

Effect of dietary cholesterol content on growth and its accumulation in liver and muscle tissues of juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*)

Efecto del contenido de colesterol en las dietas y su acumulación en hígado y músculo en juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*)

Fernando M Guerra-Olvera¹, María Teresa Viana^{2*}

¹ Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Carretera Transpeninsular Ensenada–Tijuana No. 3917, Fraccionamiento Playitas, CP 22860 Ensenada, Baja California, México

² Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Carretera Transpeninsular Ensenada–Tijuana No. 3917, Fraccionamiento Playitas, CP 22860 Ensenada, Baja California, México

* Corresponding author. E-mail: viana@uabc.edu.mx

ABSTRACT. A feed trial conducted with juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) was designed to address the effect of dietary cholesterol content on growth performance and the cholesterol concentration in liver and muscle. For 60 days fish were fed four diets based on defatted fish meal, soy protein concentrate, cholesterol-free fish oil, canola oil, and olive oil, with four different concentrations of cholesterol (treatments *Ch0.0*, *Ch0.05*, *Ch0.12*, and *Ch0.19* containing 530, 2880, 4120, and 6170 mg kg⁻¹ of crude fat, respectively). After 60 days, maximum weight gain was obtained with diet *Ch0.05*, and it was significantly higher than that obtained with diets *Ch0.0* and *Ch0.19*, but not different from that obtained with *Ch0.12*. Cholesterol concentration in liver and muscle tissues was not affected by the diet, showing no significant differences among dietary treatments with levels reported as normal. Though cholesterol biosynthesis could not be measured in the present work, we discuss the possibility that fish are able to synthesize cholesterol when fed diets containing no or less cholesterol than required, but at the expense of energy consumption, limiting fish growth. We conclude that cholesterol content in aquafeeds affects fish growth when diets are formulated with vegetable ingredients, and the optimal content should be between 2880 and 4120 mg kg⁻¹ of crude fat to avoid consequent cholesterol accumulation in liver or muscle tissues.

Key words: yellowtail kingfish, cholesterol, growth performance, nutrient requirements.

RESUMEN. Un ensayo de alimentación realizado con juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) fue diseñado para evaluar el efecto de distintas concentraciones de colesterol en la dieta sobre el crecimiento de los peces y la acumulación de colesterol en hígado y músculo. Los juveniles de jurel de Castilla fueron alimentados durante 60 días con cuatro dietas que contenían cuatro niveles de colesterol (tratamientos *Ch0.0*, *Ch0.05*, *Ch0.12* y *Ch0.19* con 530, 2880, 4120 y 6170 mg kg⁻¹ de grasa cruda, respectivamente). Las dietas se elaboraron con harina de pescado desgrasada, concentrado de proteína de soya, aceite de pescado sin colesterol, aceite de canola y aceite de oliva. Después de 60 días, el máximo aumento de peso se registró para los peces alimentados con la dieta *Ch0.05*, y fue significativamente mayor que el peso obtenido con las dietas *Ch0.0* y *Ch0.19*, pero no diferente del obtenido con *Ch0.12*. La concentración de colesterol en los tejidos de hígado y músculo no se vio afectada por la dieta, puesto que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con niveles reportados como normal. A pesar de no haber sido posible registrar cuantitativamente la biosíntesis del colesterol en el presente trabajo, se discute la posibilidad de que los peces son capaces de sintetizar el colesterol cuando su alimento lo carece o tiene niveles bajos, pero a expensas del consumo de energía, lo cual limita el crecimiento de los peces. Se concluye que el contenido de colesterol en los alimentos acuícolas formulados con ingredientes vegetales afecta el crecimiento de los peces, que el contenido óptimo es de 2880 a 4120 mg kg⁻¹ de grasa cruda y que no tiene ningún efecto sobre la concentración de colesterol en el hígado o en los tejidos musculares.

Palabras clave: jurel de Castilla, colesterol, crecimiento, requerimientos nutricionales.

INTRODUCTION

The yellowtail kingfish (YTK), *Seriola lalandi*, is a carnivorous marine species with high energy requirements (Pirozzi and Booth 2009). Due to its rapid growth (Moran *et al.* 2009) it is cultured worldwide, mainly in net cages in the sea (Fernandes and Tanner 2008), and there is increasing interest in farming them in recirculating aquatic systems (Abbink *et al.* 2011). Synthetic seawater has also been used

INTRODUCCIÓN

El jurel de Castilla, *Seriola lalandi*, es una especie marina carnívora con altos requerimientos energéticos (Pirozzi y Booth 2009). Debido a su crecimiento rápido (Moran *et al.* 2009), se cultiva en todo el mundo, principalmente en jaulas de red dentro del mar (Fernandes y Tanner 2008), y existe un creciente interés en su cultivo en sistemas de recirculación de agua (Abbink *et al.* 2011). También se ha empleado agua de

for YTK culture (Orellana *et al.* 2013). The YTK commercial pellets are based on a high energy content ranging from 52% crude protein (CP) and 20% crude fat (CF) to 55% CP and 16% CF (Orellana *et al.* 2013). As with most diets for cultured fish species, efforts are being made to replace fish-derived ingredients such as fish oil and fish meal with poultry oil, canola oil, and soybean meal (Bowyer *et al.* 2012, 2013), among others. The need to reduce fish oil and fish meal is well known, and it has been a central point of research in fish nutrition for more than a decade (Tacon and Metian 2009, Hardy 2010).

Most research on the substitution of fish oil by vegetable oils has focused on the eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) requirements (Turchini *et al.* 2009, Nasopoulou and Zabetakis 2012), but not enough attention has been paid to cholesterol content. Fish oil is rich in cholesterol, with concentrations ranging from 5210 mg kg⁻¹ in menhaden oil to 7660 g kg⁻¹ in herring oil, whereas in vegetable oils phytosterols are present (Abidi 2001, Moreau *et al.* 2002), and cholesterol is not (Turchini *et al.* 2009). Thus, when fish oil is replaced by vegetable oil, meeting the essential fatty acid requirements is a concern, but supplying a minimum level of cholesterol is not, resulting in a cholesterol reduction in the aquafeeds without knowing the real effects of its deprivation.

Although fish can synthesize cholesterol (Deng *et al.* 2010) there is no concrete evidence of how much cholesterol or how efficiently the cholesterol can be synthesized nor of sterol metabolism in fish. Since cholesterol is being synthesized in fish, it is not considered an essential nutrient; however, fish like European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Kaushik *et al.* 2004), gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Sitjà-Bobadilla *et al.* 2005), and Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Hansen *et al.* 2007) have shown signs of hypocholesterolemia when fish meal is reduced in their feeds and replaced by vegetable meals. Likewise, fish oil substitution by vegetable oil has induced the same effect in *D. labrax* (Richard *et al.* 2006), Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Jordal *et al.* 2007), and YTK (Bowyer *et al.* 2012). On the other hand, when taurine is supplemented in aquafeeds for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) the hypocholesterolemic effect is reduced (Maita *et al.* 2006).

In several marine fish species, taurine has been declared essential due to its low synthesis rate in the animals (Takagi *et al.* 2008), including YTK (Jirsa *et al.* 2014). In juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*), the dietary addition of both taurine and cholesterol resulted in maximum growth as compared with those animals fed diets containing only taurine or cholesterol or neither of them. In this respect, Yun *et al.* (2012) proposed a synergic interaction between cholesterol and taurine. The lack of cholesterol has also been found to decrease the immunologic capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Deng *et al.* 2013). Cholesterol and taurine supplementation also improved the resistance to bacterial infection of juvenile *Seriola quinqueradiata*

mar sintética en el cultivo de esta especie (Orellana *et al.* 2013). El alimento comercial para el jurel de Castilla se basa en un contenido energético alto que varía de 52% de proteína cruda y 20% de grasa cruda a 55% y 16%, respectivamente (Orellana *et al.* 2013). Al igual que con la mayoría de las dietas para peces cultivados, se realizan esfuerzos para sustituir los ingredientes derivados de peces, como el aceite y la harina de pescado, por aceite de aves de corral, aceite de canola y harina de soya (Bowyer *et al.* 2012, 2013), entre otros. La necesidad de reducir el aceite y la harina de pescado es bien conocida, y ha sido un punto central de la investigación en nutrición de peces durante más de una década (Tacon y Metian 2009, Hardy 2010).

La mayoría de las investigaciones sobre la sustitución de aceite de pescado por aceites de origen vegetal se han enfocado en los requerimientos de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico (Turchini *et al.* 2009, Nasopoulou y Zabetakis 2012) y no se ha puesto suficiente atención en el contenido de colesterol. El aceite de pescado es rico en colesterol, con concentraciones que varían de 5210 mg kg⁻¹ de aceite de sáballo a 7660 g kg⁻¹ de aceite de arenque, mientras que los aceites vegetales contienen fitoesteroles (Abidi 2001, Moreau *et al.* 2002) pero no colesterol (Turchini *et al.* 2009). Así, cuando se sustituye el aceite de pescado por aceites vegetales se presta especial atención en cubrir los requerimientos de ácidos grasos esenciales pero no en proporcionar un nivel mínimo de colesterol, lo que ocasiona una reducción del colesterol en el alimento sin conocer los efectos verdaderos de su carencia.

