

Uso de Betaina en Alimentos Acuícolas: Atractante, Osmoregulador o Metabolito Lipotrófico?

Martin Guérin

Finnfeeds International Ltd., PO Box 777, Marlborough SN8 1XN, Wiltshire, Great Britain

Resumen:

La betaina o betaina-glicina, es un metabolito natural encontrado en muchos organismos vivos, especialmente en aquellos que crecen en el ambiente marino. En este trabajo se discuten las principales funciones y aplicaciones de la betaina en alimentos para acuicultura. La betaina, electrolito bipolar que lleva tres grupos metilo, deriva de su estructura química sus principales propiedades son como osmoprotector, atractante y donador de metilos. Si bien las propiedades osmo-protectoras de la betaina han sido en su mayor parte estudiadas en salmonidos, con la mayoría de las dietas comerciales de transferencia marina suplementadas con betaina para salmón y trucha, hay indicadores de que la betaina tendría funciones similares en otras especies de peces y crustáceos marinos. La estimulación alimenticia y propiedades atractantes de la betaina han sido documentadas con un gran número de especies de peces y camarones de importancia para la acuicultura, usualmente teniendo efectos sinérgicos cuando se mezcla con otros atractantes. Por otra parte, y contrario a los animales terrestres donde las funciones lipotrópicas y otras funciones relacionadas con la donación de metilos de la betaina han sido mejor documentados, el campo de aplicación de betaina dietética en la acuicultura ha sido muy poco estudiado. La única aplicación común de la betaina en esta actividad es usarla en alimentos acuícolas comerciales para ahorrar en el uso del cloruro de colina, debido a su mayor eficiencia como donador metilos, y para disminuir el impacto negativo sobre la estabilidad de las vitaminas. Sin embargo, otras aplicaciones potenciales prometedoras tales como ahorrar en el suplemento de metionina, reducción en grasas del cuerpo o propiedades de economía de energía, permanecen inexploradas.

1. Introducción: Funciones Metabólicas Básicas de la Betaina y Ocurrencia Natural

La betaina, también llamada betaina-glicina, es una molécula que ocurre naturalmente, la cual es encontrada como constituyente de un gran número de plantas y animales. Esta estructura química específica (figura 1) le confiere sus principales funciones metabólicas. La betaina ha sido clasificada como un metil-amino; este tiene tres grupos metilo y tiene como resultado un importante donador de metilos en reacciones metabólicas críticas. También, es un electrolito bipolar soluble en agua; siendo éste el origen osmoprotector de la betaina y de sus propiedades atractantes. La betaina puede ser encontrada en un gran número de organismos, especialmente marinos y especies eurihalinas, y en algunas plantas, pero se encuentra a niveles indetectables o solamente a muy bajos niveles en la mayoría de los productos alimenticios, tal como harina de pescado o harina de soya (Finnsugar Bioproducts, 1996b). Varios autores analizaron y encontraron niveles significantes de betaina en organismos marinos (Carr *et al.* 1996 ; Valdéz Martínez 1983). La betaina es considerada como un componente importante del sabor de carne de peces y crustáceos (Lee *et al.* 1989; Jeon *et al.*

Guérin, M. 2000. Uso de betaina en alimentos acuícolas: atractantes, osmo-reguladores o metabolitos lipotropicos? pp 492-508 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

1990; Hayashi *et al.* 1989). Los niveles observados pueden fluctuar altamente de una especie a otra, aun todavía si están cercanamente relacionadas (Carr *et al.* 1996). Este nivel también puede fluctuar con las mismas especies (Pierce *et al.* 1995 ; Dagrolovich, 1992).

