
- Moyano, F.J.; Cardenete, G. y De la Higuera, M. (1992) Nutritive value of diets containing a high percentage of vegetable proteins for trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Living Resour.*, 5: 23-29.
- Munro, H.N., (1976). Clinical nutrition applications of basic concepts in protein metabolism. *Naringsforskning. Arg.*, 20, pp. 173-186.
- Munro, H.N. y A. Fleck, (1966). The determination of nucleic acids. En: *Methods of Biochemical Analysis*, (Ed. D. Glick) Vol. XIV, pp. 113-176, Interscience Publishers, John Wiley e hijos. Nueva York, Londres, Sidney.
- Muñoz, F. (1987) Uso de piensos encapsulados. Alimentación en el cultivo larvario de crustáceos. En: *Alimentación en Acuicultura* (J.E. Espinosa de los Monteros y U. Labart, Eds.). Plan Form. Tec. Sup. Acuic. CAYCIT, Madrid. pp. 219-250.
- Murai, T. (1992) Protein nutrition of rainbow trout.. *Aquaculture*, 100: 191-207.
- Murai, T., Yagisawa, I., Hirasawa, Y., Akiyama, T. y Nose, T. (1980). *Aquaculture* 1: 79-86.
- Murai, T., Akiyama, T. y Nose, T. (1981) Use of crystalline amino acids coated with casein in diets for carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 47 (4), 523-527.
- Murai, T., Akiyama, T. y Nose, T. (1982a) Effects of casein coating on utilization of dietary amino acids by fingerling carp and channel catfish. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 48 (6), 787-792.
- Murai, T., Akiyama, T., Ogata, H., Hirasawa, Y. y Nose, T. (1982b) Effect of coating amino acid with casein supplemented to gelatin diet on plasma free amino acids of carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 48 (5), 703-710.
- Murai, T., Ogata, H. y Nose, T. (1982c) Methionine coated with various materials supplemented to soybean meal diet for fingerling carp *Cyprinus carpio* and channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 48 (1), 85-88.

- Murai, T., Hirasawa, Y., Akiyama, T. y Nose, T. (1983) Effects of dietary pH and electrolyte concentration on utilization of crystalline amino acids by fingerling carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 49 (9), 1377-1380.
- Murai, T., Akiyama, T. y Nose, T. (1984a) Effect of amino acid balance on efficiency in utilization of diet by fingerling carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (5), 893-897.
- Murai, T., Ogata, H., Takeuchi, T., Watanabe, T. y Nose, T. (1984b) Composition of free amino acid in excretion of carp fed amino acid diets and casein-gelatin diets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (11), 1957.
- Murai, T., Ogata, H., Kosutarak, P. y Arai, S. (1986) Effects of amino acid supplementation and methanol treatment on utilization of soy flour by fingerling carp. *Aquaculture*, 56, 197-206.
- Murai, T., Ogata, H., Hirasawa, Y., Akiyama, T. y Nose, T. (1987a) Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 (10), 1847-1859.
- Murai, T., Ogata, H., Kosutarak, P. y Arai, S. (1987b). Effects of methanol treatment and amino acid supplementation on utilization of soy flour by chum salmon fingerlings. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, 12, pp. 37-41.
- Murai, T., Daozun, y Ogata, H. (1989a) Supplementation of methionine to soy flour diets for fingerling carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 77: 373-385.
- Murai, T., Ogata H., Villaneda A. y Watanabe T. (1989b) Utilization of soy flour by fingerling rainbow trout having different body size. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (6), 1067-1073.
- Murray, A. y Marchant, R. (1986). Nitrogen utilization in rainbow trout fingerlings (*Salmo gairdnerii* R.) fed mixed microbial biomass. *Aquaculture*, 54: 263-275.
- Narayansingh, T. y Eales, J.G. (1975). Effects of thyroid hormones on in vivo L-¹⁴C Leucine incorporation into plasma and tissue protein of brook trout and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52B: 399-405.
- National Research Council (1981) Nutrient Requirements of Coldwater Fishes. National Academy Science. Washington, D.C. 63 pp.
- National Research Council (1983) Nutrient Requirements of Warmwaterfishes and Shellfishes. National Academy Science. Washington, D.C. 102 pp.
- National Research Council (1991) Nutrient Requirements of fish. National Academy Science. Washington, D.C.
- Njaa, L.R. y Utne, F. (1982). A comparison of the amino acid composition of 15 species of whole fish. *Fish. Dir. Skr. Ernaering.*, 2: 25-33.