A pesar de que los peces son capaces de sintetizar colesterol (Deng *et al.* 2010), no existe evidencia concreta de cuánto colesterol y que tan eficientemente se sintetiza ni del metabolismo de esteroides en peces. Puesto que el colesterol es sintetizado en peces, no se considera un nutriente esencial; sin embargo, peces como la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Kaushik *et al.* 2004), la dorada (*Sparus aurata*) (Sitjà-Bobadilla *et al.* 2005) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (Hansen *et al.* 2007) han mostrado señales de hipercolesterolemia cuando se reduce la cantidad de harina de pescado en su alimento y se sustituye por harinas de origen vegetal. La sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales también ha provocado el mismo efecto en *D. labrax* (Richard *et al.* 2006), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Jordal *et al.* 2007) y el jurel de Castilla (Bowyer *et al.* 2012). Por otra parte, la sustitución de taurina en el alimento para el jurel japonés (*Seriola quinqueradiata*) redujo el efecto de la hipercolesterolemia (Maita *et al.* 2006).

La taurina se considera un nutriente esencial debido a su baja tasa de síntesis en individuos de varias especies de peces marinos (Takagi *et al.* 2008), incluyendo el jurel de Castilla (Jirsa *et al.* 2014). Juveniles de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) alimentados con dietas que contenían tanto taurina como colesterol presentaron mayor crecimiento que los individuos alimentados con dietas que contenían sólo taurina o

artificially infected by *Lactococcus garvieae* (Maita *et al.* 2006).

Therefore, the aim of this study was to address the effect of four different cholesterol concentrations in aquafeeds on the growth performance of juvenile YTK, as well as the accumulation of cholesterol in the muscle and liver tissues.

MATERIALS AND METHODS

Dietary treatments

Four diets were formulated to contain a similar proximate composition (table 1), consisting of 45% CP, provided by a mixture of soy protein concentrate and defatted fish meal. The CF concentration was 21%, and consisted of canola oil, olive oil, and cholesterol-free fish oil. Cholesterol (C8503, 92.5%, Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA) was added to the diets by its dissolution into the oil mixtures as follows: diet *Ch0.0*, no cholesterol was added; diet *Ch0.05*, 5.8023 g for each 10 kg of feed; diet *Ch0.12*, 12.5874 g; and diet *Ch0.19*, 19.3988 g. The identified sterols are shown in figure 1. Starch and gelatin were cooked separately and added to the ingredients, and mechanically blended to produce a homogeneous mixture with 60% moisture content. The resulting mixture in the form of dough was then cold-pressed through a meat grinder into 4.0-mm diameter pellets, from which pieces were cut and then dried at 65 °C for 24 h. The feed was then stored at -30 °C until the day used for feeding.

The fish meal used in the diets was cold defatted using hexane as the carrier solvent. Batches of 5 kg of fish meal were soaked in 10 L of technical grade hexane (1:2 fish meal:hexane, w:v) for 24 h in 20-L buckets using a cheese cloth to retain the fish meal. After 24 h the fish meal was drained by hanging the cheese cloth and wrung by hand to release the excess of hexane. The fish meal was returned to the buckets and 5 L of hexane was added to the already washed batch and soaked for an additional 24 h to repeat the washing cycle. The fish meal batches were given a third wash with an additional 5 L of hexane, for a total of 20 L of hexane used for each 5 kg of fish meal. After the final wash cycle the fish meal was transferred to plastic trays and dried at ambient temperature using an extraction hood to assure the complete evaporation of the solvent residues.

The cholesterol from fish oil was removed taking advantage of its affinity for phospholipids. Granular soy lecithin was used as the source of phospholipids. Lecithin paste was prepared by mixing granular soy lecithin and distilled water (1:1 w:v). Batches of 900 g of fish oil were mixed with 90 g of lecithin paste in a food processor (3/4 HP motor). The resulting mixture was poured into Falcon tubes and centrifuged at 4 rcf for 10 min, favoring the precipitation of the cholesterol-enriched lecithin paste. The fish oil was poured back into the food processor and the process was repeated for two more extraction cycles always using fresh lecithin paste.

colesterol o ninguno de los dos. Yun *et al.* (2012) propusieron una interacción sinérgica entre el colesterol y la taurina. Se ha observado que la falta de colesterol disminuye la capacidad inmunológica de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Deng *et al.* 2013). Asimismo, la adición de colesterol y taurina mejoró la resistencia a infección bacteriana de juveniles de *Seriola quinqueradiata* infectados artificialmente con *Lactococcus garvieae* (Maita *et al.* 2006).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro distintas concentraciones de colesterol en la dieta sobre el crecimiento de juveniles de jurel de Castilla, así como la acumulación de colesterol en el tejido hepático y muscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Dietas experimentales

Se formularon cuatro dietas con una composición proximal similar (tabla 1). La concentración de proteína cruda, obtenida de una mezcla de concentrado de proteína de soya y harina de pescado desgrasada, fue de 45%. La concentración de grasa cruda fue de 21%, y consistió de aceite de canola, aceite de oliva y aceite de pescado sin colesterol. Se adicionó colesterol (C8503, 92.5%, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) a las dietas mediante su disolución en las mezclas de aceite de la siguiente manera: dieta *Ch0.0*, no se adicionó colesterol; dieta *Ch0.05*, 5.8023 g por cada 10 kg de alimento; dieta *Ch0.12*, 12.5874 g; y dieta *Ch0.19*, 19.3988 g. Los esteroides identificados se muestran en la figura 1. El almidón y la gelatina se prepararon por separado y se añadieron a los ingredientes, los cuales fueron mezclados mecánicamente hasta obtener una pasta homogénea con un contenido de humedad de 60%. La pasta se pasó en frío por un triturador de carne para obtener pelotillas de 4.0 mm de diámetro, de los cuales se cortaron piezas que se secaron a 65 °C durante 24 h. El alimento se almacenó a -30 °C hasta su uso.

La harina de pescado se desengrasó en frío con hexano como disolvente. Se enjuagaron tandas de 5 kg de harina de pescado en 10 L de hexano de grado técnico (1:2 harina de pescado:hexano, p:v) durante 24 h en cubetas de 20 L usando una tela de muselina para retener la harina de pescado. Después de 24 h la tela se colgó y se exprimió a mano para soltar el exceso de hexano. Se repitió el ciclo de lavado, regresando la harina de pescado a la cubeta, añadiendo 5 L de hexano a la tanda ya lavada y dejando reposar otras 24 h. Las tandas de harina de pescado se lavaron una tercera vez usando 5 L de hexano. Se usó un total de 20 L de hexano por cada 5 kg de harina de pescado. Después del último lavado, la harina de pescado se transfirió a bandejas de plástico y se dejó secar a temperatura ambiente usando una campana de extracción para asegurar la evaporación total de los residuos del solvente.

Table 1. Ingredients and proximate composition on a dry weight basis of four experimental diets containing different concentrations of cholesterol. The four diets were fed to juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) for 60 days.

Tabla 1. Ingredientes y composición proximal en base seca de cuatro dietas experimentales con diferentes concentraciones de colesterol. Se ofrecieron las cuatro dietas a juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) durante 60 días.

	Experimental treatment			
	Ch0.0	Ch0.05	Ch0.12	Ch0.19
Ingredients (g per 100 g)				
Soy protein concentrate	19	19	19	19
Defatted fish meal	40	40	40	40
Olive oil	4	4	4	4
Canola oil	9	9	9	9
Fish oil (cholesterol free)	7	7	7	7
Corn starch	12.9	12.84	12.78	12.71
Gelatin	4	4	4	4
Rovimix for carnivorous fish ^a	3.0	3.0	3.0	3.0
Stay C ^a	0.25	0.25	0.25	0.25
Taurine	0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium benzoate	0.25	0.25	0.25	0.25
Choline chloride	0.09	0.09	0.09	0.09
Alpha-tocopherol	0.01	0.01	0.01	0.01
Cholesterol	0	0.0580	0.1258	0.1939
Total	100	100	100	100
Proximate composition (% of dry matter)				
Humidity	1.82	1.82	1.85	1.76
Crude protein	45.89	45.25	45.25	45.74
Crude fat	21.05	21.31	20.49	20.93
Ash	10.63	10.76	11.04	11.47
NFE ^b	26.43	26.68	27.22	25.86
Cholesterol (mg kg ⁻¹ of crude fat)	530	2880	4120	6170
Soy protein concentrate	19	19	19	19
Defatted fish meal	40	40	40	40

^a Rovimix[®] and Stay C[®] kindly donated by DSM, Guadalajara, Mexico.

^b Nitrogen free extract, calculated by difference: NFE = 100 (– crude protein – crude fat – ash).

The cholesterol-enriched lecithin paste was discarded after each centrifugation.