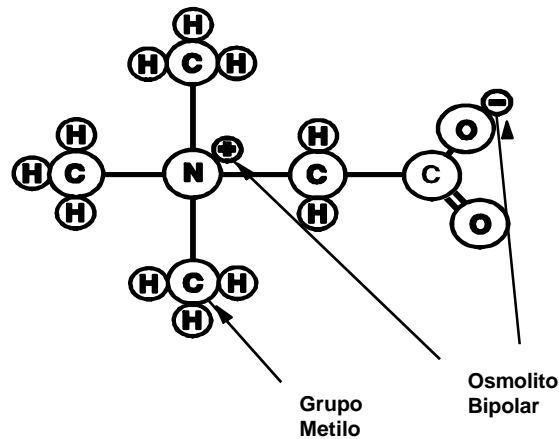


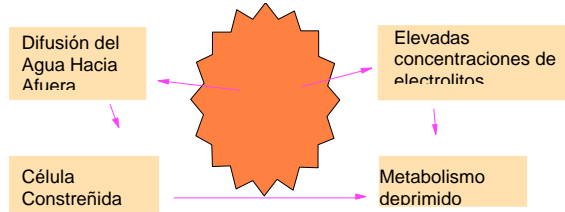
Figura 1. Molécula de la Betaina

La betaina puede ser biosintetizada a través de dos pasos de oxidación de la colina en la mitocondria, pero esta conversión puede ser totalmente ineficiente, y totalmente variable. Por ejemplo, en la mitocondria de dos variedades de ostra *Crassostrea virginica*, Pierce *et al.* (1995) encontraron que la tasa de biosíntesis de betaina puede variar por arriba de un factor de 4-veces entre las dos variedades, cuando las mitocondrias fueron colocadas bajo ambientes similares, y por arriba de un factor de 5-veces con la misma variedad cepa cuando las mitocondrias fueron expuestas a diferentes salinidades. En algunos casos, cuando las funciones de la betaina son activamente estimuladas, la tasa de biosíntesis puede llegar a ser insuficiente. Una fuente dietética exógena de betaina puede ser benéfica, como ha sido demostrado con diferentes tipos de animales terrestres y acuáticos.

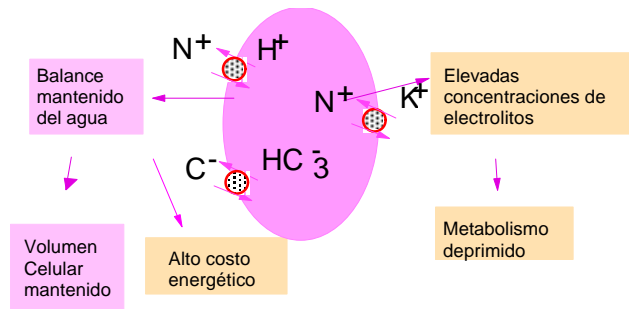
2. La Betaina: un Osmoprotector Natural

Al parecer la razón principal del por qué la betaina se encuentra en especies de plantas, microbios y animales, es su habilidad para proteger a la célula contra la inactivación osmótica. En animales terrestres, esta inactivación osmótica puede llegar por ejemplo de una deshidratación debido al estrés por calor, mientras que en peces, camarones y otros organismos marinos, esto en su mayor parte viene del incremento en los niveles de salinidad. Bajo esas condiciones, las células y mitocondrias pierden agua, resultando en un incremento en la concentración de sal, la cual puede llevar a una reducción del metabolismo y la actividad enzimática intracelular (Yancey *et al.* 1982 ; Rudolph *et al.* 1986 ; Gabbay-Azaria *et al.* 1988 ; Santoro *et al.* 1992). La acumulación de betaina en la mitocondria puede resultar de la biosíntesis en aquellos organismos capaces de producirla activamente, o de fuentes exógenas en aquellos organismos con insuficiente capacidad biosintética para cubrir los requerimientos. Sin embargo, en ambos casos este papel será la de ayudar a incrementar la retención de agua, reducir la acumulación de sales, y ayudar a mantener la actividad enzimática celular (Fig. 2).

1. Mecanismos no Compensatorios



2. Compensación con Bomba de Iones



3. Compensación con Bombas de Iones y Betaina, un Osmolito

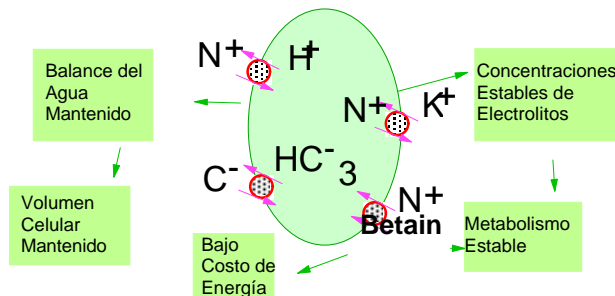


Figura 2. Estrés Hiperosmótico: Mecanismos no compensatorios vs Compensación con bomba de iones o Betaina