- Nieto, R., Palmer, R.N., Fernández-Fígares, I., Pérez, I. y Prieto, C. (1994). Effect of dietary protein quality, feed restriction and short-term fasting on protein synthesis and turnover in tissues of the growing chicken. *Br. J. Nutr.*, 72, pp. 499-507.
- Noaillac-Depeyre, J. y Gas, N. (1976). Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca*) with respect to its absorptive functions. *Tissue Cell*, 8:511-530.
- Nordlie, F. (1966) Thermal acclimation and peptic digestive capacity in the black bullhead *Ictalurus melas* (Raf.). *Am. Midl. Nat.*, 75: 416-424.
- Nose, T. (1967) Recent advances in the study of fish digestion in Japan. *FAO/EIFAC Tech. Pap.*, 3: 83-94.
- Nose, T. (1971) Determination of nutritive value of food protein in fish: III. Nutritive value of casein and soybean meal in rainbow trout fingerlings. *Bull. Freshwat. Fish. Res. Lab. Tokyo*, 21: 85-98.
- Nose, T. (1972). Changes in the pattern of free plasma amino acids in rainbow trout after feeding. *Bull. Freshw. Fish. Res. Lab. Tokyo*, 22: 137-144.
- Nose, T. (1979). Summary report on the requirements of essential amino acids for carp. In: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J.E. y Tiews, K. Eds.). Berlin: Heenemann Verlagsgesel, pp. 145-156.
- Nose, T., Arai, S., Lee, D. y Hashimoto, Y. (1974) A note on amino acids essential for growth of young carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 40 (9), 903-908.
- Nose, T., D.L. Lee y S. Arai. (1978). The effects of the withdrawal of single amino acid from an amino acid diet on the free amino acid composition of skeletal muscle in young carp. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 28, n°2, pp. 255-263.
- Ogata, H. (1985) Post-feeding changes in distribution of free amino acids and ammonia in plasma and erythrocytes of carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 51 (10), 1705-1711.
- Ogata, H. (1986). Correlations of essential amino acid patterns between the dietary protein and the blood, hepatopancreas, or skeletal muscle in carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 52 (2), 307-312.
- Ogata, H. y Arai, S. (1985) Comparison of free amino acid contents in plasma, whole blood and erythrocytes of carp, coho salmon, rainbow trout and channel catfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 51 (7), 1181-1186.
- Ogata, H. y Murai, T. (1988). Changes in ammonia and amino acid levels in the erythrocytes and plasma of carp, *Cyprinus carpio*, during passage through the gills. *J.Fish Biol.*, 33, pp. 471-480.
- Ogata, H., Arai, S. y Nose, T. (1983) Growth responses of cherry salmon *Oncorhynchus masou* and amago salmon *O. rhodurus* fry fed purified casein diets supplemented with amino acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 49 (9), 1381-1385.

- Ogata, H., Arai, S. y Alvarez, B.M. (1985). Effect of dietary protein levels on free amino acid contents of juvenile European eel *Anguilla anguilla*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, pp. 573-578.
- Ogata, H., Murai, T. e Hirasawa, Y. (1986) Assessment of performance using free amino acid levels in plasma of carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 52 (6), 1071-1075.
- Ogino, C. (1980) Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46: 171-174
- Ogino, C. y Chen, M.S. (1973a) Protein nutrition in fish. 3. Apparent and true digestibility of dietary proteins in carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 39: 649-651.
- Ogino, C. y Chen, M.S. (1973b) Protein nutrition in fish. 4. Biological value of dietary proteins in carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 39: 797-800.
- Ogino, C. y Saito, K. (1970). *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.* 36: 250-254.
- Ogino, C, Chiou, J.Y. y Takeuchi, T. (1975). Protein Nutrition in Fish IV. Effects of dietary energy sources on proteins by rainbow triut and carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.* 42: 213-218.
- Ogur, M. y Rosen, G. (1950). Nucleic acids of plant tissueS. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, 25:262-269.
- Orlowski, M., (1990). The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, 29, pp. 10289-10297.
- Orlowski, M. y Michaud, C. (1989). Pituitary Multicatalitic Proteinase Complex. Specificy of components and aspects of proteolytic activity. *Biochemistry*, 28, pp. 9270-9278.
- Orlowski, M. y Wilk, S. (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101: 814-822.
- Orlowski, M. y Wilk, S. (1988). Multicatalytic proteinase complex or multicatalytic proteinase: a high-Mr endopeptidase. *Biochem. J.*, 255: 750-751.
- Orlowski, M., Cardozo, C., Hidalgo, M.C. y Michaud, C. (1991). Regulation of the peptidylglutamiL.peptide hydrolizing activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochem. J.*, 30: 5999-6005.
- Ott, M.E.; Heisler, N. y Ultsch, C.R. (1980). A re-evaluation of the relationship between temperature and critical oxygen tension in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol*, 67 A: 337-340.
- Owen, T.G. (1975). *Comp. Biochem. Physiol.* 52B: 557-559. (Tomado de Fauconneau, B. 1985).
- Owen, T.G. y Wiggs, A.J. (1971). Thermal compensation in the stomach of the brook trout (*Salvelinus fontinalis* Michill). *Comp. Biochem. Physiol.* 40B: 465-473.

