

Effect of replacing dietary fish oil with vegetable oils on the fatty acid composition of muscle tissue of juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*)

Efecto de sustituir el aceite de pescado dietético con aceites vegetales en la composición de ácidos grasos del tejido muscular de juveniles de lenguado de California (*Paralichthys californicus*)

D Badillo-Zapata¹, G Correa-Reyes², LR D'Abramo³, JP Lazo⁴, JF Toro-Vázquez⁵, MT Viana^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, CP 22860, Baja California, México.

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, A.P. 453, Ensenada, CP 22800, Baja California, México.

* E-mail: viana@uabc.mx

³ Department of Wildlife, Fisheries and Aquaculture, Mississippi State University, PO Box 9690, Mississippi State, MS 39762, USA.

⁴ Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, CP 22860, Baja California, México.

⁵ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, CP 78210, México.

ABSTRACT. Total replacement of cod liver oil by vegetable oils in the diets of juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*) was analyzed. Five diets were formulated with olive oil, corn oil, linseed oil, and two combinations of linseed oil and corn oil, and compared with a control diet containing cod liver oil during a 12-week feeding experiment. Highest growth was observed in fish fed the control diet; however, no significant differences in growth and survival were observed among the dietary treatments. The fatty acids from linseed, corn, and olive oils were the most accumulated in the tissue, increasing in proportion to the total fatty acids. Reduced levels of 20:5n-3 and 20:4n-6 in the presence of high dietary levels of 18:3n-3 and 18:2n-6 suggest that, as in most marine fishes, synthesis of 18:3n-3 to 20:5n-3 and of 18:2n-6 to 20:4n-6 is either very limited or does not occur. Although the content of 22:6n-3 in the muscle of fish fed the control diet was approximately 2.0 to 2.5 times greater than that in the muscle tissue of fish fed the experimental diets, no significant differences were detected. A proportional decrease in 20:5n-3 among all fatty acids and a lack of an increase in body tissue suggest that this fatty acid was being used to synthesize 22:6n-3. The significant reductions in the level of 20:5n-3 indicate that if the experiment had been conducted over a longer period of time, a level would eventually be reached whereby the dietary deficiency would presumably be reflected by an adverse effect on growth. Additional research is needed, particularly regarding the proportional and quantitative changes of 20:5n-3 and 22:6n-3 in the composition of the muscle tissue.

Key words: fatty acids, vegetable oil, fish oil, California halibut, diet.

RESUMEN. Se estudió el reemplazo total de aceite de hígado de bacalao por aceites vegetales en las dietas de juveniles de lenguado de California (*Paralichthys californicus*). Se formularon cinco dietas con aceites de oliva, maíz, linaza y dos combinaciones de linaza y maíz, y se compararon con una dieta testigo que contenía aceite de hígado de bacalao. Después de 12 semanas de experimentación se observó un crecimiento mayor en los ejemplares alimentados con la dieta testigo; sin embargo, no hubo diferencias significativas en crecimiento y supervivencia entre las dietas experimentales. Los ácidos grasos provenientes de los aceites de linaza, maíz y oliva fueron los más acumulados en los tejidos, incrementando en proporción al total de ácidos grasos. Una reducción de 20:5n-3 y 20:4n-6 en presencia de altos niveles dietéticos de 18:3n-3 y 18:2n-6 sugiere que, como en la mayoría de los peces, la síntesis de 18:3n-3 a 20:5n-3 y de 18:2n-6 a 20:4n-6 es muy baja o inexistente. Aun cuando el contenido de 22:6n-3 en el músculo de los ejemplares alimentados con la dieta testigo fue aproximadamente de 2.0 a 2.5 veces más alto que en el de los ejemplares alimentados con las dietas experimentales, no se observaron diferencias significativas. Un decremento proporcional de 20:5n-3 en comparación con todos los ácidos grasos y la ausencia de un incremento en el tejido sugiere que este ácido graso se utilizó en la síntesis de 22:6n-3. Las reducciones significativas en el nivel de 20:5n-3 indican que si se hubiera realizado el experimento durante un periodo de tiempo más largo, se hubiera llegado a un nivel en donde se registrarían efectos adversos en el crecimiento. Es necesario realizar más estudios, especialmente sobre los cambios proporcionales y cuantitativos de 20:5n-3 y 22:6n-3 en la composición del tejido muscular.

Palabras clave: ácidos grasos, aceite vegetal, aceite de pescado, lenguado de California, dieta.

INTRODUCTION

Recent estimates suggest that the global aquaculture industry uses approximately 2.5 million metric tons (mmt) of fish meal and 0.7 mmt of fish oil, representing 40% and 60%, respectively, of the worldwide production (Mourente and Bell 2006). During the next decade, the increasing demand for fish oil, mainly produced from small marine pelagic fish, will probably exceed available resources (Tacon 2003, Ng *et al.* 2006). During the last ten years, global fish oil production has reached a plateau and further increase is not expected. To satisfy essential n-3 fatty acid requirements of fish, particularly n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), marine fish are commonly fed diets that contain oils derived from marine sources (Tocher 2003). Human health benefits of HUFAs derived from consumption of fish are well documented (Schiano *et al.* 2008, Van Horn *et al.* 2008, Yusof *et al.* 2008), and the demand for large quantities of fish oil rich in n-3 HUFAs by the dietary supplement market has increased. Therefore, with other competing commercial demands, the rapid development of the aquaculture industry cannot be sustained unless oils from alternative sources can effectively replace marine oils to be used in fish diets (Ng *et al.* 2006).

The California halibut (*Paralichthys californicus*) is a flatfish species inhabiting the waters of the Pacific coast of northern Mexico and the United States. It is considered to have a high potential for successful marine aquaculture in both countries (Conklin *et al.* 2003, Herzka *et al.* 2003), and the full production cycle has been successfully conducted under culture conditions by one of the coauthors. Very few studies have been performed to determine the nutritional requirements of the California halibut. Protein requirements of juveniles are reported to be between 50% and 55% of crude protein (Galaviz *et al.* 2008). However, as observed in other fish species, increases in digestible dietary energy influence protein utilization by reducing the use of protein for energy production (protein sparing) in favor of tissue synthesis, as shown by improved protein retention and reduced ammonia excretion (Lupash and Kissil 2005).

Establishing a sustainable culture of the California halibut requires the identification of effective alternative protein and oil sources. The evaluation of alternative oils in diets for marine fish requires information about the interaction between lipid metabolism and diet composition, particularly for diets rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Martins *et al.* 2007). Thus, a preliminary study was conducted to evaluate the effectiveness of replacing dietary fish oil (cod liver oil) with vegetable oils (linseed, corn, olive, and mixtures of linseed and corn) that have different fatty acid profiles, and determine the effect on growth, survival, and fatty acid composition of muscle tissues of this species.