Peces tal como el salmón parecen pertenecer a la segunda categoría. Björköy (1991) observó que la mitocondria aislada de hígado del salmón mostró una reducida síntesis de betaina bajo estrés osmótico, mientras que la betaina se incrementó en proporción a la intensidad del shock osmótico (alta concentración de cloruro de potasio)(Fig. 3a). También encontró que la actividad respiratoria de mitocondrias del hígado del salmón expuestas a altas concentraciones de cloruro de potasio fue drásticamente reducida. Sin embargo, en presencia de betaina en el medio de cultivo, la inactivación fue mucho más baja que en la ausencia de esta (Björköy 1991) (Fig.3b).

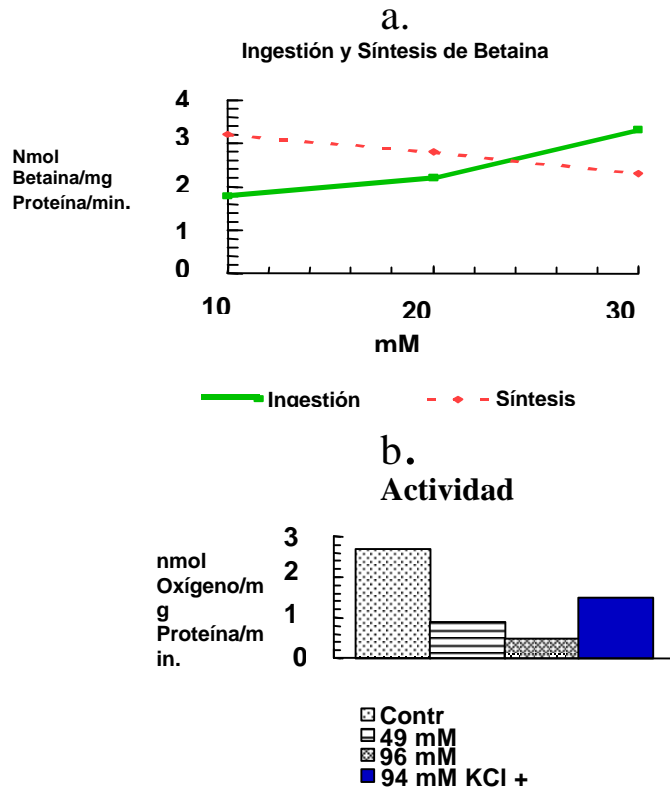


Figura 3 a,b. Efecto osmoprotector de la betaina en la mitocondria del hígado del salmón

Esas propiedades osmoprotectoras de la betaina bajo condiciones *in-vitro* han sido empleadas exitosamente en aplicaciones prácticas en dietas para transferencia de salmón. Varios ensayos han sido realizados con diversas especies de salmonidos los cuales necesitan adaptar rápidamente su balance osmótico cuando se transfieren de agua dulce a agua marina. Esos ensayos con salmón del Atlántico, salmón Chinook o trucha arco iris, han mostrado que las dietas alimenticias suplementadas con 1 a 1.5% Finnstim® (un aditivo alimenticio comercial consistente principalmente de betaina), resultó en una reducida acumulación de sales en el plasma, músculo o branquias (Tabla 1) (Virtanen *et al.* 1989, 1992, 1994 ; Clarke *et al.* 1994). Alimentando el salmón del Atlántico con Finnstim también resultó en la más alta actividad de la principal enzima responsable de la osmoregulación en salmonidos: Na-K-ATPasa branquial (Virtanen *et al.* 1989). Al parecer la acumulación de betaina en el músculo de juveniles de salmón del Atlántico alimentados con altos niveles de betaina, es la principal razón para la alta retención de betaina y los más bajos niveles de cationes en el plasma de los peces, comparado con peces alimentados sin betaina (Virtanen *et al.* 1989). Ensayos nutricionales conducidos con trucha arco iris, salmón del Atlántico, Chinook y Coho, han mostrado que esas propiedades osmoprotectoras de la betaina podrían convertirse en mejores tasas de sobrevivencia post-transferencia al mar, de crecimiento y de conversión alimenticia en peces alimentados con Finnstim (Tabla 2), y han llevado a una amplia gama de sus aplicaciones en dietas comerciales.