- Pain, V.M. y Clemens, M.J. (1980). Protein synthesis in mammalian systems. En: *Protein Metabolism* Vol. 19B parte 1, (Ed. M. Florkin, A. Neuberger y L.L.M. van Deenen), Elsevier, Amsterdam.
- Pandian, T.J., Vivekanandan, E. (1985). En: *Fish Energetics-New Perspectives* (P. Tyler y P. Calow, Eds.), pp. 99-124. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
- Pannevis, M.C. y Houlihan, D.F. (1992). The energetic cost of protein synthesis in isolated hepatocytes of rainbow trout (*O. mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 162, 393-400
- Page, J.W. (1978). Ph.D. Thesis, Cornell University Ithaca, New York.
- Page, J.W. y Andrews, J.W. (1973). Interactions of dietary levels of protein and energy on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 103: 1339-1346.
- Pappas, C.J., Tiemeier, O.W., y Deyoe, C.W. (1973). Chromic sesquioxide as an indicator in digestion studies on channel catfish. *Prog. Fish-cult.* 35: 97-98.
- Paulson, L.J. (1980). Models of ammonia excretion for brook trout and rainbow trout. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.*, 37: 1421-1425.
- Peragón, J. (1993). Influencias nutricionales y del peso corporal sobre las velocidades fraccionarias de síntesis y degradación proteicas y su relación con las velocidades de crecimiento en el hígado y musculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. pp. 246.
- Peragón, J.; Ortega-garcía, F.; Barroso, J.B. y De la Higuera, M. (1992). Alterations in the fractional protein turnover rates in rainbow trout liver and white muscle caused by an aminoacid-based diet and changes in the feeding frequency. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 36: 217-242.
- Peragón, J.; Barroso, J.B.; García-salguero, L.; De la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (1994). Dietary protein effects on growth and fractional protein synthesis and degradation rates in liver and white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 124: 35-46.
- Persell, R. y Haschemeyer, A.E.V. (1980). Effects of temperature on L-leucine transport in toadfish liver in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 602: 653-660.
- Peter, R.E. (1979). The brain and feeding behavior. En: *Fish Physiology* (Hoar, W.S., Randall, D.J. y Brett, J.R. Eds). Academic Press. pp. 121-159.
- Pickett, M.H., Hew, C. y Davies, P.L. (1983). *Biochim. Biophys. Acta* 739: 97-104. (Tomado de Fauconneau, B. 1985).
- Pike, I.H.; Andorsdottir, G. y Mundheim, H. (1990) The role of fish meal in diets for salmonids. *IAFMM Tech. Bull.*, 24, 35 pp.

- Plakas, S.M. y Katayama, T. (1981) Apparent digestibilities of amino acids from three region of the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio*) after digestion of a protein and corresponding free amino acids diet. *Aquaculture*, 24: 309-314.
- Plakas, S.M., Katayama, T., Tanaka, Y. y Deshimaru, O. (1980) Changes in the levels of circulating plasma free amino acids of carp (*Cyprinus carpio*) after feeding a protein and amino acids diet of similar composition. *Aquaculture*, 21: 307-322.
- Plakas, S.M., Lee, T.C., Wolke, R.E. y Meade, T.L. (1985). Effect of Maillard browning reaction on protein utilization and plasma amino acid response by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J.Nutr.*, 115, pp. 1589-1599.
- Plakas, S.M., Lee, T.C., Wolke, R.E. (1988). Bioavailability of Lysine in maillard browned protein as determined by plasma lysine response in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *J. Nutr.*, 118, pp. 19-22.
- Plantikow, H. (1978). Sperimentelle untersuchungen zur kohlenhidratnutzung bey der regenbogen forellen *Salmo gairdnerii* . Diss. Univ. Rostock. 233 pp.
- Pocrnjic, Z., Mathews, R.W., Rappaport, S. y Haschemeyer, A.E.V. (1983). Quantitative protein synthesis rates in various tissues of a temperate fish in vivo by the method of phenylalanine swamping. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, pp. 735-738.
- Pongmaneerat, J. y Watanabe, T. (1991) Nutritive value of protein of feed ingredients for carp *Cyprinus carpio*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (3), 503-510.
- Possompes, B.P., Bergot, P. y Luquet, P. (1975). *Ann. Hydrobiol.* 6: 131-143.
- Poston, H.A., Riis, R.C., Rumsey, G.L. y Ketola, H.G. (1977). *Cornell VeT.* 67: 472-509.
- Poston, H.A. y Rumsey, G.L. (1983). Factors affecting dietary requirements and deficiency signs of L-Tryptophan in rainbow trout. *J. Nutr.*, 113, pp. 2568-2577.
- Preedy, V.R., Paska, L., Sugden, P.H., Schofield., P.S. y Sugden, M.C. (1988). The effects of surgical stress and short-ten fasting on protein synthesis in vivo in diverse tissues of the mature rat. *Biochem. J.*, 250, pp. 179-188.
- Ravi, J. y Devaraj, K.V. (1991) Quantitative essential amino acids requirements for growth of catla, *Catla catla* (Harnilton). *Aquaculture*, 96: 281-291.
- Rechsteiner, M. (1987). Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3: 1-30.
- Ricahrdson, N.L., Higgs, D.A., Beames, R.M. y McBride, J.R. (1985). Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth, and histopatology in juvenile chinook salmon. *J.Nutr.*, 113, pp. 553-567.
- Reeds, P.J. (1987). Metabolic control and future opportunities for growth regulation. *Anim. Product.*, 45: 149-169.