INTRODUCCIÓN

Estimaciones recientes sugieren que la industria de la acuicultura mundial utiliza aproximadamente 2.5 millones de toneladas métricas (mtm) de harina de pescado y 0.7 mtm de aceite de pescado, lo que representa 40% y 60%, respectivamente, de la producción global (Mourente y Bell 2006). Durante la próxima década, la creciente demanda por aceite de pescado, obtenido principalmente de pequeños peces pelágicos marinos, probablemente excederá los recursos disponibles (Tacon 2003, Ng *et al.* 2006). En los pasados diez años, la producción mundial de aceite de pescado ha permanecido estable y, aparentemente, ya no aumentará. Para satisfacer los requerimientos de ácidos grasos n-3 esenciales en peces, en particular los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs, por sus siglas en inglés) como son el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), en general se alimentan los peces marinos con dietas que contienen aceites derivados de fuentes marinas (Tocher 2003). Los beneficios para la salud humana de HUFAs derivados del consumo de pescado han sido bien documentados (Schiano *et al.* 2008, Van Horn *et al.* 2008, Yusof *et al.* 2008) y ha incrementado la demanda de grandes cantidades de aceite de pescado rico en HUFAs n-3 en el mercado de suplementos alimenticios. Por esto y otras demandas comerciales, no es factible sostener el creciente desarrollo de la industria acuícultural a menos de que aceites de otras fuentes alternativas puedan reemplazar efectivamente los aceites marinos utilizados en los alimentos para peces (Ng *et al.* 2006).

El lenguado de California (*Paralichthys californicus*) es un pez plano que habita las aguas de la costa occidental del norte de México y Estados Unidos. Se considera una especie con alto potencial acuícultural en ambos países (Conklin *et al.* 2003, Herzka *et al.* 2003) y uno de los coautores ha logrado completar el ciclo de producción bajo condiciones de cultivo. Se han realizado pocos estudios para determinar las necesidades nutricionales del lenguado de California. Los requerimientos proteicos de juveniles son de entre 50% y 55% de proteína cruda (Galaviz *et al.* 2008). No obstante, como se ha observado en otras especies ícticas, los aumentos en la energía dietética digerible influyen en la utilización de la proteína al reducir el uso de ésta para la producción de energía a favor de la síntesis de tejido, como lo indica la mayor retención de proteínas y la menor excreción de amonio (Lupash y Kissil 2005).

Para establecer un cultivo sustentable del lenguado de California es necesario identificar efectivas fuentes alternativas de proteína y aceite. La evaluación de aceites alternativos en los alimentos para peces marinos requiere contar con información sobre la interacción entre el metabolismo de lípidos y la composición dietética, especialmente en el caso de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

MATERIAL AND METHODS

Fish management

California halibut (*P. californicus*) juveniles were obtained from a research center (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada [CICESE]) in Ensenada, Baja California, Mexico. Two weeks prior to the start of the feeding trial, the experimental fish were acclimated in an indoor closed-recirculating system with a 180-L biological bubble bead filtration system containing seawater (salinity = 35, temperature = $17 \pm 1^\circ\text{C}$), under a photoperiod of 14:10 L:D. During this period, the fish were fed a commercial starter feed for halibut (Nippon Formula Feed Manufacturing Co.) at a rate of 5% per day of the body weight. Thereafter, 540 juveniles, with a mean weight of 5.2 ± 0.2 g ($\pm\text{SD}$) and a mean length of 8.01 ± 0.1 cm ($\pm\text{SD}$), were removed and randomly distributed (30 juveniles per tank) into eighteen 120-L tanks (70 L working water volume). Five experimental diets and a control diet were formulated and randomly assigned, in triplicate, to the tanks. Dissolved oxygen and water quality (ammonium, nitrites, and nitrates) were recorded once each week using a colorimetric kit (Aquarium Pharmaceuticals Inc.) during the 12 weeks of the experiment. Every day, the fish were manually fed an amount equivalent to 5% of their body weight, divided into three separate feedings at 08:00, 12:00, and 20:00 h. The amount of feed supplied was adjusted every 15 days based on the total weight in each tank as determined from the length and weight measurements taken from each fish during the previous day. Total feed intake was calculated during the last eight days of the experiment by subtracting any unconsumed food removed from the tank (calculated on a dry weight basis) from the total feed supplied. Then, the mean daily rate of feed intake (eight days) for each treatment was calculated and expressed as percent of fish body weight. The feed conversion efficiency (FCE) was calculated as follows:

$$\text{FCE} = \frac{\text{Wet weight gain (g)}}{\text{Feed intake (g)}}$$

At the end of the experiment, 10 fish were sacrificed and stored at -80°C for future analyses.

Diet preparation

Five experimental diets and one control diet were formulated (table 1) to be isonitrogenous, isoenergetic, and appropriately balanced to satisfy the presumed nutritional requirements of halibut (Daniels and Gallagher 2002). All experimental diets contained the same percentage of oil, but different sources. Linseed oil, corn oil, and olive oil were exclusively added as the main sources of 18:3n-3, 18:2n-6, and 18:1n-9, respectively. Since these oils do not contain HUFAs in their triglyceride composition, two blends of

(Martins *et al.* 2007). Por tanto, se realizó un estudio preliminar para evaluar la eficacia de sustituir el aceite de pescado (aceite de hígado de bacalao) en la dieta con aceites vegetales (linaza, maíz, oliva y mezclas de linaza y maíz) con diferentes perfiles de ácidos grasos, así como determinar el efecto sobre el crecimiento, la supervivencia y la composición de ácidos grasos del tejido muscular de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de los ejemplares

Se obtuvieron juveniles de lenguado de California (*P. californicus*) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE, Baja California, Mexico). Dos semanas antes de iniciar el experimento, los peces se aclimataron, al interior, en un sistema de recirculación cerrada de agua de mar (salinidad = 35, temperatura = $17 \pm 1^\circ\text{C}$) con un filtro de burbuja para filtración biológica (180 L), bajo un fotoperiodo de 14:10 (luz:oscuridad). Durante este periodo, los ejemplares recibieron un alimento comercial para lenguado (Nippon Formula Feed Manufacturing Co.) a una tasa diaria de 5% de su peso corporal. Posteriormente, 540 juveniles, con un peso medio de 5.2 ± 0.2 g ($\pm\text{DE}$) y una longitud media de 8.01 ± 0.1 cm ($\pm\text{DE}$), fueron trasladados y distribuidos aleatoriamente (30 juveniles por tanque) en 18 tanques de 120 L de capacidad (70 L de volumen de agua). Se formularon cinco dietas experimentales y una dieta testigo, las cuales se asignaron, de forma aleatoria y por triplicado, a los tanques. Una vez por semana, durante las 12 semanas del experimento, se tomaron mediciones del oxígeno disuelto y la calidad del agua (amonio, nitritos y nitratos) con un equipo colorimétrico (Aquarium Pharmaceuticals Inc.). Los peces fueron alimentados diariamente con una cantidad de alimento equivalente a 5% de su peso corporal, suministrada proporcionalmente de forma manual a las 08:00, 12:00 y 20:00 h. La cantidad de alimento proporcionado se ajustó cada 15 días según el peso total correspondiente a cada tanque, el cual se determinó a partir de las mediciones de longitud y peso tomadas de cada ejemplar el día anterior. La ingesta total de alimento se calculó durante los últimos ocho días del experimento, sustrayendo la cantidad de alimento no consumido y retirado del tanque (calculada en peso seco) de la cantidad total de alimento suministrado. Después se calculó la ingesta media diaria de alimento (ocho días) para cada tratamiento, expresándose como el porcentaje de peso corporal de los juveniles. La eficiencia de conversión alimenticia (ECA) se calculó de la siguiente forma:

$$\text{ECA} = \frac{\text{Incremento en peso húmedo (g)}}{\text{Alimento consumido (g)}}$$

Al final del experimento, 10 juveniles fueron sacrificados y almacenados a -80°C para análisis futuros.

linseed oil and corn oil, proportionally containing either 62.5:37.5 or 37.5:62.5 ratios, were additionally included as dietary treatments to provide intermediate levels of 18:3n-3 and 18:2n-6. The control diet was formulated to contain fish oil (table 1). All the ingredients were blended with 50% of water (weight/volume) and mixed until a completely homogeneous dough-like texture was obtained, which was then cold-extruded through a pasta machine (Rosito Bisani) into 3-mm pellets and dried at 60°C for 24 h. The pellets were chopped and screened to an appropriate size (1–2 mm), stored at –25°C in sealed plastic containers, and removed only during feeding.