Tabla 1. Efecto de la suplementación de Finnstim (1-1.5%) en dietas de salmonidos sobre el balance iónico y osmótico en alevines, después de la transferencia.

Especie	Días en Agua Marina	Parámetro	Control vs. FINNSTIM	Referencia
ATS	2	Plasma Na+	(mmol/l) 182.4 ** 163.1	Virtanen et al.1989
ATS	2	Plasma Mg2+	(mmol/l)3.19 ** 1.40	Virtanen et al.1989
ATS	2	Músculo H2O	H2O(%) 72.5 *** 75.4	Virtanen et al.1989
ATS	60	Na-K-ATPasa Branquial	(μ mol P/mg prot/h) 4.21*** 6.68	Virtanen et al.1989
CHS	63	Plasma Na+	(mmol/l) 171.7 ** 165.9	Clarke et al. 1994
ATS	1	Músculo K	(mmol/l) 149.5 ** 137.8	Virtanen et al.1992
ATS	8	Músculo K+	(mmol/l) 156.9 NS 149.9	Virtanen et al.1992
RBT	1	Músculo K+	Na+ 10.7 ** 8.5	Virtanen et al.1994

ATS= Salmón del Atlántico, CHS= Chinook Salmón, RBT= Trucha Arco iris, ***(P<math><0.01</math>), **(P<math><0.05</math>), N.S. (No significativo)
Adaptado de Finnsugar Bioproducts 1996a

Tabla 2. Resumen de los ensayos de transferencia a agua de mar con cuatro especies de salmonidos: efecto de la suplementación con betaina como aditivo alimenticio.

Especies y lugares	Tipo de Dieta	Duración en agua dulce y marina	Parámetro	Control	Dieta con 1 a 1.5% Finnstim	P-Valor	Diferencia (%)
ATS Noruega	48.5%PC 20% Grasa extruído	35 días FW 21 días SW jaulas de 5m x 5m	Mortalidad(%) SGR (%/día)	11.1 -0.45	5.1 -0.15	<math><0.01</math> <math><0.01</math>	-54% -
ATS Noruega	51% PC 21% Grasa extruído	55 días FW 21 días FW jaulas de 5m x 5m	Mortalidad(%) SGR (%/día)	9.2 -0.08	8.7 0.28	NS <math><0.05</math>	-6% -
CHS Canadá	52% CP 17.5% Grasa Pellet	42 días FW 63 días SW jaulas de 12 m ³	Mortalidad(%) SGR (%/día)	20.3 1.10	18.8 1.22	NS <math><0.05</math>	-7 % +11 %
RBT Noruega	51% PC 21% Grasa Extruído	62 días FW 132 días SW tanques 1 m ³	Mortalidad(%) SGR (%/día)	42.9 0.74	20.2 0.85	<math><0.05</math> <math><0.05</math>	-53 % +14 %
COS Chile	48%-43% PC 15-18% Grasa Extruído	45 días FW 30 días SW jaulas de 9 m ³	Mortalidad(%)* SGR (%/día)* FCR* *= ₂	1.5 1.64 1.86	0.4 1.79 1.72	<math><0.05</math> <math><0.05</math> NS	-73 % + 9 % +8 %

ATS= Salmón del Atlántico, CHS= Salmón Chinook, RBT=Trucha Arco iris, COS Salmón Coho, FW= Agua Dulce, SW= agua marina, SGR= Tasa de crecimiento específica, FCR= Factor de conversión alimenticia, Finnstim contiene >90% de Betaina. Fuente : Finnsugar Bioproducts, 1996a

No ha sido confirmado si el camarón puede utilizar la betaina dietética tan bien como el salmón para propósitos osmoreguladores. Sin embargo, en otros crustáceos como el cangrejo (*Limulus polyphemus*), la betaina ha mostrado ser un osmolito crítico en los mecanismos osmoreguladores de estas especies (Dragolovich & Pierce, 1992). Niveles significantes de betaina pueden ser encontrados también en los tejidos de camarones marinos y otros crustáceos, especialmente en *Artemia salina*, la cual crece en condiciones hipersalinas (Valdéz