Experimental design

A total of 84 juvenile YTK (125.0 ± 0.2 g) obtained from a commercial farm (Baja Seas, SA de CV, Ensenada, BC, Mexico) were randomly distributed in twelve 500-L tanks (seven fish per tank) connected to a biofilter under a recirculation system with 5% water renewal every day. Water was maintained at 21.0 ± 1.0 °C by heating the water in a reservoir after filtration through the biofilter. The fish were hand-fed until apparent satiation four times a day (8:00, 11:00, 14:00 and 17:00 h) during 60 days. All treatments were

Su afinidad por los fosfolípidos permitió extraer el colesterol del aceite de pescado, usando lecitina de soya granular como fuente de fosfolípidos. Se preparó una pasta de lecitina mezclando lecitina de soya granular y agua destilada (1:1 p:v). Se mezclaron tandas de 900 g de aceite de pescado con 90 g de la pasta de lecitina en un procesador de alimentos (motor de 3/4 HP). La mezcla fue vertida en tubos de Falcon y centrifugada a 4 fcr durante 10 min, favoreciendo la precipitación de la pasta de lecitina enriquecida con colesterol. Se volvió a colocar el aceite de pescado en el procesador de alimentos y se repitió el proceso durante otros dos ciclos de extracción, siempre usando una nueva pasta de lecitina. Después de cada centrifugación se descartó la pasta de lecitina enriquecida con colesterol.

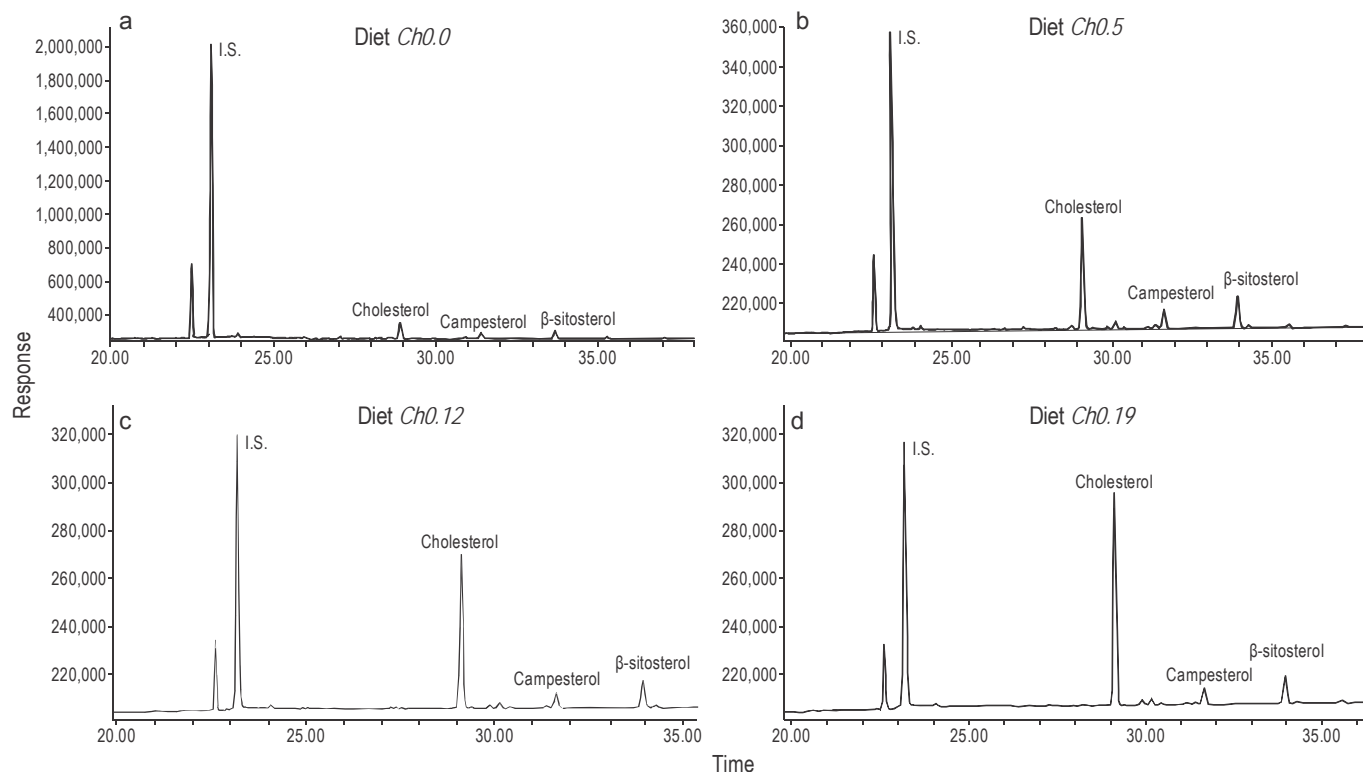


Figure 1. Sterols identified in the experimental diets formulated to contain four cholesterol levels (diets *Ch0.0*, *Ch0.05*, *Ch0.12*, and *Ch0.19* containing 530, 2880, 4120, and 6170 mg kg⁻¹ of crude fat, respectively). I.S. = internal standard (5 α -cholestane).

Figura 1. Esteroles identificados en las dietas experimentales elaboradas con cuatro niveles de concentración de colesterol (dietas *Ch0.0*, *Ch0.05*, *Ch0.12* y *Ch0.19* con 530, 2880, 4120 y 6170 mg kg⁻¹ de grasa cruda, respectivamente). I.S. = estándar interno (5 α -colestano).

performed in triplicate. At the end of the experimental period, fish were fasted for 24 h prior to sacrifice by immersion in ice-cold water (hypothermia) in 200-L plastic tanks in accordance with our institution's health and safety policy. Liver and muscle tissue were obtained from five random fish per tank. Samples were individually frozen at -30°C until further analysis. The following indices were calculated to evaluate growth performance:

$$\text{Weight gain (\%)} = [(\text{final body weight} - \text{initial body weight}) \times 100 / (\text{initial body weight})] \quad (1)$$

$$\text{Thermal growth coefficient} = [(\text{final body weight}^{1/3} - \text{initial body weight}^{1/3}) / (T (^{\circ}\text{C}) \times t (\text{days}))] \times 1000 \quad (2)$$

A quadratic regression model was applied to growth data to estimate a preliminary cholesterol requirement for the basal diet presented. The requirement was estimated as $I_{\text{max}} \times 95\%$.

$$R = a + bI + cI^2 \quad (3)$$

$$I_{\text{max}} = -0.5 \times (b/c) \quad (4)$$

where R is the final body weight (g) and I is the cholesterol concentration (mg kg⁻¹ of CF).

Diseño experimental

Un total de 84 juveniles de *S. lalandi* (125.0 ± 0.2 g), proporcionados por una granja comercial (Baja Seas, SA de CV, Ensenada, BC, México), fueron distribuidos aleatoriamente en 12 tanques de 500 L (siete individuos por tanque) conectados a un biofiltro en un sistema de recirculación de agua, con un recambio de agua diario de 5%. La temperatura del agua se mantuvo a $21.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ calentando el agua en un depósito después de pasar por el biofiltro. Los peces fueron alimentados a mano hasta saciedad aparente cuatro veces al día (8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 h) durante 60 días. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Al final del periodo experimental, los peces se mantuvieron en inanición durante 24 h antes de ser sacrificados mediante inmersión en agua helada (hipotermia) en tanques de plástico de 200 L de acuerdo con la política de seguridad y salud de nuestra institución. Se obtuvieron muestras de tejido hepático y muscular de cinco peces seleccionados al azar de cada tanque. Las muestras se congelaron individualmente a -30°C hasta su análisis. Se calcularon los siguientes índices para evaluar el crecimiento:

$$\text{Ganancia de peso (\%)} = [(\text{peso corporal final} - \text{peso corp. inicial}) \times 100 / (\text{Peso corp. inicial})] \quad (1)$$

Proximate analysis

The proximate composition of diets was measured (in triplicate) and expressed on a dry matter basis according to standard procedures (AOAC 1990). The moisture content of each diet was calculated from samples (2 g) dried to constant weight at 60 °C. Total nitrogen content was determined by the micro-Kjeldahl method, and percent CP was then calculated as % N \times 6.25. Total fat concentration was determined by Soxhlet extraction with petroleum ether as a solvent and the CF was calculated gravimetrically. Ash content was determined by heating samples to 550 °C for 6 h. Nitrogen-free extract was calculated by difference:

$$\% \text{ NFE} = 100 - (\% \text{ CP} + \% \text{ CF} + \% \text{ ash}) \quad (5)$$

Lipid extraction

Sterols were extracted from liver and muscle samples according to the AOAC (1990) methods. Tissue samples were dried at 100 °C for 24 h and ground with a hand mortar. Fat sterols were extracted following a modified Bligh and Dyer (1959) method, substituting chloroform with dichloromethane. An aliquot of 5 α -cholestane dissolved in methanol was added to the samples as an internal standard prior to lipid extraction. Total lipid extracts were saponified with 1 mL of 1.0 N potassium hydroxide (90% ethanol, 10% distilled water) at 70 °C for 30 min in capped glass vials. After cooling to ambient temperature, 1 mL of distilled water was added and the non-saponifiable fraction was extracted with 400 μ L of hexane, a procedure that was repeated three times. Hexane was evaporated under nitrogen atmosphere and the dried samples were silylated with HTP (hexamethyldisilazane:trimethylchlorosilane:pyridine, 2:1:5, v:v:v); 700 μ L of HTP were added to each sample, and incubated at ambient temperature for 15 min in a nitrogen atmosphere. Residual pyridine was evaporated under nitrogen flow and the samples were diluted in hexane for gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) analysis.