Proximate analysis of the diets and fish tissues

After 12 weeks of experimentation, five fish were removed from each experimental unit (tank). The whole muscle was removed from each fish and samples from each experimental unit were pooled and stored at –80°C for proximate analysis according to AOAC (1995). Proximate analysis of the control and experimental diets was also performed in triplicate samples. Moisture content was determined by weight loss after drying (60°C for 24 h). The percentage of crude protein was determined by the micro-Kjeldahl method using a factor of 6.25. Crude lipid content was determined after Soxhlet extraction of lipids from dry samples using petroleum ether as the solvent. Dry samples were refluxed at a boiling point of 60°C during 5 to 6 h and then the crude lipid was gravimetrically determined. Ash content was determined gravimetrically after calcination at 550°C for 6 h. The nitrogen-free extract, corresponding to all nutrients not assessed by the aforementioned methodology, such as carbohydrates, vitamins, and other non-nitrogen soluble ingredients, was calculated by difference.

Fatty acid analysis

At the termination of the experiment, five fish were collected per experimental unit and the lipid fraction was extracted from the muscle tissue following the procedure described by Folch *et al.* (1957). Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared according to the method described by Metcalfe *et al.* (1966), and analyzed by gas chromatography (Hewlett Packard 5890II) using a flame ionization detector (260°C), a capillary column (Supelco Omegawax 320, 30 m × 0.32 mm, 0.25 µm film thickness), and helium as the carrier gas. The initial oven temperature was 140°C, but 5 min after sample injection (1 µL) the temperature was increased to 240°C (4°C min⁻¹) and maintained for 10 min. Fatty acids were identified and quantified by comparison with the retention times and areas of standards (Supelco 37 Component FAME Mix; GLC 87, Nu-Chek Prep) and well-characterized profiles of samples of marine oils (PUFA1 and PUFA3, Supelco). Fatty acid concentration was calculated using the equipment software (HP ChemStation rev. A.06 for

Preparación de las dietas

Se formularon cinco dietas experimentales y una dieta testigo (tabla 1) para que fueran isonitrogenadamente, isoenergéticamente y adecuadamente balanceadas para satisfacer los supuestos requerimientos nutricionales del lenguado (Daniels y Gallagher 2002). Todas las dietas experimentales contuvieron el mismo porcentaje de aceite, pero diferentes fuentes. Se utilizaron los aceites de linaza, maíz y oliva como las principales fuentes de 18:3n-3, 18:2n-6 y 18:1n-9, respectivamente. En vista de que estos aceites no contienen HUFAs en su composición de triglicéridos, también se utilizaron dos combinaciones de los aceites de linaza y maíz, a una razón de 62.5:37.5 ó 37.5:62.5, para proporcionar niveles intermedios de 18:3n-3 y 18:2n-6. La dieta testigo se formuló con aceite de pescado (tabla 1). Todos los ingredientes se mezclaron con 50% de agua (peso/volumen) hasta obtener una masa homogénea, la cual fue extruida en frío por una máquina de pastas (Rosito Bisani) para obtener pelotillas (*pellets*) de 3 mm que se secaron a 60°C durante 24 h. El alimento se trituró y se tamizó para obtener un tamaño adecuado (1–2 mm) y se almacenó en contenedores de plástico sellados a –25°C hasta su utilización.

Análisis proximal de las dietas y el tejido

Después de 12 semanas de experimentación, se recolectaron cinco juveniles de cada unidad (tanque) experimental. Se retiró el músculo entero de cada ejemplar y las muestras de cada tanque se combinaron y almacenaron a –80°C para su análisis proximal realizado de acuerdo con AOAC (1995). El análisis proximal de las dietas experimentales y testigo también se realizó por triplicado. El porcentaje de humedad se calculó por pérdida de peso después de secar la muestra a 60°C durante 24 h. El porcentaje de proteína cruda se determinó mediante el método micro-Kjeldahl usando un factor de 6.25. El contenido de lípido crudo se determinó después de la extracción con Soxhlet de los lípidos de las muestras secas, usando éter de petróleo como solvente. Las muestras secas se sometieron a reflujo a un punto de ebullición de 60°C durante 5 a 6 h, determinándose el lípido crudo gravimétricamente. El contenido de cenizas se determinó gravimétricamente después de calcinar la muestra a 550°C por 6 h. El extracto libre de nitrógeno, que corresponde a todos los nutrientes que no se evaluaron en la metodología anterior, tales como los carbohidratos, las vitaminas y otros ingredientes solubles libres de nitrógeno, se calculó por diferencia.

Análisis de ácidos grasos

Al terminar el experimento, se retiraron cinco ejemplares de cada unidad experimental y se extrajo la fracción lipídica del tejido muscular siguiendo el método descrito por Folch *et al.* (1957). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES)

Table 1. Ingredients and proximate composition (% dry weight) of the diets used to feed California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. The control (reference) diet contained fish oil, L contained linseed oil, O contained olive oil, C contained corn oil, L/C contained a mixture of 62.5% linseed oil and 37.5% corn oil, and C/L contained a mixture of 62.5% corn oil and 37.5% linseed oil.

Tabla 1. Ingredientes y composición proximal (% de peso seco) de las dietas usadas para alimentar juveniles de lenguado de California (*Paralichthys californicus*). Se formuló la dieta testigo (control) con aceite de pescado, L con aceite de linaza, O con aceite de oliva, C con aceite de maíz, L/C con una mezcla de 62.5% de aceite de linaza y 37.5% de aceite de maíz y C/L con una mezcla de 62.5% de aceite de maíz y 37.5% de aceite de linaza.

Ingredients/ Proximate composition	Diets					
	Control	L	O	C	L/C	C/L
Composition (g kg ⁻¹)						
Common ingredients*	880	880	880	880	88	88
Fish oil	120					
Linseed oil		120			75	45
Corn oil				120	45	75
Olive oil			120			
Proteins (%)	53.10	48.90	53.67	55.41	53.38	51.54
Lipids (%)	12.60	12.55	12.54	12.51	12.54	12.52
Ash (%)	4.21	4.28	4.23	4.14	4.43	4.30
Nitrogen-free extract	33.03	35.18	25.48	27.94	28.20	31.64

* Common ingredient composition expressed as g kg⁻¹ of total: casein, 70; fish meal, 105; krill meal, 40; soy concentrate (fat free), 200; fish silage, 30; gelatin, 30; wheat gluten, 180; corn meal (whole), 40; corn starch, 68.5; butyl-hydroxyl-toluene (BTH), 0.25; α -tocopherol, 0.25; sodium benzoate, 1.0; α -cellulose, 80; vitamin mixture, 30; mineral mixture, 5.0; Stay C, 0.5.