- Reeds, P.J., M.F. Fuller y B.A. Nicholson, (1985). "Metabolic basis of energy expenditure with particular reference to protein". En: *Substrate and Energy Metabolism in Man*, (Ed. J. Garrow y D. Halliday), John Libbey, Londres, p. 46-57.
- Rivett, A.J. (1989). The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J. Biol. Chem.* 264: 12215-12219.
- Roberts, J.K (1976). The metabolism and growth of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) in fresh and saline waters. *Ph. D. Thesis*. University of Aston, Birmingham.
- Robinson, E.H., Wilson, R.P. y Poe, W.E. (1980) Total aromatic amino acid requirement, phenylalanine requirement and tyrosine replacement value for fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 110: 1805-1812.
- Robinson, E.H., Wilson, R.P. y Poe, W.E. (1981) Arginine requirements and apparent absence of a lysine-arginine antagonist in fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 111: 46-52.
- Robinson, E.H., Poe, W.E. y Wilson, R.P. (1984). Effects of feeding diets containing an imbalance of branched-chain amino acids on fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 37, 51-62.
- Rosenlund, G., Lund, B., Lied, E. y Von Der Decken, A. (1983). Properties of white trunk muscle from Saithe, *Pollachius virens*, rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, and herring, *Clupea harengus*: Protein synthesis in vitro, electrophoretic study of proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, pp. 389-397.
- Rosenlund, G., Lund, B., Sandness, K., Braekkan, O.R. y Von Der Decken, A. (1984). Muscle protein synthesis in vitro of saithe (*Pollachius virens*) correlated to growth and daily energy intake. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B, pp. 7-13.
- Rumsey, G.L. (1981). Why does the salmonid require a high protein diet?. *Salmonid*, 5: 20-24.
- Rumsey, G.L. y Ketola, H.G. (1975). Amino acids supplementation of casein in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) fry and of soybean meal for rainbow trout (*Salmo gairneri*) fingerlings. *Journal Fisheries Research Board Canada*, Vol. 32, nº3, pp.422-426.
- Rungruangsak, K. y Utne, F. (1981). Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Aquaculture* 22: 67-79.
- Rychly, J. (1980). Nitrogen balance in rainbow trout. III. Nitrogen excretion after feeding diets with varying protein and carbohydrate level. *Aquaculture* 20: 343-350.
- Sáez, L., Goicoechea, O., Amthauer, R. y Krauskopf, M. (1982). Behaviour of RNA and protein synthesis during the acclimatization of the carp. Studies with isolated hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B: 31-38.
- Saitoh, Y., Yokosawa, H. y Ishii, S. (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 334-339. (Citado por Orłowski, M., 1990).

- Salter, D.N., Montgomery, A.I., Hudson, A., Quelch, D.B. y Elliott, R.J. (1990). Lysine requirements and whole-body protein turnover in growing pigs. *Br. J. Nutr.*, 63, pp. 503-513.
- Sanchez-Muniz, F.J., De la Higuera, M. y Varela, G. (1982). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72: 693-696.
- Sanchez-Muniz, F.J., De la Higuera, M., Muñoz-Martínez, E. y Varela, G. (1983). Influence of *Hansenula anomala* yeast intake on the liver and kidney metabolism of trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75: 609-613.
- Santiago, C.B. y Lovell, R.T. (1988) Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *J. Nutr.*, 118: 1540-1546.
- Satia B.P. (1974) Quantitative protein requirements of rainbow trout. *Prog. Fish Cult.*, 36: 80-85.
- Satoh, S. (1991). Common carp, *Cyprinus carpio* En: *Handbook of Nutrient Requirements of Finfish* (Robert P. Wilson Ed.). CRC-Press, pp. 55-67.
- Savage, G.E. y Roberts, M.G. (1975). *Brain Behav. Evol.* 12: 42-56.
- Schade, R., (1982). Untersuchungen zur Nahrungsausnutzung im Darm von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Hydrobiol.*, 59, pp. 377-415.
- Scherbina, M.A. y Kazlauskene, O.P. (1971) Water temperature and the digestibility of nutrient substances by carp. *Hydrobiol. J. (SSSR)*, 7: 40-44.
- Scherbina, M.A. y Sorvacev, K.F. (1969). Some data concerning amino acid absorption in digestive tract of 2-years old common carp. *Trudy VNIPRCh*, 16: 315-322.
- Schlisio, W. y Nicolai, B. (1978). Kinetic investigations on the behaviour of free amino acids in the plasma and of two aminotransferases in the liver of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) after feeding on a synthetic composition containing pure amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 59B: 373-379.
- Schlottke, E. (1938-9) The change in the enzyme strength in the intestine of carp during digestion. *Sitzbar. Abhndl. Naturforsch. Ges. Rostoch.*, 7: 27-88.
- Schmidt, E. (1974). Glutamate deshydrogenase. U.V.- Assay. En: *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2. (Bergmeyer, H.U., ed.). Academic Press, Londres. pp. 650-656.
- Schmidt, G. y Thannhauser, S.J. (1945). A method for the detection of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161: 83-89.
- Schulz, D.; Hartfiel, W. y Greuel, E. (1982) Verwendung von nebenprodukten tierischer herkunft in der ern3ihung von regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* R.). II. Einsatz von blut, feder und geflügelschlachtabfallmehl sowie gelatine in einer gereinigten diät. *Z. Tierphysiol., TierernabR. Futtermittelkd.*, 48: 267-275.