Gas chromatography analysis

Gas chromatography was performed with an Agilent Technologies 6850 Network GC System (flame ionization detector) and an Agilent Technologies HP-1 capillary column (100% dimethylpolysiloxane, 30 m, 0.320 mm internal diameter, 0.25 μ m film thickness). The oven temperature conditions were as follows: initial 150 °C, held 3 min; initial 150 °C, held 3 min; raised to 200 °C at a rate of 25 °C min⁻¹; to 280 °C at 5 °C min⁻¹; and to 295 °C at 1 °C min⁻¹. Hydrogen was used as carrier gas at an initial pressure of 20 psi, held 2 min, and 40 psi for the rest of the run. The injector was set at 280 °C and the flame ionization detector was set at a temperature of 330 °C, with a flow of 45 mL min⁻¹ for hydrogen and 450 mL min⁻¹ for air; 20 mL min⁻¹ for

$$\text{Coeficiente de crecimiento térmico} = [(\text{peso corp. final}^{1/3} - \text{peso corp. inicial}^{1/3}) / (T \text{ (}^\circ\text{C)} \times t \text{ (días))}] \times 1000 \quad (2)$$

Se aplicó un modelo de regresión cuadrática a los datos de crecimiento para estimar un requerimiento de colesterol preliminar para la dieta basal. El requerimiento se estimó como $I_{max} \times 95\%$:

$$R = a + bI + cI^2 \quad (3)$$

$$I_{max} = -0.5 \times (b/c) \quad (4)$$

donde R es el peso corporal final (g) e I la concentración de colesterol (mg kg⁻¹ de grasa cruda).

Análisis proximal

La composición proximal de las dietas se midió (en triplicado) y se expresó en base seca siguiendo procedimientos estándar (AOAC 1990). Para calcular el contenido de humedad de cada dieta se secaron muestras (2 g) a 60 °C hasta obtener peso constante. El contenido de nitrógeno total se determinó mediante el método micro Kjeldahl, y el porcentaje de proteína cruda se calculó como % N \times 6.25. La concentración total de grasa se determinó mediante extracción por Soxhlet con éter de petróleo como solvente y la grasa cruda se calculó gravimétricamente. El contenido de cenizas se determinó calentando las muestras hasta 550 °C durante 6 h. El extracto libre de nitrógeno se calculó por diferencia:

$$\% \text{ extracto libre de N} = 100 - (\% \text{ proteína cruda} + \% \text{ grasa cruda} + \% \text{ cenizas}) \quad (5)$$

Extracción de lípidos

Se extrajeron esteroides del tejido hepático y muscular siguiendo los métodos de la AOAC (1990). Las muestras se secaron a 100 °C durante 24 h y se molieron manualmente en un mortero. Los esteroides se extrajeron con un método modificado de Bligh y Dyer (1959), sustituyendo cloroformo por diclorometano. Antes de la extracción de lípidos, se añadió una alícuota de 5 α -colestano disuelto en metanol a las muestras como un estándar interno. Los extractos de lípidos totales se saponificaron con 1 mL de hidróxido de potasio 1.0 N (90% etanol, 10% agua destilada) a 70 °C durante 30 min en frascos de vidrio con tapa. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de agua destilada y se extrajo la fracción no saponificada con 400 μ L de hexano; este procedimiento se repitió tres veces. El hexano se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno y las muestras secas se sililaron con HTP (hexametilidisilazano:trimetilclorosilano:piridina, 2:1:5, v:v:v). Se añadió 700 μ L de HTP a cada muestra y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en atmósfera de nitrógeno. Se evaporó la piridina residual bajo flujo de nitrógeno y las muestras se diluyeron

column + makeup gas. The injection volume was 1 μL and the samples were manually injected in splitless mode. To identify the sterol content in tissues, five random samples were injected under similar conditions into a gas chromatograph mass spectrometer (GC-MS, Agilent Technologies 7890A GC System) with a DB-5 capillary column (5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane, 30 m, 0.250 mm internal diameter, 0.25 μm film thickness) using the selective ion monitoring (SIM) method. The ions monitored were the ones reported by Ahmida *et al.* (2006).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the software package SigmaPlot (v12.3). Weight gain (WG), final body weight, thermal growth coefficient (TGC) and sterol concentration in tissues were subjected to a one-way analysis of variance. When needed, a Tukey test was applied to address the differences among groups.

RESULTS

After 60 days of the feeding trial, no significant differences were found among groups regarding fish survival rate, although only groups *Ch0.05* and *Ch0.12* achieved 100% survival (table 2). The maximum growth was obtained with the *Ch0.05* treatment. The WG of fish fed *Ch0.05* was the highest with 186.2 ± 8.8 g (mean \pm SD), and it was significantly ($P < 0.05$) different from *Ch0.0* (145.3 ± 16.7 g) and *Ch0.19* (142.1 ± 16.5 g), but not from *Ch0.12* (162.8 ± 6.9 g). Final body weight followed the same pattern, with *Ch0.05* presenting the highest mean value (311.4 ± 9.4 g), which was significantly ($P < 0.05$) different from *Ch0.0* (270.3 ± 15.5 g) and *Ch0.19* (267.0 ± 16.4 g), but not from *Ch0.12* (287.6 ± 6.4 g).

The TGC was significantly ($P < 0.05$) higher for *Ch0.05*, with a value of 1.41 ± 0.05 (mean \pm SD), which was different from *Ch0.0* and *Ch0.19*, but not from *Ch0.12*. No statistical differences were found among the other treatments, with TGC values of 1.16 ± 0.11 for *Ch0.0*, 1.27 ± 0.05 for *Ch0.12*, and 1.14 ± 0.11 for *Ch0.19*. The *I_{max}* value calculated with the quadratic regression for the cholesterol concentration (fig. 2) was 3179 mg kg^{-1} of CF. Considering 95% of such value, the estimated requirement should be 3020 mg kg^{-1} of CF.

Total cholesterol in the liver and muscle samples showed no significant variations among treatments (table 2). Nevertheless, the cholesterol content in muscle tissue was noticeably lower in *Ch0.19*. The cholesterol precursors, lathosterol and desmosterol, were not detected in the liver samples (fig. 3), or in the muscle tissue of any of the tissues analyzed by GC-MS. The phyosterols campesterol and β -sitosterol were detected by the GS-MS SIM method in the liver samples from all treatments even when the peaks were not clearly visible at plain sight (fig. 3); such sterols, even when detected

en hexano para el análisis por cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

Cromatografía de gases

Para la cromatografía de gases se usó un sistema con detector de ionización de llama (Agilent Technologies 6850 Network GC System) y una columna capilar (Agilent Technologies HP-1; 100% dimetilpolisiloxano, 30 m de largo, 0.320 mm de diámetro interno, 0.25 μm de espesor de película). Las condiciones de la temperatura del horno fueron: temperatura inicial de 150 $^{\circ}\text{C}$, mantenida por 3 min; elevación hasta 200 $^{\circ}\text{C}$ a una tasa de 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$; hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ a 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$; y hasta 295 $^{\circ}\text{C}$ a 1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Se usó hidrógeno como gas portador a una presión inicial de 20 psi durante 2 min y 40 psi durante el resto del ciclo. La temperatura del inyector fue de 280 $^{\circ}\text{C}$ y la del detector de ionización de llama, 330 $^{\circ}\text{C}$. El flujo de hidrógeno fue de 45 mL min^{-1} y el de aire, 450 mL min^{-1} ; 20 mL min^{-1} para la columna + gas de relleno. El volumen de inyección fue de 1 μL y las muestras se inyectaron manualmente en modo *splitless* (i.e., sin fraccionamiento). Para identificar el contenido de esteroides en los tejidos, se inyectaron cinco muestras aleatorias, en condiciones similares, en un sistema de espectrometría de masas para cromatografía de gases (Agilent Technologies 7890A GC System) con una columna capilar DB-5 (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m de largo, 0.250 mm de diámetro interno, 0.25 μm de espesor de película). Se usó el método de monitoreo selectivo de iones, y los iones monitoreados fueron los mencionados por Ahmida *et al.* (2006).

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con SigmaPlot (v12.3). Se realizó un análisis de varianza de una vía de la ganancia de peso, el peso corporal final, el coeficiente de crecimiento térmico y la concentración de esteroides en los tejidos. En caso de ser necesario, se aplicó la prueba de Tukey para evaluar las diferencias entre grupos.

RESULTADOS

Después de 60 días del ensayo de alimentación, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la tasa de supervivencia, aunque sólo los peces alimentados con *Ch0.05* y *Ch0.12* alcanzaron el 100% de supervivencia (tabla 2). Se alcanzó el máximo crecimiento en el tratamiento *Ch0.05*. La ganancia de peso fue mayor (186.2 ± 8.8 g, media \pm DE) en el tratamiento *Ch0.05*, y difirió significativamente ($P < 0.05$) de *Ch0.0* (145.3 ± 16.7 g) y *Ch0.19* (142.1 ± 16.5 g), pero no de *Ch0.12* (162.8 ± 6.9 g). El peso corporal final presentó el mismo patrón, registrándose el valor medio más alto en el tratamiento *Ch0.05* (311.4 ± 9.4 g), que fue significativamente ($P < 0.05$)

Table 2. Biological indices, survival rate, and cholesterol concentration in liver and muscle tissues of juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) fed four different cholesterol concentrations for 60 days (mean \pm standard deviation). Values within the same row with different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$).