Windows) and expressed as milligrams per gram of total lipids. The amount of fatty acid was calculated as the difference between the total and the non-saponifiable lipids and expressed as gram of dry halibut tissue.

Statistical analysis

Data from dietary treatments, biological indices, and fatty acid contents were analyzed by one-way analysis of variance and Tukey's *a posteriori* test to determine possible differences among dietary treatments. All significance levels were set at $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using the Sigma-Stat 3.0 program for Windows.

RESULTS

Proximate analysis revealed no significant differences in crude protein, crude lipid, or ash contents (table 1). Levels of crude protein in the control and experimental diets ranged from 49% to 55% (table 1). The ash and lipid contents were similar among all diets, with mean values of 12.5% and 4.28%, respectively.

The fatty acid compositions of the olive oil (O), linseed oil (L), and corn oil (C) diets were closely associated with the fatty acid profile of the oil sources used; thus, these diets showed high levels of 18:1n-9, 18:3n-3, and 18:2n-6, respectively. In comparison, the diets prepared to contain different proportional blends (62.5:37.5, 37.5:62.5) of linseed oil and corn oil (L/C, C/L) showed intermediate levels of 18:3n-3

se prepararon de acuerdo con Metcalfe *et al.* (1966), y se analizaron por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890II) usando un detector de ionización de flama (260°C), una columna capilar (Supelco Omegawax 320, 30 m $\times$ 0.32 mm, película de 0.25 μ m de espesor) y helio como gas portador. La temperatura inicial del horno fue de 140°C, pero 5 min después de la inyección de la muestra (1 μ L), la temperatura se aumentó a 240°C (4°C min⁻¹) y se mantuvo por 10 min. Los ácidos grasos se identificaron y cuantificaron mediante su comparación con los tiempos de retención de estándares comerciales (Supelco 37 Component FAME Mix; GLC 87, Nu-Chek Prep) y perfiles bien caracterizados de muestras de aceites marinos (PUFA1 y PUFA3, Supelco). La concentración de ácidos grasos se calculó con el programa de cómputo HP ChemStation rev. A.06 para Windows, expresándose como miligramos por gramo de lípidos totales. La cantidad de ácido graso se calculó como la diferencia entre los lípidos totales y no saponificables, y se expresó como gramo de tejido seco del lenguado.

Análisis estadístico

Se analizaron los datos de los tratamientos dietéticos, los índices biológicos y los contenidos de ácidos grasos mediante un análisis de varianza de una vía y la prueba *a posteriori* de Tukey para determinar las posibles diferencias entre los tratamientos. Los niveles de significancia se establecieron en $P < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Sigma-Stat 3.0 para Windows.

and 18:2n-6 (table 2). In the control diet containing fish oil, the concentrations of 20:5n-3 and 22:6n-3 were significantly higher than those present in the experimental diets (table 2).

After 12 weeks, overall survival among the dietary treatments was equal to or higher than 90% and the specific growth rate of fish ranged from 0.70% to 0.84% day⁻¹ (table 3). Daily feed intake among dietary treatments was similar (0.013 to 0.015 g feed per g of organism), corresponding to 1.3% to 1.5% of the body weight. Feed conversion efficiency ranged from 0.45 to 0.53, and was not significantly different among treatments. At the end of the experiment, the macronutrient composition of fish muscle did not significantly differ among treatments (table 3).

Fatty acid composition (g/100 g of lipid) of the muscle of fish fed the different diets was compared to that at the beginning of the experiment (table 4). Compared with the control diet, muscle tissue of fish fed diets L, O, and C contained significantly higher proportions of 18:3n-3, 18:1n-9, and 18:2n-6, respectively, while muscle tissue of juveniles fed diets L/C and C/L contained significantly higher concentrations of both 18:2n-6 and 18:3n-3. The amount of arachidonic acid (20:4n-6) did not differ significantly from that

RESULTADOS

El análisis proximal mostró que no hubo diferencias significativas en los contenidos de proteína cruda, lípido crudo y cenizas (tabla 1). Los niveles de proteína cruda en todas las dietas variaron de 49% a 55% (tabla 1). Los contenidos de cenizas y lípidos fueron similares entre dietas, con valores medios de 12.5% y 4.28%, respectivamente.

La composición de ácidos grasos de las dietas formuladas con aceite de oliva (O), aceite de linaza (L) y aceite de maíz (C) estuvo cercanamente asociada con el perfil de ácidos grasos de las fuentes de aceite utilizadas; por tanto, estas dietas mostraron niveles altos de 18:1n-9, 18:3n-3 y 18:2n-6, respectivamente. En contraste, las dietas preparadas con diferentes proporciones (62.5:37.5, 37.5:62.5) de los aceites de linaza y maíz (L/C, C/L) mostraron niveles intermedios de 18:3n-3 y 18:2n-6 (tabla 2). En la dieta testigo formulada con aceite de pescado, las concentraciones de 20:5n-3 y 22:6n-3 fueron significativamente mayores que los de las dietas experimentales (tabla 2).

Después de 12 semanas, la supervivencia total entre los tratamientos fue igual o mayor que 90% y la tasa específica de crecimiento varió de 0.70% a 0.84% día⁻¹ (tabla 3). La

Table 2. Fatty acid composition (percent of total) of the diets (see table 1) fed juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (porcentaje del total) de las dietas (ver tabla 1) proporcionadas a juveniles de lenguado de California (*Paralichthys californicus*).

Fatty acid	Diets					
	Control	L	O	C	L/C	C/L
C14:0	3.17	1.39	0.81	1.10	0.99	
C16:0	14.77	9.10	14.36	12.13	9.23	13.65
C16:1n-7	7.58	1.06	1.49	1.19	0.99	1.91
C16:2n-4	0.64			0.20		0.26
C16:3n-4	0.49					
C18:0	3.15	3.20	2.46	2.19	2.37	2.42
C18:1n-9	22.92	15.07	58.71	25.98	20.22	20.34
C18:1n-7						
C18:2n-6	10.88	19.53	13.80	48.17	31.95	33.63
C18:3n-3	2.79	44.08	3.19	2.83	27.17	21.61
C20:0		0.30	0.42	0.40	0.22	
C20:1n-9	8.73	0.52	0.54	0.99	0.56	0.79
C20:2	0.33					
C20:3n-6	0.78	1.19	1.31	0.55	0.56	1.00
C20:4n-6	0.43					
C20:5n-3	8.50	1.51	1.76	1.98	1.61	2.28
C22:0		0.35			0.17	
C22:1n-9	0.41	0.40				
C22:2	0.36					
C22:6n-3	9.39	0.90	1.16	1.58	1.08	1.94
C24:0		0.35				

Table 3. Biological indices of California halibut (*Paralichthys californicus*) at the beginning and end of the feeding period, and proximate composition of muscle tissue (dry weight) before and after being fed diets containing different oil sources (see table 1). Values represent mean $\pm$ standard deviation (n = 3).**Tabla 3.** Índices biológicos del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) al principio y final del periodo de alimentación, y composición proximal del tejido muscular (peso seco) antes y después de recibir las dietas formuladas con diferentes fuentes de aceite (ver tabla 1). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (n = 3).