- Shanks, W.E., Gahimer, G.D. y Halver, J.E. (1962). Prog. Fish-Cult. 24: 68-73.
- Shaw, H.M., Saunders, R.L. y Hall, H.C. (1975). *J.Fish.Res.Can.*, 32: 1821-1824.
- Shimeno, S.; Hosokawa, K. y Takeda, M. (1979). The importance of carbohydrates in the diet of a carnivorous fish. En: *Proc. World Symp. on Finfish nutrition and fish feed technology*. Vol. 1, pp.118-137. Hamburgo.
- Shimizu, C.; Ibrahim, A.; Tokoro, T. y Shirakawa, Y. (1990) Feeding stimulation in sea bream, *Pagrus major*, fed diets supplemented with Antarctic krill meals. *Aquaculture*, 89: 43-53.
- Shirai, T., Fuke, S., Yamaguchi, K. y Konosu, S. (1983) Studies on extractive components of salmonids-II. Comparison of amino acids and related compounds in the muscle extracts of four species of salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B, n°4, 685-690.
- Sierra, M.A. (1995). *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada
- Sierra, M.A., Hidalgo, F. y De la Higuera, M. (1995). Excreción de amonio en dorada (*Sparus aurata*). *Actas del Vº Congreso Nacional de Acuicultura*, (Ed. F. Castelló y A. Calderer), Sant Carles de la Rápita, 10-13 Mayo 1995, Pub. Univ. Barcelona, pp. 647-649.
- Silk, D. et al., (1973) Absorption of amino acids from an amino acid mixture simulating casein and tryptic hydrolysate of casein in man. *Clin. Sc. Mol. Med.* 45: 715-719.
- Sire, M.F. y Vernier, J.M. (1992) Intestinal absorption of protein in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103A: 771-781.
- Slinger, S.J.; Cho, C.Y. y Holub, B.J. (1977). Effect of water temperature on protein and fat requirements of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). In: *Proceeding 12th Annual Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, pp. 1-5. Guelph, Ontario, University of Guelph.
- Smith, A.K. (1958) Vegetable protein isolates. En: *Processed Plant Protein Foodstuffs* (A.M. Altschul. Ed.). Academic Press, New York. pp. 249-276.
- Smith, A.K.. (1967a) Influence of temperature on the rate of gastric juice secretion in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 21: 125-132.
- Smith, A.K.. (1967b). Selective regulation of amino acid transport by the intestine of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 35: 387-401.
- Smith, M.A.K., (1981). Estimation of growth potential by measurement of tissue protein synthesis rates in feeding and fasting rainbow trout *Salmo gairdnerii* (Richardson). *J. Fish. Biol.*, 19, pp. 213-220.
- Smith, M.A.K. y Haschemeyer, A.E.V. (1980). Protein metabolism and cold adaptation in Antarctic fishes. *Physiol. Zool.* 53: 373-382.
- Smith, M.A.K., Mathews, R.W., Hudson A.P. y Haschemeyer, A.E.V. (1980). Protein metabolism in tropical reef and pelagic fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65B: 415-418.

- Smith, M.W.. (1983). Membrane transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A, 325-335.
- Smith, R.J., (1985). Regulation of protein degradation in differentiated skeletal muscle cells in monolayer culture. En: *Intracellular Protein Catabolism*, (Ed. E.A. Khairallah, J.S. Bond y J. Bird), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 633-635.
- Smith, R.R., (1977). Recent research involving full-fat soybean meal in salmonid diets. *Salmonid*, 1(4), pp. 8-18.
- Smith, T.K., (1985). Effect of leucine-rich dietary protein on in vitro protein synthesis in porcine muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 180, pp. 538-543.
- Somero, G.N. (1978). Temperature adaptation of enzymes: biological optimization through structure-function compromises. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 9: 1-29.
- Somero, G.N. y Doyle, F. (1973). Temperature and the rates of protein degradation in the fish *Gillichthys mirabilis*. *Comp. Biochem Physiol.*, 46B: 463-474.
- Spannhof, L. y Platikow, H. (1983) Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, 33: 95-108.
- Spies, J.R., (1957). Colorimetric procedures for amino acids. II. Ninhydrin method. En: *Methods in Enzimology*, (Ed. S.P.S. Colowick y N.O. Kaplan), Vol. III, pp. 468-471, Academic Press, New York.
- Stafford, E.A. y Tacon, A.G.J. (1985) The nutritional evaluation of dried earthworm meal (*Eisenia foetida*), included at low levels in production diets for rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquacult. Fish. Manag.*, 16: 213-222.
- Steffens, W. (1987) *Principios fundamentales de la alimentación de peces*. Ed. ACRIBIA S.A., Zaragoza. 267 pp.
- Steffens, W. (1987). Further results of complete replacement of fish meal by means of poultry by-products meal in feed for trout fry and fingerling (*Salmo gairdnerii*). *Arch. Anim. Nutr.*, Berlin, 37 1135-1139.
- Steffens, W. y Albretch, M.L. (1982) Krillmehl als eimeibquelle im fishcfutter. 4. Mitt. krillmehl als alleinige tierische eiweibquelle bei der karpfenaufzucht.. *Z. Binnenfischerei DDR*, 29: 79-83.
- Stone, F.E., Hardy, R.W., Shearer, K.D. y Scott, T.M. (1989) Utilization of fish-silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 76: 109-118.
- Storelli, C., S. Vilella, M.P. Romano, M. Maffia y G. Cassano. (1989). Brushborder amino acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. *Am. J. Physiol.*, 257, pp. 506-510.
- Stroban, H.W. y Van Der Veen, F.H. (1980). Localization of protein of absorption during transport of food in the intestine of the grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). In: *Structure and function of the digestive tract of the grasscarp* (Stroban H.W. Ed.) pp. 1-16. Agricultural Universiten of Wageningen, The Netherlands.