Tabla 2. Índices biológicos, tasa de supervivencia y concentración de colesterol en los tejidos de hígado y músculo de juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) alimentados con diferentes concentraciones de colesterol durante 60 días (media \pm desviación estándar). Los valores con diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

	Experimental treatment			
	Ch0.0	Ch0.05	Ch0.12	Ch0.19
Biological indices				
Initial weight (g)	125.0 \pm 0.8	125.3 \pm 0.5	124.9 \pm 1.1	124.9 \pm 0.9
Final weight (g)	270.3 \pm 15.5 ^a	311.4 \pm 9.4 ^b	287.6 \pm 6.4 ^{ab}	267.0 \pm 16.4 ^a
Thermal growth coefficient*	1.16 \pm 0.11 ^a	1.41 \pm 0.05 ^b	1.27 \pm 0.05 ^{ab}	1.14 \pm 0.11 ^a
Weight gain (g)	145.3 \pm 16.7 ^a	186.2 \pm 8.8 ^b	162.8 \pm 6.9 ^{ab}	142.1 \pm 16.5 ^a
Weight gain (%)	116.3 \pm 14.7 ^a	148.6 \pm 6.5 ^b	130.4 \pm 6.5 ^{ab}	113.8 \pm 13.3 ^a
Survival (%)	95.2 \pm 8.25	100	100	90.5 \pm 8.25
Cholesterol concentration in tissues				
Liver (mg g ⁻¹)	2.543 \pm 2.288	2.410 \pm 0.978	2.582 \pm 0.500	2.585 \pm 0.764
Muscle (mg g ⁻¹)	1.478 \pm 0.396	1.404 \pm 0.059	1.362 \pm 0.284	1.136 \pm 0.247

* Thermal growth coefficient = [(final body weight^{1/3} - initial body weight^{1/3}) / (T (°C) \times t (days))] \times 1000.

and identified, could not be quantified due to the lack of analytical standards. In the muscle samples, campesterol and β -sitosterol were not detected by the SIM method (fig. 4).

DISCUSSION

The growth rates obtained here and given as TGC values are similar in the case of treatments Ch0.0 (1.16 \pm 0.11), Ch0.12 (1.27 \pm 0.05), and Ch0.19 (1.14 \pm 0.11) to the range of values (1.09 to 1.22) obtained by Orellana *et al.* (2013); however, the mean value for treatment Ch0.05 (1.41 \pm 0.05) was significantly higher relative to the other treatments. Cholesterol supplementation in fish diets has resulted in different effects on growth performance. A growth-promoting effect of cholesterol has been reported when the feed is based on high plant-protein content. Twibell and Wilson (2004) observed a significantly higher WG when 1% cholesterol was supplemented to a diet for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) formulated with soybean meal as the only protein source. In the same study, there was a significant improvement in feed intake, WG, and specific growth rate when cholesterol was supplemented to a soy protein isolate diet. An improvement in WG and feed intake was also observed when 1% cholesterol was added to a diet with high amounts of plant protein (soybean meal and wheat gluten meal) for *Scophthalmus maximus* (Yun *et al.* 2011).

When the aquafeed is based on fishery ingredients, the opposite effect has been reported. Deng *et al.* (2010) found a significant reduction in WG and specific growth rate in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) when cholesterol

diferente de los valores de Ch0.0 (270.3 \pm 15.5 g) y Ch0.19 (267.0 \pm 16.4), pero no de Ch0.12 (287.6 \pm 6.4).

El coeficiente de crecimiento térmico fue significativamente ($P < 0.05$) mayor para Ch0.05, con un valor de 1.41 \pm 0.05 (media \pm DE), y difirió de Ch0.0 y Ch0.19, pero no de Ch0.12. No se observaron diferencias estadísticas entre los otros tratamientos, con valores de 1.16 \pm 0.11 para Ch0.0, 1.27 \pm 0.05 para Ch0.12 y 1.14 \pm 0.11 para Ch0.19. El valor de *I_{max}* calculado con la regresión cuadrática para la concentración de colesterol (fig. 2) fue de 3179 mg kg⁻¹ de grasa cruda. Considerando el 95% de tal valor, el requerimiento estimado sería de 3020 mg kg⁻¹ de grasa cruda.

No se observaron variaciones significativas entre tratamientos en cuanto al colesterol total en las muestras de hígado y músculo (tabla 2). No obstante, el contenido de colesterol en el tejido muscular fue notablemente menor en Ch0.19. No se detectaron los precursores del colesterol, latosterol y desmosterol, en las muestras de hígado (fig. 3) o en las muestras de músculo de ninguno de los tejidos analizados mediante cromatografía de gases/espectroscopía de masas. Los fitoesteroles campesterol y β -sitosterol fueron detectados mediante el método de monitoreo selectivo de iones en las muestras de hígado de todos los tratamientos aun cuando los picos no eran claramente visibles a simple vista (fig. 3); sin embargo, a pesar de haber sido detectados e identificados, no fue posible cuantificar estos esteroides debido a la falta de estándares analíticos. Este método no detectó el campesterol y β -sitosterol en las muestras de músculo (fig. 4).

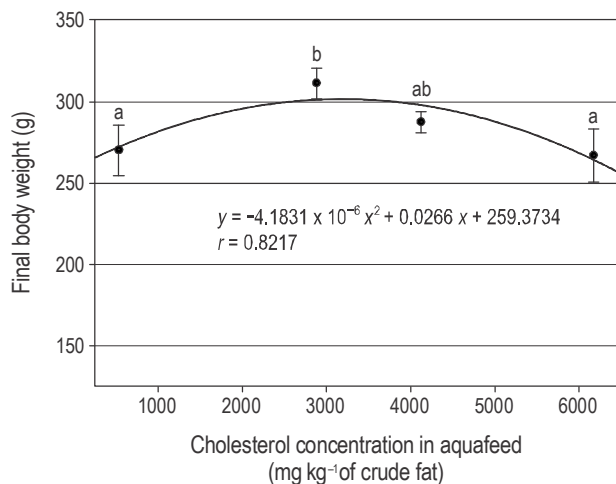


Figure 2. Quadratic regression adjustment between cholesterol concentration in the dietary treatments and final body weight of *Seriola lalandi* after 60 days of feeding experimentation.

Figura 2. Ajuste de regresión cuadrática entre la concentración de colesterol en las dietas y el peso corporal final de *Seriola lalandi* después de 60 días de un ensayo de alimentación.

was supplemented to a fish-derived diet, consisting of fish protein concentrate or fish meal with 1% additional cholesterol. In a feed trial with hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*), the addition of 1% cholesterol to a fish meal diet decreased the WG and feed efficiency ratio, but not significantly (Sealey *et al.* 2001). In a study using *Salmo salar*, however, the addition of 1% cholesterol to a fish meal diet did not show significant differences in growth performance when compared with a diet without supplemented cholesterol, but cholesterol increase in feces and accumulation in liver tissue were observed (Bjerkeng *et al.* 1999). Nevertheless, when defatted fish meal was used to feed *Scophthalmus maximus*, the supplementation of 1% cholesterol failed to significantly improve the feed intake, but an increase in WG was observed (Zhu *et al.* 2014).

In the present work, growth decreased when fish were fed the lowest (diet *Ch0.0*, 530 mg kg⁻¹ of CF) and highest (diet *Ch0.19*, 6170 mg kg⁻¹ of CF) cholesterol concentrations compared to the treatment *Ch0.05* (2880 mg kg⁻¹ of CF). This result was unexpected because the cholesterol concentration of diet *Ch0.19* resembles the cholesterol content that would be present if the diet was formulated using fish meal as the sole protein source without removing the fat and fish oil. In YTK, one of the uses of cholesterol, among others, is in the synthesis of bile salts, and in these fish the conjugation of bile acids occurs only with taurine and not with glycine-conjugated bile salts as has been reported for other organisms (Russell 2003). Therefore, it can be assumed that in *Seriola* species, as reported for *S. quinqueradiata* (Khaolian *et al.* 2014), the only cholesterol-degradation pathways available are taurocholic acid and chenodeoxycholytaurine.

DISCUSIÓN

Las tasas de crecimiento obtenidas en este trabajo y presentadas como valores del coeficiente de crecimiento térmico son similares en el caso de los tratamientos *Ch0.0* (1.16 ± 0.11), *Ch0.12* (1.27 ± 0.05) y *Ch0.19* (1.14 ± 0.11) al intervalo de valores (1.09 a 1.22) obtenido por Orellana *et al.* (2013); sin embargo, el valor medio para el tratamiento *Ch0.05* (1.41 ± 0.05) fue significativamente mayor que el de los otros tratamientos. La suplementación de colesterol en dietas para peces ha afectado el crecimiento de distintas formas. Se ha documentado un efecto promotor de crecimiento cuando el alimento se basa en un contenido alto de proteína vegetal. Twibell y Wilson (2004) observaron una ganancia de peso significativamente mayor cuando una dieta para el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) formulada con harina de soya como la única fuente de proteína fue suplementada con 1% de colesterol. En ese mismo estudio, se observó una mejoría significativa en cuanto al consumo de alimento, la ganancia de peso y la tasa de crecimiento específico cuando se adicionó colesterol a una dieta con cantidades altas de proteína vegetal (harina de soya y harina de gluten de trigo) para *Scophthalmus maximus* (Yun *et al.* 2011).