Biological index/ Proximate composition of muscle tissue	Diets							
	Start	Control	L	O	M	L/M	M/L	P
Initial length (cm)		8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.10	8.00 ± 0.20	8.10 ± 0.20	8.00 ± 0.00	8.10 ± 0.10	0.700
Initial weight (g)		5.20 ± 0.20	5.10 ± 0.10	5.10 ± 0.60	5.30 ± 0.20	5.20 ± 0.20	5.40 ± 0.30	0.900
Final weight (g)		14.60 ± 1.40	12.40 ± 0.20	13.40 ± 0.50	13.20 ± 1.30	13.80 ± 1.80	13.20 ± 0.40	0.300
Specific growth rate (% day ⁻¹)*		0.74 ± 0.06	0.78 ± 0.09	0.79 ± 0.07	0.84 ± 0.08	0.71 ± 0.04	0.70 ± 0.01	0.600
Total weight gain (%)**		180.8	143.1	162.7	150.9	165.4	144.4	
Feed intake (% dry weight day ⁻¹)**		1.5	1.3	1.5	1.3	1.3	1.3	
Feed conversion efficiency		0.52 ± 0.07	0.45 ± 0.07	0.46 ± 0.06	0.49 ± 0.05	0.53 ± 0.01	0.50 ± 0.09	0.300
Survival (%)		96.70 ± 3.30	90.00 ± 5.80	97.80 ± 3.80	92.20 ± 5.10	93.30 ± 5.80	90.00 ± 5.80	0.300
Proteins (%)	79.3 ± 0.8	82.20 ± 4.00	75.20 ± 2.00	82.60 ± 1.20	76.30 ± 1.20	77.00 ± 5.60	79.20 ± 6.70	0.187
Lipids (%)	8.8 ± 2.2	8.20 ± 1.40	6.50 ± 2.40	7.40 ± 2.80	6.80 ± 1.90	6.00 ± 0.50	6.30 ± 1.60	0.724
Ash (%)	10.4 ± 0.9	10.10 ± 0.70	9.90 ± 0.50	10.20 ± 1.00	13.10 ± 5.80	9.50 ± 0.10	9.50 ± 0.80	0.369

* Standard error of the mean is given.

** Values are given as a general average without standard deviation.

observed in the initial sample. The amount of 20:5n-3 in the lipid content of the muscle tissue of fish fed all the diets containing vegetable oils decreased from the initial 8.9% to 3.94–5.29% (mean = 4.33%) despite the presence of dietary levels of 20:5n-3 ranging from 1.51% to 2.31%. The proportion of 20:5n-3 in the tissue lipid of fish fed the control diet was significantly higher than that found in the initial sample, presumably due to the comparatively higher level provided by the diet (8.5%). Proportional levels of 22:6n-3 in the diets containing vegetable oils ranged from 0.25% to 1.58%, while levels of 22:6n-3 in the tissue of fish fed these diets were similar to those found in the initial sample. At the termination of the experiment, the amount of 22:6n-3 in the tissue of fish fed the control diet was higher than that at the beginning of the experiment. The levels of 18:4n-3 in the muscle of fish fed each of the diets containing vegetable oils were significantly lower than the amount found in the initial fatty acid profile of the muscle tissue.

Net change (final–initial) in the total amount (μg) of fatty acid per organism was notably higher for 18:1n-9, 18:2n-6, and 18:3n-3 in fish fed diets containing oils with correspondingly high levels of these fatty acids (table 5). Fish fed diet L accumulated a total of $137.7 \mu\text{g org}^{-1}$ of 18:3n-3, whereas the tissue of juveniles fed diet O accumulated 215.2 and $163.6 \mu\text{g org}^{-1}$ of 18:1n-9 and 18:2n-6, respectively. Muscle tissue of juveniles fed diet C mainly accumulated 18:2n-6 ($241.4 \mu\text{g org}^{-1}$). For juveniles fed diet C/L, the fatty acids with highest accumulation in muscle tissue were 18:1n-9 and 18:2n-6 (108.8 and $244.9 \mu\text{g org}^{-1}$, respectively), whereas for the L/C diet, the fatty acid most accumulated was 18:2n-6 ($169.0 \mu\text{g org}^{-1}$). For the n-3 HUFAs, net increases in 22:6n-3 (0.4 to $40.3 \mu\text{g org}^{-1}$) occurred in muscle tissue of fish fed each of the diets containing vegetable oil. The lowest change corresponded to diet C/L. For fish fed the control diet containing 9.39% of 22:6n-3, there was a net increase of $169.5 \mu\text{g org}^{-1}$. Even though the level of 20:5n-3 was similar to that of 22:6n-3 in the diets containing vegetable oil (approximately 1–2%), the net change for this fatty acid was either only slightly higher or slightly negative. For arachidonic acid (20:4n-6), which was not detected in the diets containing vegetable oil, the net change in the fish was negative for diets L, C, C/L, and L/C, and there was only a slight increase (of $0.5 \mu\text{g org}^{-1}$) in fish fed diet O. For docosapentaenoic acid (22:5n-3), a fatty acid not detected in either the control or experimental diets, a negative net change occurred only for diet C/L ($-0.2 \mu\text{g org}^{-1}$), whereas positive changes of approximately 4 to $7 \mu\text{g org}^{-1}$ were observed for the other treatments; the net change in the control diet was $17.5 \mu\text{g org}^{-1}$.

DISCUSSION

Under the culture conditions of the 12-week experiment, there were no significant dietary-dependent effects on growth

ingesta diaria de alimento entre los tratamientos fue similar (0.013 a 0.015 g alimento por g de organismo), correspondiendo a 1.3% a 1.5% del peso corporal. La eficiencia de conversión alimenticia varió de 0.45 a 0.53, y no fue significativamente diferente entre tratamientos. Al final del experimento, la composición de macronutrientes del tejido muscular no difirió significativamente entre tratamientos (tabla 3).

La composición de ácidos grasos (g/100 g de lípido) en el músculo de los juveniles alimentados con las diferentes dietas se comparó con la composición inicial del experimento (tabla 4). En comparación con la dieta testigo, el tejido muscular de los ejemplares alimentados con las dietas L, O y C presentó proporciones significativamente mayores de 18:3n-3, 18:1n-9 y 18:2n-6, respectivamente, mientras que el de los juveniles alimentados con las dietas L/C y C/L tuvo concentraciones significativamente mayores tanto de 18:2n-6 como 18:3n-3. La cantidad de ácido araquidónico (20:4n-6) no difirió significativamente de la observada en la muestra inicial. La cantidad de 20:5n-3 en el contenido lipídico del tejido muscular de los ejemplares alimentados con todas las dietas conteniendo aceites vegetales disminuyó del porcentaje inicial (8.9%) a 3.94–5.29% (media = 4.33%) a pesar de la presencia de niveles de 20:5n-3 que oscilaron entre 1.51% y 2.31%. La proporción de 20:5n-3 en el tejido graso de los juveniles alimentados con la dieta testigo fue significativamente mayor que la encontrada en la muestra inicial, probablemente debido al nivel, comparativamente mayor, proporcionado por la dieta (8.5%). Los niveles de 22:6n-3 en las dietas formuladas con aceites vegetales variaron de 0.25% a 1.58%, mientras que los niveles de 22:6n-3 en el tejido de los ejemplares alimentados con estas dietas fueron similares a los observados en la muestra inicial. Al final del experimento, la cantidad de 22:6n-3 en el tejido de los juveniles alimentados con la dieta testigo fue mayor que al principio. Los niveles de 18:4n-3 en el músculo de los peces alimentados con las dietas conteniendo aceites vegetales fueron significativamente menores que la cantidad registrada en el perfil inicial de ácidos grasos del tejido muscular.