- Stroban, H.W. y Van Der Veen, F.H. (1981). Localization of protein of absorption during transport of food in the intestine of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (VaL.). *J. Exp. Zool.* 218:149-156.
- Stroganov, N.S. y Buzinova, N.S. (1969). Enzymatic activity of the grass carp *Ctenopharyngodon idella* intestinal tract II. Proteolytic enzymes. *Vestn. Mosk. Univ., Biol. Pochvoved*, 24(4), 3-7. *Chem. Abstr.*, 7.
- Sugden, P.H. y Fuller, S.J. (1991). Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem. J.*, 273, pp. 21-37.
- Suzuki, O. y Yagi, K. (1976). A fluorimetric assay for β -phenylethylamine in rat brain. *Anal. Biochem.*, 75, pp. 192-200.
- Tacon, A.G.J. y Cowey, C.B. (1985). Protein and amino acid requirements En: *Fish Energetics* (P. Tyler y P. Calow, Eds.), pp. 155-184. Croom Helm. London y Sydney.
- Tacon, A.G.J. y Jackson, J.A. (1985) Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. En: *Nutrition and Feeding in Fish*. (C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell, Eds.). Academic in Press, London. pp. 119-145.
- Tacon, A.G.J.; Stafford, E.A. y Edwards, C.A. (1983a) A preliminary investigation of the nutritive value of three lumbricid worms for rainbow trout. *Aquaculture*, 35: 187-199.
- Tacon, A.G.J.; Haaster, J.V.; Featherstone, P.B.; Kerr, K. y Jackson, A.J. (1983b) Studies on the utilization of full-fat soybean and solvent extracted soy bean in complete diet for rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 49: 1437-1443.
- Tacon, A.G.J., Knox, D. y Cowey, C.B. (1984) Effect of different dietary levels of salt-mixtures on growth and body composition in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 50 (7), 1217-1222.
- Takeuchi T., Yokoyama, H., Watanabe, T. y Ogino, C. (1978). Optimun ratio of dietary energy to protein for rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 44, 727.
- Takeuchi T., Watanabe, T. y Ogino, C. (1979a). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45:983-987.
- Takeuchi T., Watanabe, T. y Ogino, C. (1979b). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45:1521-1525.
- Tanaka, M. (1971). Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae III. Development of the digestive system during postlarval stage. *Jpn. J. Ichthyol.* 18: 164-174.
- Tanaka, Y., Hokazono, S., Katayama, T., Simpson, K.L. y Chichester, C.O. (1977) Metabolism of amino acids in aquatic animals-II The effect of an amino acid supplemented casein diet on the growth rate of carp. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* vol. 26, pp. 45-48.
- Tanaka, K.; Yoshimura, T.; Kumatori, A.; Ichihara, A.; Ikai, M.; Nishigai, K.; Kameyama, K. y Takagi, T. (1988). Proteasomes (multi-protease complex) as 20S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, 263: 16209-16217.

- Teshima, S. y Hara, M. (1983). Epithelial cells of the intestine of the freshwater stingray *Potamotrygen magdalenae* taken from the Magdalena river, Colombia, South America. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.* 49: 1665-1668.
- Teshima, S. y Kanazawa, A. (1983) Effects of several factor on growth and survival of the prawn larvae reared with microparticulate diets. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 49 (12), 1893-1896.
- Teshima, S. y Kanazawa, A. (1988). Nutritive value of methionine-enriched soybean plastein for *Oreochromis niloticus* fry. En: *Proc. 2nd Int. Symp. on Tilapia in Aquaculture, 16-20 March 1987*. R.S.V. Pullin, T.Bhukaswan, K.Tounguthai y J.L. Maclean (EditorEs), Bangkok, Thailand,pp. 393-399.
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Sakamoto, M. (1982). Microparticulate diets for the larvae of aquatic animals. *Min. Rev. Data File Fish. Res.*, 2, 67-86.
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Yamashita, M. (1986). Dietary value of severals proteins and supplemental amino acids for larvae of the prawn *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 51: 225-235.
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Koshio, S. (1990). Effects of methionine-enriched plastein supplemented to soybean- protein based diets on common carp *Cyprinus carpio* and Tilapia *Oreochromis niloticus* . In: Hirano R. y Hanyu, I. (Eds.), *The Second Asian Fisheries Forum*. The Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 279-282.
- Teshima, S., Kanazawa, A. y Koshio, S. (1992). Supplemental effects of methionine-enriched plastein in *Penaeus japonicus* diets. *Aquaculture*, 101, pp. 85-93.
- Thebault, H. (1983) Etude du besoin en methionine chez le loup, *Dicentrarchus labrax*, en milieu controlé. *Tesis Doctoral*. Univ. Marsella. Francia.
- Thebault, H. (1985) Plasma essential amino acids changes in sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) after feeding diets deficient and supplemented in L-methionine. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82A, n°1, pp. 233-237.
- Thebault, H., Alliot, E. y Pastoureaud, A. (1985). Quantitative methionine requirement of juvenile sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 50,pp. 75-87.
- Tiews, K., Groop, J. y Koops, H. (1976). On the development of optimal rainbow trout pellet feeds. *Ach. Fischwiss*, 27, 1-29.
- Trofimova, L.N. (1973) Dynamics of proteolytic activity along the digestive tract in carp in relation to incubation temperature. *Sb. Nauch. Tr. VNIIPRKH*, 10: 170-181.
- Twining, S.S.; Alexander, P.A.; Huibrigtse, K. y Glick, D.M. (1983) A pepsinogen from rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75B: 109-112.
- Vallet, F. (1970). Alimentation artificielle et élevage de Mugil sp. et *Morone labrax*. *These Doctorat Spécialité*, Univ. Aix-Marseille, France, 95 pp.