Cuando el alimento se basa en ingredientes de pescado, se ha documentado un efecto opuesto. Deng *et al.* (2010) observaron una reducción significativa de la ganancia de peso y la tasa de crecimiento específico en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) cuando una dieta que consistía de concentrado de proteína de pescado o harina de pescado fue suplementada con 1% de colesterol. En un ensayo con el róbalo híbrido (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*), la adición de 1% de colesterol a una dieta de harina de pescado redujo la ganancia de peso y la razón de eficiencia alimentaria, pero no de manera significativa (Sealey *et al.* 2001). En un ensayo con *Salmo salar*, sin embargo, no se observaron diferencias significativas cuando se adicionó 1% de colesterol a una dieta de harina de pescado, en comparación con una dieta no suplementada, pero sí se observó un aumento de colesterol en los heces y su acumulación en tejido hepático (Bjerkeng *et al.* 1999). Cuando se usó harina de pescado desgrasada en dietas para *Scophthalmus maximus*, la suplementación de 1% de colesterol no mejoró significativamente el consumo de alimento, pero sí aumentó la ganancia de peso (Zhu *et al.* 2014).

En el presente trabajo, el crecimiento disminuyó cuando los peces recibieron las dietas con menor (*Ch0.0*, 530 mg kg⁻¹ de grasa cruda) y mayor (*Ch0.19*, 6170 mg kg⁻¹ de grasa cruda) concentración de colesterol en comparación con la dieta *Ch0.05* (2880 mg kg⁻¹ de grasa cruda). Este resultado fue inesperado ya que la concentración de colesterol en la dieta *Ch0.19* es similar al contenido de colesterol que se encontraría en una dieta elaborada con harina de pescado como la única fuente de proteína sin quitar la grasa y el aceite de pescado. En el jurel de Castilla, uno de los usos del

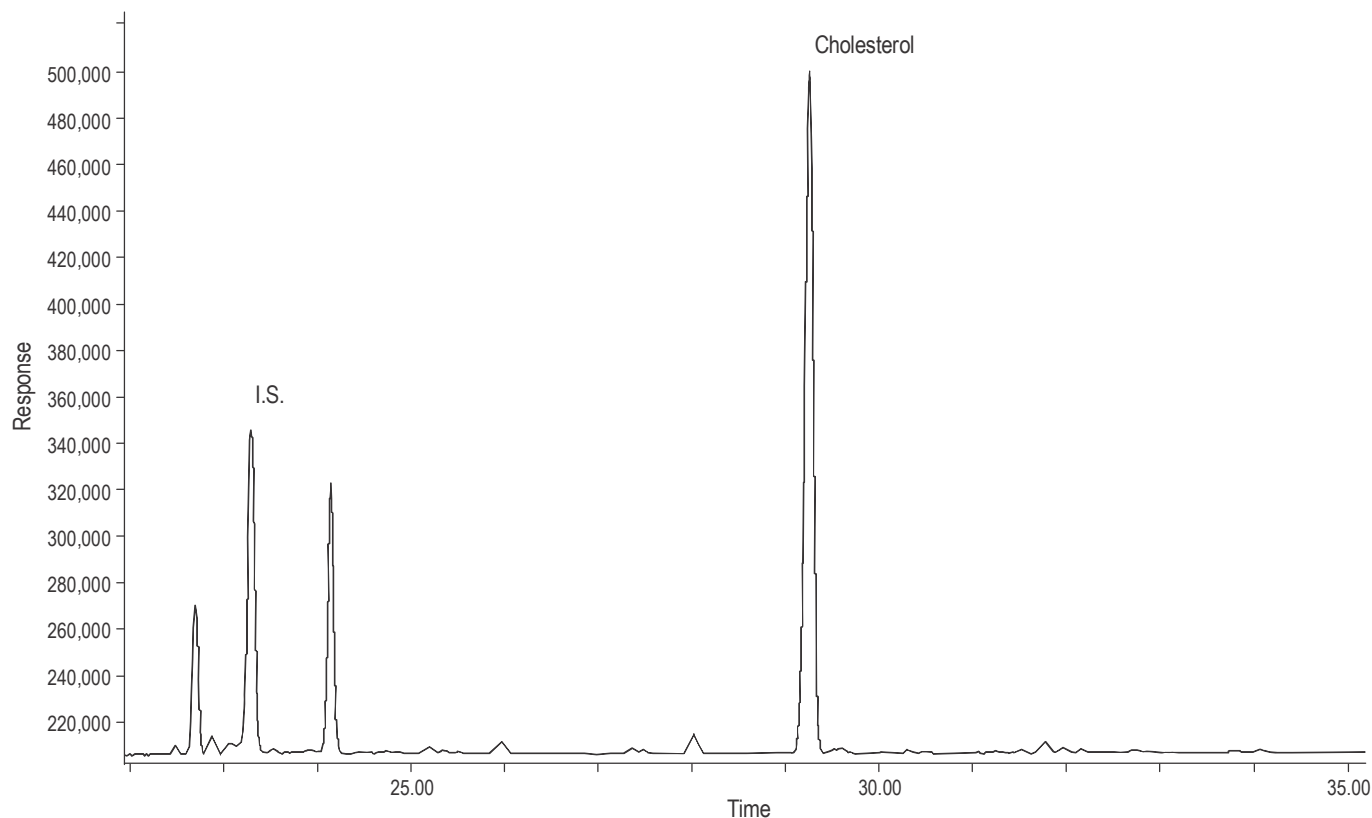


Figure 3. Chromatogram obtained from liver tissue (sample from treatment *Ch0.19*). I.S. = internal standard (*5 α -cholestane*).

Figura 3. Cromatograma obtenido de tejido hepático (muestra del tratamiento *Ch0.19*). I.S. = estándar interno (*5 α -colestano*).

Several studies have pointed out that higher dietary cholesterol concentrations promote the gene *CYP7A1* expression (Yun *et al.* 2011, 2012; Zhu *et al.* 2014) that synthesizes the protein cholesterol-7 α -hydroxylase, a rate-limiting enzyme responsible for the bile acid synthesized from cholesterol (Matsumoto *et al.* 2005). In a feed trial with juvenile *S. quinqueradiata* fed fish meal and soybean meal diets supplemented with or without cholesterol and/or taurine (Khaoian *et al.* 2014), hepatic cholesterol accumulation was significantly higher in fish fed the diets lacking taurine than in those fed the taurine-supplemented diets. Reduced growth and bile salt synthesis rates were also found in fish fed diets without taurine supplementation. When taurine was supplemented, no cholesterol accumulation was detected and the bile salt synthesis rate and excretion improved.

Comparing these findings with the results of the present study, it is likely that the higher cholesterol concentration in diet *Ch0.19* stimulated the synthesis of bile salts in juvenile YTK. This process would consume both cholesterol and taurine with an inevitable reduction in both nutrients. It has already been pointed out that taurine is an essential nutrient for YTK to sustain optimal growth (Jirsa *et al.* 2014). Though the synthesis of bile acids and nutrient digestibility were not evaluated, restrictions in taurine availability due to bile acid synthesis may have affected the growth of fish fed diet *Ch0.19*. This hypothesis can be supported by the negative

colesterol, entre otros, es en la síntesis de sales biliares, y en estos peces la conjugación de ácidos biliares sucede sólo con taurina y no con sales biliares conjugados con glicina, como se ha documentado para otros organismos (Russell 2003). Por lo tanto, es posible suponer que en especies del género *Seriola*, como ha sido documentado para *S. quinqueradiata* (Khaoian *et al.* 2014), la única ruta de degradación del colesterol es a través del ácido taurocólico y la N-quenodesoxicoiloil taurina.

Varios estudios han indicado que altas concentraciones de colesterol dietético promueven la expresión del gen *CYP7A1* (Yun *et al.* 2011, 2012; Zhu *et al.* 2014) que sintetiza la enzima colesterol-7 α -hidroxilasa, una enzima reguladora responsable del ácido biliar sintetizado del colesterol (Matsumoto *et al.* 2005). En un ensayo con juveniles de *S. quinqueradiata* alimentados con dietas de harina de pescado y harina de soya suplementadas con y sin colesterol y/o taurina (Khaoian *et al.* 2014), la acumulación de colesterol en el hígado fue significativamente mayor en los individuos alimentados con las dietas que no contenían taurina que con las dietas suplementadas con taurina. Asimismo, se observó un crecimiento reducido y una menor tasa de síntesis de sales biliares en los peces alimentados con dietas sin suplementación de taurina. Cuando la taurina fue suplementada, no se detectó acumulación de colesterol y mejoraron las tasas de síntesis y excreción de sales biliares.