El cambio neto (final–inicial) en la cantidad (μg) de ácidos grasos por organismo fue notablemente mayor para 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 en los juveniles alimentados con las dietas formuladas con aceites que contienen niveles altos de estos ácidos grasos (tabla 5). Los ejemplares alimentados con la dieta L acumularon un total de $137.7 \mu\text{g org}^{-1}$ de 18:3n-3, mientras que los juveniles alimentados con la dieta O acumularon 215.2 y $163.6 \mu\text{g org}^{-1}$ de 18:1n-9 y 18:2n-6, respectivamente. El tejido muscular de los juveniles alimentados con la dieta C acumuló principalmente 18:2n-6 ($241.4 \mu\text{g org}^{-1}$). Los ácidos grasos con mayor acumulación en el tejido muscular de los juveniles alimentados con la dieta C/L fueron 18:1n-9 y 18:2n-6 (108.8 y $244.9 \mu\text{g org}^{-1}$, respectivamente), mientras que en el tratamiento L/C, fue 18:2n-6 ($169.0 \mu\text{g org}^{-1}$). En cuanto a los HUFAs n-3, se observaron incrementos netos de 22:6n-3 (0.4 a $40.3 \mu\text{g org}^{-1}$) en el

Table 4. Fatty acid composition (g/100 g of lipid) of California halibut (*Paralichthys californicus*) soft tissue obtained before and after the feeding period with the corresponding diet (see table 1). Values represent the mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$); nd = not detected; trace (tr) = $< 0.01 \text{ mg g}^{-1}$.**Tabla 4.** Composición de ácidos grasos (g/100 g de lípido) del tejido blando del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) antes y después del periodo de alimentación con la dieta correspondiente (ver tabla 1). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar ($n = 3$); nd = no detectado; traza (tr) = $< 0.01 \text{ mg g}^{-1}$.

Fatty acid	Diets							
	Start	Control	L	O	C	L/C	C/L	P
C14:0	9.5 $\pm$ 3.8 ^a	2.20 $\pm$ 1.11 ^b	2.71 $\pm$ 0.49 ^b	2.37 $\pm$ 0.48 ^b	2.43 $\pm$ 1.71 ^b	3.49 $\pm$ 0.49 ^b	1.66 $\pm$ 1.38 ^b	0.002
C16:0	22.0 $\pm$ 1.3	16.24 $\pm$ 4.67	12.85 $\pm$ 1.68	17.47 $\pm$ 4.10	12.65 $\pm$ 1.30	14.51 $\pm$ 3.54	16.52 $\pm$ 9.74	0.276
C16:1n-7	7.2 $\pm$ 1.5 ^a	3.58 $\pm$ 0.91 ^b	2.42 $\pm$ 0.44 ^b	2.47 $\pm$ 0.74 ^b	2.68 $\pm$ 1.62 ^b	2.30 $\pm$ 0.54 ^b	2.98 $\pm$ 1.53 ^b	
C16:3n-4	1.2 $\pm$ 0.5	0.57 $\pm$ 0.25	0.59 $\pm$ 0.00	0.82 $\pm$ 0.37	nd	nd	nd	0.340
C18:0	5.5 $\pm$ 0.1	6.54 $\pm$ 0.98	5.50 $\pm$ 1.09	4.88 $\pm$ 1.59	4.31 $\pm$ 1.27	6.48 $\pm$ 1.75	4.98 $\pm$ 1.47	0.343
C18:1n-9	13.0 $\pm$ 0.3 ^b	15.36 $\pm$ 1.26 ^b	18.15 $\pm$ 4.80 ^b	31.13 $\pm$ 8.49 ^a	18.62 $\pm$ 0.78 ^b	16.73 $\pm$ 0.44 ^b	22.61 $\pm$ 7.43 ^b	0.007
C18:1n-7	4.5 $\pm$ 0.5 ^a	3.27 $\pm$ 0.10 ^b	1.43 $\pm$ 0.16 ^c	1.37 $\pm$ 0.14 ^c	1.03 $\pm$ 0.36 ^c	1.76 $\pm$ 0.73 ^c	1.10 $\pm$ 0.56 ^c	0.001
C18:2n-6	4.3 $\pm$ 0.4 ^b	10.47 $\pm$ 0.28 ^a	16.08 $\pm$ 3.92 ^a	21.05 $\pm$ 9.14 ^a	32.67 $\pm$ 10.50 ^a	25.32 $\pm$ 7.21 ^a	36.75 $\pm$ 5.00 ^a	0.001
C18:3n-3	1.5 $\pm$ 0.4 ^c	2.02 $\pm$ 0.89 ^c	19.86 $\pm$ 0.16 ^a	3.44 $\pm$ 3.00 ^c	3.10 $\pm$ 0.96 ^c	11.64 $\pm$ 3.42 ^b	11.59 $\pm$ 2.64 ^b	0.001
C18:4n-3	1.3 $\pm$ 0.1 ^a	1.01 $\pm$ 0.34 ^{ab}	0.23 $\pm$ 0.40 ^b	0.16 $\pm$ 0.28 ^b	0.33 $\pm$ 0.29 ^b	0.33 $\pm$ 0.33 ^b	0.28 $\pm$ 0.27 ^b	0.008
C20:1n-9	1.4 $\pm$ 0.0 ^b	4.20 $\pm$ 0.92 ^a	0.92 $\pm$ 0.00 ^b	1.38 $\pm$ 0.08 ^b	1.14 $\pm$ 0.16 ^b	1.24 $\pm$ 0.65 ^b	0.98 $\pm$ 0.49 ^b	0.001
C20:2	0.6 $\pm$ 0.0 ^b	0.66 $\pm$ 0.08 ^b	1.15 $\pm$ 0.00 ^a	0.70 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.65 $\pm$ 0.31 ^a	tr	1.35 $\pm$ 0.34 ^a	0.011
C20:4n-6	1.8 $\pm$ 0.2	0.86 $\pm$ 0.70	0.96 $\pm$ 0.39	0.91 $\pm$ 0.54	0.85 $\pm$ 0.30	tr	0.70 $\pm$ 0.08	0.071
C20:4n-3	1.6 $\pm$ 0.5	2.33 $\pm$ 2.42	1.56 $\pm$ 0.60	tr	1.56 $\pm$ 1.50	tr	0.44 $\pm$ 0.01	0.630
C20:5n-3	8.9 $\pm$ 1.4 ^{ab}	10.16 $\pm$ 3.17 ^a	4.91 $\pm$ 1.54 ^{bc}	4.48 $\pm$ 1.69 ^{bc}	4.60 $\pm$ 0.68 ^{bc}	5.06 $\pm$ 1.94 ^{bc}	3.56 $\pm$ 0.95 ^c	0.003
C22:5n-3	2.0 $\pm$ 0.1	2.31 $\pm$ 0.82	1.68 $\pm$ 0.82	1.76 $\pm$ 0.86	1.74 $\pm$ 0.45	2.00 $\pm$ 0.64	1.13 $\pm$ 0.47	0.598
C22:6n-3	12.4 $\pm$ 5.6	19.69 $\pm$ 4.30	11.10 $\pm$ 6.02	8.09 $\pm$ 7.09	11.46 $\pm$ 4.69	11.39 $\pm$ 5.31	7.14 $\pm$ 4.08	0.193

Mean values in the same row with the different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

and survival of the Californian halibut; however, the potential use of dietary vegetable oils or their blends in formulated diets for early juveniles of this species needs further research based on changes that occurred in the fatty acid composition of the muscle tissue, particularly 20:5n-3 and 22:6n-3.