- Van Der Boon, J., Verhagen, M.A.W.H., Van Der Thillart, Guido E.E.J.M. y Addink, A.D.F. (1991) Free amino acids in whole blood and plasma of two cyprinids, *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* (Cyprinidae:Teleostei) *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 99A, n°3, pp. 391-399.
- Van Waarde, A. (1983). Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B: 675-684.
- Velasquez, L., Ibañez, I., Herrera, C., y Oyarzun, M. (1991). *Anim. Prod.*, 53: 119-122
- Vellas, F. , Parent, J.P. , Bahamondes, I. y Charpentreau, M. (1982). Influence d'une augmentation de la température sur certains aspects du catabolisme azoté chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdnerii* R.). *Reprod. Nutr. Develop.* 22: 851-864.
- Vergara, J.M. (1992) *Studies on the utilization of dietary protein and energy by gilthead sea bream (Sparus aurata L.) Tesis Doctoral.* Univ. Stirling. Stirling, Scotland. 162 pp.
- Viola, S. y Zohar, G. (1984). Nutrition studies with market size hybrids of tilapia (*Oreochromis*) in intensive culture. 3. Protein levels and sources. *Bamidgh.* 36 (1): 3-15.
- Viola, S., Mokady, S., Rappaport, U. y Arieli, Y. (1982). Partial and complete replacement of fishmeal by soybean meal in feed for intensive culture of carp. *Aquaculture*, 26, pp. 223-236.
- Viola, S.; Arieli, Y. y Zohar, G. (1989) Unusual feedstuffs (tapioca and lupin) as ingredients for carp and tilapia feeds in intensive aquaculture. *J. Aquacult. Bamidgh.*, 40: 29-34.
- Von Der Decken, A. y Lied, E. (1989). Myosin heavy chain synthesis in white trunk muscle of cod (*Gadus morhua*) fed different ration sizes. *Fish Physiol. Biochem.*, 6, pp. 333-340.
- Walford, J. y Land, T.J. (1987) Effects of feeding with microcapsules on the content of essential fatty acids in live foods for larvae of marine fishes. *Aquaculture*, 61: 219-229.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz, J.L. y Kerenyi, T.D. (1971). *Science*, 173, 827-829. (Citado por Orłowski, M., 1990).
- Walton, M.J. (1987). Metabolismo de proteínas y aminoácidos en peces. En: *Nutrición en Acuicultura* (Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U., Eds.). CAYCIT. Madrid. vol. I, pp: 225-303.
- Walton, M.J. y Cowey, C.B. (1977). Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57(B): 143-149.
- Walton, M.J. y Cowey, C.B. (1982). Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73: 59-79.
- Walton, M.J. y Wilson, R.P. (1986). Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein. *Aquaculture*, 51, pp. 105-115.
- Walton, M.J., Cowey, C.B. y Adron, J.W. (1982) Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content. *J. Nutr.* 112: 1525-1535.

- Walton, M.J., R.M. Coloso, C.B. Cowey, J.W. Adron y D. Knox. (1984a). The effects of dietary tryptophan levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *British Journal of Nutrition*, 51, pp. 279-287.
- Walton, M.J., Cowey, C.B. y Adron, J.W. (1984b). The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, 52, 115-122.
- Walton, M.J., Cowey, C.B., Coloso, R.M. y Adron, J.W. (1986). Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. *Fish. Physiol. and Biochem.*, vol. 2, nos. 1-4, pp. 161-169.
- Wang, T.C. y Fuller, M.F. (1989). The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. *Br. J. Nutr.*, 62, pp. 77-89.
- Watanabe, T. (1977). *Technocrat* 10:34-39.
- Watanabe, T.; Takeuchi, T. y Ogino, C. (1979) Studies on the sparing effect of lipids on dietary protein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). En: *Finfish nutrition and fishfeed technology* (J.E. Halver y K. Tiews, Eds.), vol. I. Heenemann Verlagsgesell, Berlín. pp. 113-125.
- Watanabe, T.; Takeuchi, T.; Satoh, S.; Wang, K.W.; Ida, T.; Yaguchi, M.; Nakada, M.; Amano, T.; Yoshijima, S. y Aoe, H. (1989). Development of practical carp diets for reduction of total nitrogen loading on water environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 2217-2235.
- Waterlow, J.C., P.J. Garlick y D.J. Millward, (1978). "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". *Elsevier/North-Holland Biomedical Press*, Amsterdam, 804 p.
- Watt, P.W.; Marshall, P.A.; Heap, S.P.; Loughna, P.T. y Goldspink, G. (1988). Protein synthesis in tissues of fed and starved carp, acclimated to different temperatures. *Fish. Physiol. Biochem.*, 4: 165-173.
- Webb, J.M. y Levy, H.B. (1958). New developments in the chemical determination of nucleic acid. En: *Methods of Biochemical Analysis*, vol. VI, pp 1-30. Glick, D. (Ed). Interscience Publishers, John Wiley e hijoS. Nueva York, Londres, Sidney.
- Winberg, G.G. (1971) *Methods for the estimation of production of aquatic animals*. Academic Press, London. 157 pp.
- Windell, J.T.; Foltz, J.W. y Sarokon, J.A. (1978) Effect of fish size, temperature and amount fed on nutrient digestibility of a pelleted diet by rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107: 613-616.
- Wilk, S. y Orłowski, M. (1980). *J. Neurochem.* 35: 1172-1182. (cit. por Cardozo et. al., 1992)
- Wilk, S. y Orłowski, M. (1983). *J. Neurochem.* 40: 842-849. (cit. por Cardozo et. al., 1992)
- Wilk, S., Pearce, S. y Orłowski, M. (1979). *Life Sci.* 24, 457-464. (cit. por Orłowski, 1990).