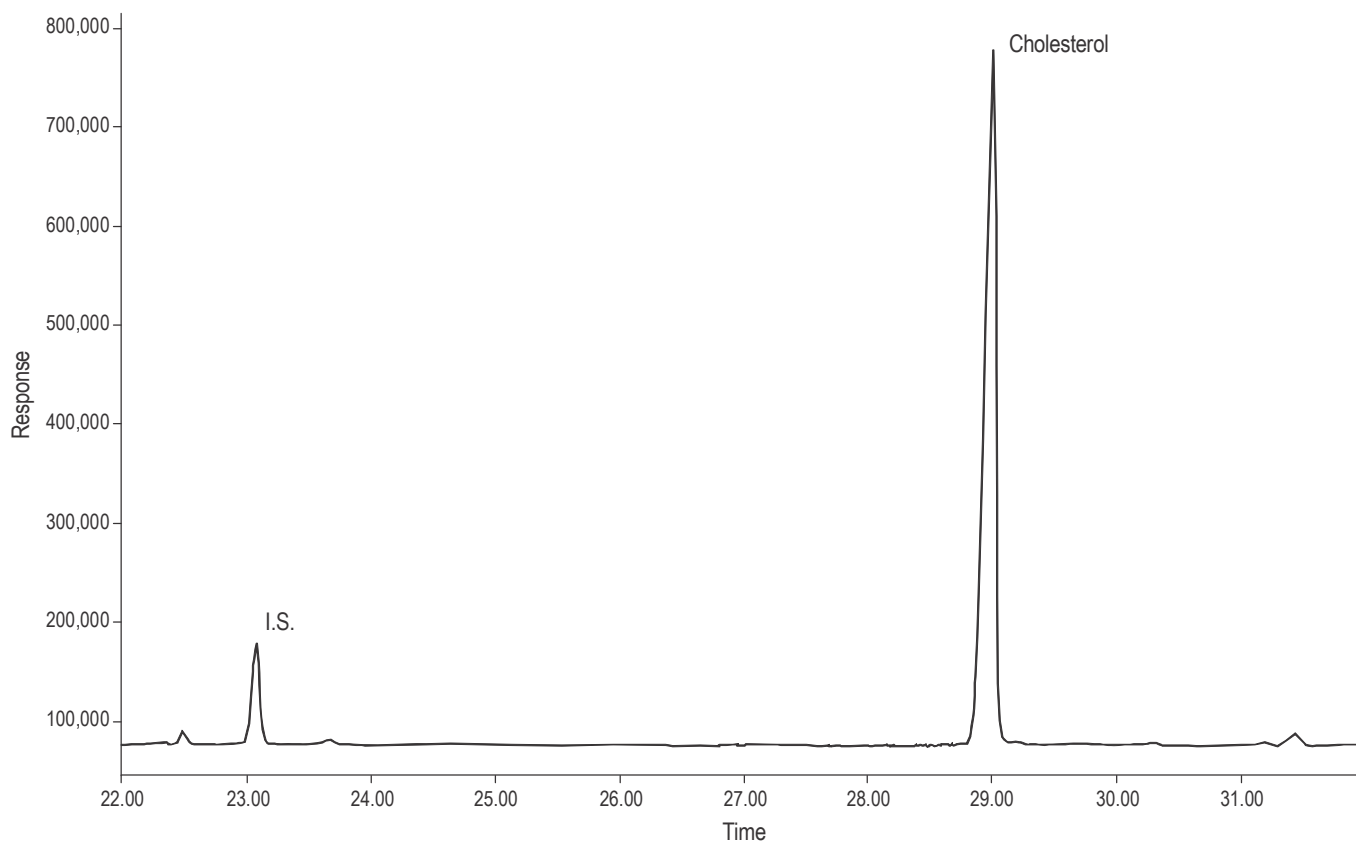


Figure 4. Chromatogram obtained from muscle tissue (sample from treatment *Ch0.12*). I.S. = internal standard (*5 α -cholestane*).

Figura 4. Cromatograma obtenido de tejido muscular (muestra del tratamiento *Ch0.12*). I.S. = estándar interno (*5 α -colestano*).

correlation between the cholesterol concentration in the diet and muscle tissues observed in the present work, although no significant differences were observed. This could be due to the reverse cholesterol transport of conjugated high density lipoproteins (HDL) (Chen *et al.* 2003), which mobilizes the cholesterol from peripheral tissues into the liver. HDL-cholesterol would then be reabsorbed by the liver and secreted in bile as free cholesterol and bile salts by the ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5 and ABCG8) and the bile salt export pump (van der Wulp *et al.* 2013). The liver cholesterol concentration would thus not vary and the cholesterol content in muscle would decrease depending on how much cholesterol is required to synthesize the bile salts in the liver.

An important amount of energy expenditure is required for cholesterol biosynthesis (Haines 2001, Norambuena *et al.* 2013). In a recent study with *O. mykiss* (Norambuena *et al.* 2013), a diet supplemented with 0.1% cholesterol failed to improve the growth performance of fish compared to a similar diet without the supplement. However, despite the growth results reported, differential energy expenditure was attributed to the cholesterol biosynthesis by observing that fish fed the lower cholesterol concentration had a higher fatty acid β -oxidation rate. Since the muscle and the whole-body cholesterol concentrations did not differ between the

Comparando tales resultados con los del presente trabajo, es posible que la mayor concentración de colesterol en la dieta *Ch0.19* estimuló la síntesis de sales biliares en los juveniles de jurel de Castilla. Este proceso consumiría tanto el colesterol como la taurina, resultando inevitable la reducción de ambos nutrientes. La taurina es un nutriente esencial para el crecimiento óptimo del jurel de Castilla (Jirsa *et al.* 2014). A pesar de que no fue posible evaluar la síntesis de ácidos biliares y la digestibilidad de nutrientes en el presente estudio, restricciones en la disponibilidad de taurina debido a la síntesis de ácidos biliares podrían haber afectado el crecimiento de los peces alimentados con la dieta *Ch0.19*. Esta hipótesis es apoyada por la correlación negativa entre la concentración de colesterol en la dieta y el tejido muscular, aunque no se observaron diferencias significativas. Esto puede deberse al transporte inverse del colesterol de lipoproteínas de alta densidad conjugadas (Chen *et al.* 2003), que moviliza el colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado. El colesterol contenido en las lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoproteins, HDL cholesterol*) sería entonces reabsorbido por el hígado y secretado en la bilis a través de los transportadores dependientes de unión a ATP ABCG5 y ABCG8 (*ATP-binding cassette transporter G5 and G8*) en forma de colesterol libre y sales biliares (van der Wulp *et al.* 2013). La concentración de colesterol en el

experimental groups, it was suggested that cholesterol biosynthesis was compensating for the dietary deficiency (Norambuena *et al.* 2013).

In our study, the fish fed diet *Ch0.0* presented a liver cholesterol concentration similar to that of fish fed the other experimental diets, whereas the cholesterol concentrations in muscle tissue were slightly, though not significantly, higher. Considering the conclusions reported by Norambuena *et al.* (2013), the lower growth of fish fed diet *Ch0.0* could be attributed to the energy spent on the cholesterol biosynthesis necessary to compensate for the dietary deficiency in order to maintain the cholesterol content needed as observed in the rest of the treatments.

Zhu *et al.* (2014) concluded that even if juvenile *Scophthalmus maximus* were able to synthesize cholesterol, it was not enough to maximize growth, suggesting the need for supplementation. The same authors mention that excess cholesterol could be even harmful to fish health despite promoting higher weights. When cholesterol is provided at higher concentrations than needed, a higher concentration in feces is observed (Bjerkeng *et al.* 1999; Deng *et al.* 2010; Yun *et al.* 2011, 2012; Zhu *et al.* 2014), turning into a potential risk factor for health, like promoting atherosclerotic lesions (Deng *et al.* 2010). Here, cholesterol accumulation was not observed either in muscle or liver tissues, a result that suggests that the cholesterol concentrations used were not excessive for this fish species (up to 6170 mg kg⁻¹ of CF). Cholesterol is absorbed in the proximal intestine due to the activity of the membrane transporter Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) located in the apical zone of the enterocyte membrane (Altmann *et al.* 2004), a transporter that also works with phytosterols (Davis and Altmann 2009, Davis *et al.* 2004). Enterocytes also have the capacity to secrete cholesterol into the lumen, a process known as transintestinal cholesterol excretion. This occurs through the ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5 and ABCG8) (Yu *et al.* 2002a, 2002b), a process that has also been reported for phytosterols (Berge *et al.* 2000).

We conclude that the variations in the cholesterol content in partially-substituted diets for YTK have a significant effect on growth performance. When substituting fish meal and fish oil, it is important that proper cholesterol sources be found to blend together with vegetable oil as long as the other nutrients are present.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the National Council for Science and Technology (CONACYT, Mexico) for the scholarship granted to FMGO; José Vinicio Macías Zamora and Nancy Ramirez Álvarez for their support in the GC-MS analysis of samples and for providing all the necessary equipment; Juan Pablo Lazo Corvera for his help on YTK nutritional requirements; and Baja Seas, SA de CV, for providing the juvenile YTK.

hígado no variaría y el contenido de colesterol muscular disminuiría dependiendo de la cantidad de colesterol requerido para sintetizar las sales biliares en el hígado.