Despite the low levels of 22:6n-3 in the experimental diets relative to the control diet, fish tissue levels were generally similar to those at the start of the experiment. It appears that this fatty acid is preferentially conserved rather than metabolized. In contrast, the lack of increases or reductions in the levels of 20:5n-3, despite occurring in the diets containing vegetable oils, suggests that this HUFA is being utilized during the growth process and is not sufficiently replenished by the diet.

There were essentially no net changes in the content of 20:5n-3 in fish fed the diets containing vegetable oils during the course of the experiment; however, positive net changes in the content of 20:5n-3 and 22:6n-3 were observed in the organisms fed the control diet containing fish oil. The increases in 22:6n-3 in both the proportion of fatty acids and lipid (positive net change) in the muscle tissue of those fish fed the experimental diets suggest that 20:5n-3, both originally present in the tissue and derived from the diet, was most probably converted to 22:6n-3. Accordingly, the initial tissue levels of 20:5n-3 combined with a small dietary source was presumably sufficient to maintain comparative growth and survival among all the treatments for the duration of the experiment. The question remains as to when the 20:5n-3 content of the tissue would eventually decrease to a level whereby the same growth rates achieved by the HUFA-rich control diet could no longer be maintained. The general increase in 22:5n-3 in the absence of any dietary origin of this fatty acid is strong supporting evidence of the synthesis of 22:6n-3 from 20:5n-3, through elongation to 22:5n-3 (the intermediate product of synthesis) and then to 24:5n-3, followed by $\Delta 6$ desaturation and peroxisomal chain-shortening (Christensen *et al.* 1993).

The reduction of tissue levels of 20:5n-3 and 20:4n-6 in the presence of high levels of 18:3n-3 and 18:2n-6 derived from the diets containing vegetable oils suggests that, as with other marine fish, the elongation and desaturation of 18:3n-3 to 20:5n-3 and of 18:2n-6 to 20:4n-6 does not occur or is very limited. The biosynthetic inability to effectively convert 18:3n-3 to 20:5n-3, and the previously stated evidence of requirements for 20:5n-3, 22:6n-3, and possibly 20:4n-6, is characteristic of many marine fish, in particular marine flatfishes that are tertiary consumers in the food chain (Sargent *et al.* 2002). Lack of accumulation of 20:5n-3 and 20:4n-6 in the dietary presence of 18:3n-3 and 18:2n-6 and the apparent conservation of 22:6n-3 in the tissue suggest that 22:6n-3, 20:5n-3, and 20:4n-6 are essential fatty acids for California halibut, like other marine flatfishes (Tocher *et al.* 2008).

Assuming the essentiality of 20:5n-3 and 22:6n-3 for California halibut, there is an obvious need to evaluate the responses to an experimental diet that does not contain these

tejido muscular de los ejemplares expuestos a las dietas formuladas con aceites vegetales. La dieta C/L presentó el menor cambio. Para los peces alimentados con la dieta testigo que contenía 9.39% de 22:6n-3, se registró un incremento neto de $169.5 \mu\text{g org}^{-1}$. A pesar de que el nivel de 20:5n-3 fue similar al de 22:6n-3 en las dietas con aceites vegetales (aproximadamente 1% a 2%), el cambio neto de este ácido graso fue ya sea sólo ligeramente mayor o ligeramente negativo. Para el ácido araquidónico (20:4n-6), el cual no se detectó en las dietas experimentales, el cambio neto en los ejemplares fue negativo para las dietas L, C, C/L y L/C, y sólo se observó un ligero incremento (de $0.5 \mu\text{g org}^{-1}$) en los ejemplares alimentados con la dieta O. El ácido docosapentaenoico (22:5n-3), el cual no se detectó ni en las dietas experimentales ni en la dieta testigo, presentó un cambio neto negativo sólo en el tratamiento C/L ($-0.2 \mu\text{g org}^{-1}$), mientras que en los demás tratamientos se registraron cambios positivos de aproximadamente 4 a $7 \mu\text{g org}^{-1}$; el cambio neto para la dieta testigo fue de $17.5 \mu\text{g org}^{-1}$.

DISCUSIÓN

Bajo las condiciones de cultivo de este experimento con duración de 12 semanas, no se observaron efectos relacionados con la dieta sobre el crecimiento y la supervivencia del lenguado de California; sin embargo, el uso potencial de aceites vegetales o combinaciones de ellos en dietas formuladas para juveniles en etapa temprana de esta especie requiere de mayor investigación considerando los cambios observados en la composición de ácidos grasos del tejido muscular, especialmente de 20:5n-3 y 22:6n-3.

A pesar de los niveles bajos de 22:6n-3 en las dietas experimentales en relación con la dieta testigo, los niveles en el tejido muscular fueron, en general, similares a los registrados al inicio del experimento. Aparentemente este ácido graso es preferentemente conservado en vez de metabolizado. En contraste, la ausencia de incrementos o reducciones en los niveles de 20:5n-3, aunque se encuentra en las dietas con aceites vegetales, sugiere que este HUFA se utiliza durante el proceso de crecimiento y que la dieta no lo abastece con suficiencia.

Esencialmente no hubo cambios netos en el contenido de 20:5n-3 en los peces alimentados con las dietas formuladas con aceites vegetales a lo largo del experimento; sin embargo, se observaron cambios netos positivos en el contenido de 20:5n-3 y 22:6n-3 en los organismos alimentados con la dieta testigo formulada con aceite de pescado. Los incrementos en 22:6n-3, tanto en la proporción de ácidos grasos como de lípidos (cambio neto positivo), en el tejido muscular de los peces alimentados con las dietas experimentales sugieren que 20:5n-3, originalmente presente en el tejido y derivado de la dieta, probablemente fue convertido en 22:6n-3. Por ende, los niveles iniciales de 20:5n-3 en el tejido junto con una pequeña fuente dietética aparentemente resultó ser suficiente para mantener la supervivencia y el crecimiento comparativo entre todos los tratamientos a lo

fatty acids. A comparative evaluation of dietary oils would probably have led to a significant reduction in growth of juveniles fed the diets containing vegetable oils if the experiment had been conducted over a longer period of time.

In this study, a complete dietary replacement of fish oil by individual vegetable oils or a combination of them was initially evaluated to understand the effect on growth, survival, and fatty acid composition of *P. californicus* juveniles grown under normal culture conditions regarding water quality and temperature. Notably, a 60% replacement of fish oil with a blend of soybean, rapeseed, and southern hemisphere fish oil did not affect the growth and survival of salmon after a 10-week experimental period; however, HUFA profiles were influenced (Pratoomyot *et al.* 2008).

Bowden *et al.* (1996) stated that at comparatively lower temperatures, leukocytes isolated from the kidney of the rainbow trout were able to accumulate higher amounts of HUFAs than of saturated fatty acids. It would be interesting to determine if halibut grown at lower water temperatures employ a particular metabolic strategy in response to fatty acid profiles of available diets to address the need for HUFAs to sustain the fluidity of the cellular membranes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT, project CB60235). The first author acknowledges receipt of a CONACYT scholarship to complete his M.Sc. degree. The authors thank DSM for kindly supplying vitamins and minerals.