- Wilson, R.P. (1983). Quantitative amino acid requirements for channel catfish. *IV Int. Symp. Protein Metabolism and Nutrition*, Clermont-Ferrand (France), Ed. INRA Publ., 1983, pp. 477-480.
- Wilson, R.P. (1985). Amino acid and Protein Requeriments of Fish. En: *Nutrition and Feeding in Fish* (C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell Eds.). pp. 1-16. Academic Press, London.
- Wilson, R.P. (1989). Amino acid and proteinS. En: *Fish Nutrition*, Second Edition (Ed. J.E. Halver), Academic Press, Inc. , pp. 111-151.
- Wilson, R.P. y Halver, J.E. (1986). Protein and amino acid requirements of fishes. *Ann. Rev. Nutr.*, 6, pp. 225-244.
- Wilson, R.P. y Poe, E.W. (1985). Effects of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities of growth of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 46, pp. 19-25.
- Wilson, R.P., Harding, D.E. y Garling, D.L.. (1977). Effect of dietary pH on amino acid utilization and the lysine requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 107, pp. 166-170.
- Wilson, R.P., Allen, O.W. Jr., Robinson, E.H. y Poe, E.W. (1978). Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 108, pp. 1595-1599.
- Wilson, R.P., Poe, E.W. y Robinson, E.H. (1980). Leucine, Isoleucine, Valine and Histidine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 110, pp. 627-633.
- Wilson, R.P., Robinson, E.H. y Poe, W.E. (1981). Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for channel catfish. *J. Nutr.*, 111, pp. 923-929.
- Wilson, R.P., Gatlin III, D. y Poe, W.E. (1985). Postprandial changes in serum amino acids of channel catfish fed diets containing different levels of protein and energy. *Aquaculture*, 49, pp. 101-110.
- Yamada, S. y Yone, Y. (1986) Loss of dietary amino acids during mastication by carp. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 52 (4), 673-676.
- Yamada, S., Simpson, K.L., Tanaka, Y. y Katayama, T (1981a) Plasma amino acid changes in rainbow trout *Salmo gairdnerii* forced-fed casein and corresponding amino acid mixture. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 47 (8), 1035-1040.
- Yamada, S., Tanaka, Y. y Katayama, T. (1981b) Feeding experiments with carp fry fed an amino acid diet by increasing the number of feedings per day. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 47 (9), 1247.
- Yamada, S., Tanaka, Y., Katayama, T., Sameshima, M. y Simpson, K.L. (1982) Plasma amino acid changes in *Tilapia nilotica* fed a casein and a corresponding free amino acid diet. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 48 (12), 1783-1787.
- Yamada, S., Tanaka, Y. y Sameshima, M. (1988) Effect of CMC on nitrogen loss from amino acid diets for carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (5), 883.

- Yamamoto, T. (1966). An electron microscope study of the columnar epithelial cell in the intestine of freshwater teleost: goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo irideus*). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 72: 66-87.
- Yamawaki, H. (1983). Lactate dehydrogenase activity and lactate/pyruvate ratio in muscle of thermally acclimated goldfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74 B: 775-780.
- Yokogoshi, H., Sakuma, Y. y Yoshida, A. (1980). Relationship between nutritional quality of dietary protein and hepatic polyribosome profiles in rats. *J. Nutr.* 110, pp. 383-387.
- Yokoyama, M. y Nakazoe, J.I. (1990). Induction of cysteine dioxygenase activity in rainbow trout liver by dietary sulfur amino acids. *Proceedings of III Int. Symp. of Feeding and Nutrition in Fish*, (Ed. Takeda y Watanabe), pp. 367-372.
- Yokoyama, M. y Nakazoe, J.I. (1991). Effects of dietary protein levels on free amino acids and glutathione contents in the tissues of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A, pp. 203-206.
- Yokoyama, M. y Nakazoe, J.I. (1992). Utilization of methionine supplemented to diet in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(7), pp. 1347-1349.
- Yoshinaka, R.; Sato, M. e Ikeda, S. (1981a) In vitro activation of trypsinogen and chymotrypsinogen in the pancreas of catfish. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 47: 1473-1478.
- Yoshinaka, R.; Sato, M. e Ikeda, S. (1981b) Distribution of trypsin and chymotrypsin and their zyrnogens in digestive system of catfish. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 47: 1615-1618.
- Yoshinaka, R., Tanaka, H., Sato, M. e Ikeda, S. (1982) Purification and some properties of elastase from the pancreas of catfish. *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 48: 573-579.
- Young, V.R., (1974). Regulation of protein synthesis and skeletal muscle growth. *J. Anim. Sci.*, 38, pp. 1054-1070.
- Zeitoun, I.H.; Halver, J.E.; Ullrey, D.E. y Tack, P.I. (1973) Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. *J.Fish.Res.Can.*, 30: 1867-1873.
- Zeitoun, I.H.; Ullrey, D.E., Halver, J.E., Tack, P.I. y Magee, WT (1974). *J.Fish.Res.Can.*, 31: 1145-1148.
- Zeitoun, I.H.; Ullrey, D.E., Magee, W.T., Gill, J.L. y Bergen, W.G. (1976). *J.Fish.Res.Can.*, 33: 167-172.