La biosíntesis del colesterol requiere un considerable gasto energético (Haines 2001, Norambuena *et al.* 2013). En un estudio reciente con *O. mykiss* (Norambuena *et al.* 2013), una dieta suplementada con 0.1% de colesterol no mejoró el crecimiento de los individuos en comparación con una dieta similar no suplementada; sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos, se atribuyó el gasto energético diferencial a la biosíntesis del colesterol al observar que los individuos alimentados con la menor concentración de colesterol presentaban una mayor tasa de β -oxidación de ácidos. Puesto que las concentraciones de colesterol en tejido muscular y todo el cuerpo no difirieron entre los grupos experimentales, se sugirió que la biosíntesis del colesterol estaba compensando la deficiencia dietética (Norambuena *et al.* 2013).

En nuestro estudio, la concentración de colesterol en el hígado de los peces alimentados con la dieta *Ch0.0* fue similar al de los individuos alimentados con las otras dietas experimentales, mientras que la concentración de colesterol en el tejido muscular fue ligeramente, pero no significativamente, mayor. Considerando las conclusiones de Norambuena *et al.* (2013), se puede atribuir el menor crecimiento de los peces alimentados con la dieta *Ch0.0* a la energía gastada en la biosíntesis del colesterol para compensar la deficiencia dietética y mantener el contenido de colesterol necesario, como se observa en los demás tratamientos.

Zhu *et al.* (2014) concluyeron que individuos juveniles de *Scophthalmus maximus* eran capaces de sintetizar el colesterol, pero no lo suficiente para maximizar el crecimiento, lo que indica una necesidad de suplementación. Estos autores también mencionan que un exceso de colesterol podría resultar ser más dañino para la salud de los peces a pesar de promover pesos corporales más altos. Cuando el colesterol se proporciona en concentraciones más altas de lo necesario, se observa una mayor concentración en los heces (Bjerkeng *et al.* 1999; Deng *et al.* 2010; Yun *et al.* 2011, 2012; Zhu *et al.* 2014), lo que representa un factor de riesgo potencial para la salud, como sería el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Deng *et al.* 2010). Aquí, no se observó acumulación de colesterol en los tejidos musculares o hepáticos, lo que sugiere que las concentraciones de colesterol no fueron excesivas para el jurel de Castilla (hasta 6170 mg kg⁻¹ de grasa cruda). El colesterol es absorbido en el intestino proximal debido a la actividad de la proteína transportadora Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) localizada en la membrana apical del enterocito (Altmann *et al.* 2004), que también trabaja con fitoesteroles (Davis y Altmann 2009, Davis *et al.* 2004). Los enterocitos también tienen la capacidad de secretar colesterol hacia el lumen, un proceso conocido como excreción de colesterol transintestinal, que sucede a través de los transportadores ABCG5 y ABCG8 (Yu *et al.* 2002a, 2002b). Este proceso también ha sido documentado para fitoesteroles (Berge *et al.* 2000).

REFERENCES

- Abbink W, Blanco Garcia A, Roques JAC, Partridge GJ, Kloet K, Schneider O. 2011. The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 330–333: 130–135.
- Abidi SL. 2001. Review. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A* 935: 173–201.
- Ahmida HSM, Bertucci P, Franzo L, Massoud R, Cortese C, Lala A, Federici G. 2006. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J. Chromatogr. B* 842: 43–47.
- Altmann SW, Davis Jr HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303: 1201–1204.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists*. 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290: 1771–1775.
- Bjerkeng B, Storebakken T, Wathne E. 1999. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): Effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. *Aquacult. Nutr.* 5: 181–191.
- Bligh EG, Dyer WJA (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–931.
- Bowyer JN, Qin JG, Smullen RP, Stone DAJ. 2012. Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture* 356–357: 211–222.
- Bowyer JN, Qin JG, Smullen RP, Adams LR, Thomson MJS, Stone DAJ. 2013. The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures. 1. Solvent extracted soybean meal. *Aquaculture* 384–387: 35–45.
- Chen JY, Chen JC, Wu JL. 2003. Molecular cloning and functional analysis of zebrafish high-density lipoprotein-binding protein. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 136: 117–130.
- Davis Jr HR, Altmann SW. 2009. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 679–683.
- Davis Jr HR, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SPN, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 279: 33586–33592. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405817200>
- Deng J, Mai K, Ai Q, Zhang W, Wang X, Tan B, Xu W, Liufu Z, Ma H. 2010. Interactive effects of dietary cholesterol and protein sources on growth performance and cholesterol metabolism of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquacult. Nutr.* 16: 419–429.
- Deng J, Kang B, Tao L, Rong H, Zhang X. 2013. Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 324–31.
- En conclusión, las variaciones del contenido de colesterol en las dietas parcialmente sustituidas para el jurel de Castilla tienen un efecto significativo en el crecimiento. Cuando se sustituye la harina de pescado y el aceite de pescado, es importante encontrar fuentes de colesterol que se mezclen bien con el aceite vegetal siempre y cuando los otros nutrientes estén presentes.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor fue apoyado por una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). Los juveniles de jurel de Castilla fueron amablemente proporcionados por Baja Seas, SA de CV. Se agradece a José Vinicio Macías Zamora y Nancy Ramirez Álvarez su apoyo en el análisis de las muestras para la cromatografía de gases/espectrometría de masas y el haber proporcionado todo el equipo, y a Juan Pablo Lazo Corvera su ayuda en cuanto a los requerimientos nutricionales del jurel de Castilla.

Traducido al español por Christine Harris.

- Fernandes M, Tanner J. 2008. Modelling of nitrogen loads from the farming of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquacult. Res.* 39: 1328–1338.
- Haines TH. 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40: 299–324.
- Hansen AC, Rosenlund G, Karlsen Ø, Koppe W, Hemre GI. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). I. Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272: 599–611. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.034>
- Hardy RW. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquacult. Res.* 41: 770–776.
- Jirsa DO, Stuart KR, Salze GP, Rhodes MA, Davis DA, Drawbridge MA. 2014. Limiting amino acids in practical diets for California yellowtail *Seriola lalandi*. *J. World Aquacult. Soc.* 45(6): 681–690. <http://dx.doi.org/10.1111/jwas.12158>
- Jordal AEO, Lie Ø, Torstensen BE. 2007. Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Nutr.* 13: 114–130. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00455.x>
- Kaushik SJ, Coves D, Dutto G, Blanc D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230: 391–404.
- Khaoian P, Nguyen HP, Ogita Y, Fukada H, Masumoto T. 2014. Taurine supplementation and palm oil substitution in low-fish meal diets for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 420–421: 219–224.
- Maita M, Maekawa J, Satoh KI, Futami K, Satoh S. 2006. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fish. Sci.* 72: 513–519.
- Matsumoto J, Erami K, Ogawa H, Doi M, Kishida T, Ebihara K. 2005. The protease-resistant fraction of smoked, dried bonito lowers serum cholesterol in ovariectomized rats fed cholesterol-free diets. *J. Food Sci.* 70: 467–474.

- Moran D, Pether SJ, Lee PS. 2009. Growth, feed conversion and fecal discharge of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) fed three commercial diets. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 43: 917–927.
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* 41: 457–500.
- Nasopoulou C, Zabetakis I. 2012. Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *LWT-Food Sci. Technol.* 47: 217–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.018>
- Norambuena F, Lewis M, Khalidah N, Hamid A, Hermon K, Donald JA, Turchini GM. 2013. Fish oil replacement in current aquaculture feed: Is cholesterol a hidden treasure for fish nutrition? *Plos One* 8(12): e81705. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081705>
- Orellana J, Waller U, Wecker B. 2013. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacult. Eng.* 58: 20–28.
- Pirozzi I, Booth MA. 2009. The routine metabolic rate of mullet (*Argyrosomus japonicus*: Sciaenidae) and yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*: Carangidae) acclimated to six different temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152: 586–592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.01.008>
- Richard N, Mourente G, Kaushik S, Corraze G. 2006. Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261: 1077–1087. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.021>
- Russell DW. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 137–174.
- Sealey WM, Craig SR, Gatlin III DM. 2001. Dietary cholesterol and lecithin have limited effects on growth and body composition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquacult. Nutr.* 7: 25–31.
- Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249: 387–400. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.031>
- Tacon AGJ, Metian M. 2009. Fishing for aquaculture: Non-food use of small pelagic forage fish—A global perspective. *Rev. Fish. Sci.* 17: 305–317. <http://dx.doi.org/10.1080/10641260802677074>
- Takagi S, Murata H, Goto T, Endo M, Yamashita H, Ukawa M. 2008. Taurine is an essential nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture* 280: 198–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.012>
- Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquacult.* 1: 10–57. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Twibell RG, Wilson RP. 2004. Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 236: 539–546.
- Van der Wulp MYM, Verkade HJ, Groen AK. 2013. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol. Cell Endocrinol.* 368: 1–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.007>
- Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. 2002a. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16237–16242. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.252582399>
- Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. 2002b. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* 110: 671–80. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI16001>
- Yun B, Mai K, Zhang W, Xu W. 2011. Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture* 319: 105–110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.028>
- Yun B, Ai Q, Mai K, Xu W, Qi G, Luo Y. 2012. Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture* 324–325: 85–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.012>
- Zhu T, Ai Q, Mai K, Xu W, Zhou H, Liufu Z. 2014. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. *Aquaculture* 428–429: 290–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.027>

Received February 2015,
accepted March 2015.