REFERENCES

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Vol. 1. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Bowden LA, Restall CJ, Rowley AF. 1996. The influence of environmental temperature on membrane fluidity, fatty acid composition and lipogenesis product generation in head kidney leukocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. B 115: 375–382.
- Christensen E, Woldseth B, Hagve TA, Poll-The BT, Wanders RJA, Sprecher H, Stokke O, Christophersen BO. 1993. Peroxisomal β -oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase. Scand. J. Clin. Lab. Inv. 215: 61–74.
- Conklin DE, Piedrahita RH, Merino GE, Muguet JB, Bush DE, Gisbert E, Rounds J, Cervantes-Trujano M. 2003. Development of California halibut, *Paralichthys californicus*, culture. Appl. Aquacult. 14: 143–154.
- Daniels H, Gallagher M. 2002. North American flounders In: Webster CD, Lim C (eds.), Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 121–130.
- Folch J, Lee M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 22: 477–509.
- largo del experimento. Persiste el interrogante sobre cuándo, eventualmente disminuiría el contenido de 20:5n-3 en el tejido a un nivel donde ya no sería posible mantener las mismas tasas de crecimiento que las alcanzadas con la dieta testigo rica en HUFAs. El aumento general en 22:5n-3 en ausencia de algún origen dietético de este ácido graso es fuerte evidencia de la síntesis de 22:6n-3 a partir de 20:5n-3, por elongación a 22:5n-3 (el producto intermedio de la síntesis) y luego a 24:5n-3, seguido por la desaturación de $\Delta 6$ y el acortamiento de la cadena peroxisomal (Christensen *et al.* 1993).
- La disminución de los niveles de 20:5n-3 y 20:4n-6 ante la presencia de niveles altos de 18:3n-3 y 18:2n-6 derivados de las dietas conteniendo aceites vegetales sugiere que, como en la mayoría de los peces, la elongación y desaturación de 18:3n-3 a 20:5n-3 y de 18:2n-6 a 20:4n-6 es muy baja o inexistente. La incapacidad biosintética de convertir efectivamente 18:3n-3 en 20:5n-3, aunado a la evidencia ya mencionada de los requerimientos para 20:5n-3, 22:6n-3 y posiblemente 20:4n-6, es una característica de varios peces marinos, y en particular de los peces planos que son consumidores terciarios en la cadena trófica (Sargent *et al.* 2002). La falta de acumulación de 20:5n-3 y 20:4n-6 ante la presencia de 18:3n-3 y 18:2n-6 y la aparente conservación de 22:6n-3 en el tejido sugieren que 22:6n-3, 20:5n-3 y 20:4n-6 son ácidos grasos esenciales para el lenguado de California, al igual que otros peces planos marinos (Tocher *et al.* 2008).
- Si se supone que 20:5n-3 y 22:6n-3 son esenciales para el lenguado de California, es evidente que habría que evaluar su respuesta a una dieta experimental que no contenga estos ácidos grasos. Una evaluación comparativa de aceites dietéticos probablemente hubiera resultado en una reducción significativa en el crecimiento de los juveniles alimentados con las dietas formuladas con aceites vegetales si el experimento se hubiese realizado durante un periodo de tiempo más largo.
- En este trabajo se realizó una primera evaluación de la sustitución total de aceite de pescado por aceites vegetales, individuales o combinados, para entender el efecto sobre el crecimiento, la supervivencia y la composición de ácidos grasos de juveniles de *P. californicus* expuestos a condiciones de cultivo normales en cuanto a calidad de agua y temperatura. En un experimento de 10 semanas con salmón, un reemplazo de 60% de aceite de pescado con una combinación de soja, nabina y aceite de pescado del hemisferio sur no afectó su crecimiento y supervivencia, pero sí resultaron afectados los perfiles de HUFAs (Pratoomyot *et al.* 2008).
- Bowden *et al.* (1996) mencionan que a temperaturas comparativamente menores, los leucocitos aislados del riñón de la trucha arcoiris acumularon mayores niveles de HUFAs que de ácidos grasos saturados. Sería interesante determinar si el lenguado, sometido a menores temperaturas de agua, emplearía una estrategia metabólica particular en respuesta a los perfiles de ácidos grasos de las dietas disponibles para atender la necesidad de HUFAs para sostener la fluidez de las membranas celulares.

- Galaviz M, Baron B, Lazo JP. 2008. Effect of different protein levels on growth, survival and utilization of nutrients in California halibut (*Paralichthys californicus*). IX International Symposium on Aquatic Nutrition, Ensenada, BC, Mexico, p. 34.
- Herzka SH, Conklin D, Piedrahita R, Fodrie J, Lazo JP. 2003. Current research efforts on California halibut focus on aquaculture practices and utilization of nursery habitat. *Bight Bull.* 7: 2–7.
- Lupash I, Kissil GW. 2005. Feed formulations based on energy and protein demands in white grouper (*Epinephelus aeneus*). *Aquaculture* 248: 83–95.
- Martins DA, Valente LMP, Lall SP. 2007. Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 263: 150–158.
- Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38: 514–515.
- Mourente G, Bell JG. 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrac* L.) over a long-term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 145: 389–399.
- Ng KW, Koh BC, Din BZ. 2006. Palm oil-laden spent bleaching clay as a substitute for marine fish oil in the diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquacult. Nutr.* 12: 459–468.
- Pratoomyot J, Bendiksen EÅ, Bell JG, Tocher DR. 2008. Comparison of effects of vegetable oils blended with southern hemisphere fish oil and decontaminated northern hemisphere fish oil on growth performance, composition and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 280: 170–178.
- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. 2002. The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds.), *Fish Nutrition*. 3rd ed. Academic Press, San Diego, pp. 181–257.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto CB60235). El primer autor agradece la beca otorgada por CONACYT para completar sus estudios de maestría. Agradecemos a DSM el suministro de vitaminas y minerales.

Traducido al español por Christine Harris.

- Schiano V, Laurenzano E, Brevetti G, De Maio JJ, Lanero S, Scopacasa F, Chiariello M. 2008. Omega-3 polyunsaturated fatty acid in peripheral arterial disease: Effect on lipid pattern, disease severity, inflammation profile, and endothelial function. *Clin. Nutr.* 27: 241–247.
- Tacon AGJ. 2003. Global trends in aquaculture and compound aquafeed production. In: Tacon AGJ (ed.), *International Aquafeed Directory and Buyers Guide 2003*. Turret RAI, Uxbridge, Middlesex, UK, pp. 8–23.
- Tocher DR. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11: 107–184.
- Tocher DR, Bendiksen EÅ, Campbell PJ, Bell JG. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280: 21–34.
- Van Horn L, McCoin M, Kris-Etherton PM, Burke F, Carson JAS, Champagne CM, Karmally W, Sikand G. 2008. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *J Am. Diet. Assoc.* 108: 287–331.
- Yusof HM, Miles EA, Carter P. 2008. Influence of very long-chain n-3 fatty acids on plasma markers of inflammation in middle-aged men. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 78: 219–228.

*Received August, 2009;
accepted March, 2010.*