Martínez, 1983). El hecho de que el camarón y los crustáceos sean altamente atraídos por la betaina (ver próxima sección), puede estar relacionado con su importancia como metabolito. Es sin embargo razonable asumir que la betaina también juega un papel importante en la osmoregulación de camarones marinos. En realidad durante condiciones de estrés hiperosmótico, se ha observado que el nivel de aminoácidos libres y componentes relacionados en la hemolinfa del camarón se incrementan; probablemente para mantener el balance osmótico (Dalla Via 1986a). El mismo autor (Dalla Via, 1986b) también infirió que el camarón usa más energía para mantener el balance iónico durante la osmoregulación cuando está en agua completamente marina. Además, durante los estadios de muda, debido al incremento de permeabilidad del exoesqueleto, el camarón puede ser altamente sensible al estrés osmótico y puede beneficiarse del complemento de betaina dietética. Varias pruebas realizadas por Bioproductos Finnsugar bajo condiciones moderadamente elevadas de salinidad o incrementando salinidades, han demostrado que alimentar camarones con Finnstim resulta en un incremento en el crecimiento y eficiencia alimenticia (Finnsugar Bioproducts, 1996). Entre esas pruebas, el efecto osmoprotector de la betaina en camarón pudo ser mejor puesto en evidencia en una de las pruebas conducidas en la estación de investigación de la universidad de Chulalongkorn. En este ensayo, la salinidad bajo la cual *Penaeus monodon* fue creciendo, se incrementó de 20 a 30 partes por mil. Los camarones fueron alimentados con dos dietas básicas diferentes: una dieta a base de proteína de origen vegetal y una dieta más palatable, a base de proteína marina. Ambas dietas básicas fueron suplementadas con varios niveles del aditivo alimenticio rico en betaina: Finnstim. La inclusión de Finnstim en la dieta de palatabilidad más alta mejoró el crecimiento y la eficiencia alimenticia de manera proporcionalmente mayor que en los camarones alimentados con la dieta de menor palatabilidad. A pesar de que otros factores pudieron haber influido, tal como un insuficiente potencial de crecimiento con la dieta a base de proteína vegetal, estos resultados sugieren que el incremento en el crecimiento se dio más por las propiedades osmoprotectoras y metabólicas de la betaina, que por su efecto de aumentar la palatabilidad. Penaflores y Virtanen (1996) hacen conclusiones similares al observar mejor crecimiento y tasa de conversión alimenticia cuando incluyeron Finnstim en dietas con alto contenido de proteína vegetal para *Penaeus monodon*.

3. Papel de la betaina como attractante.

El papel de la betaina como attractante ha sido probablemente la primera aplicación de la betaina en dietas para acuicultura, con reportes desde 1968 (Hashimoto et al. 1968). En una muy buena revisión de sustancias reportadas como attractantes y con propiedades de estimulación alimenticia para peces, Carr *et al.* (1996) encontraron reportes que mencionan que la betaina tiene un efecto positivo sobre no menos de 12 especies, desde salmonidos a anguilas y un número de especies marinas, incluyendo a la brema roja, el botete y el lenguado. Nuestra revisión también añadió unas cuantas especies más de peces y camarones de importancia comercial (Tabla 3). El hecho de que la betaina este presente en niveles significativos en muchos invertebrados marinos, los cuales son alimento de aquellos peces y camarones, puede explicar en gran medida la propiedad de la betaina de mejorar la palatabilidad. La betaina también ha demostrado ser una de las únicas sustancias probadas que pueden ser detectadas y disparar un comportamiento alimenticio en el camarón, después de ser diluida a una concentración tan baja como de 10^{-6} M (Harpaz *et al.* 1987). El Jurel aleta amarilla y el botete también han sido vigorizados y se ha reportado que han sido positivamente y específicamente activados por la betaina (Zeng et Hidaka 1990 ; Kiyohara et Hidaka 1991). Debe notarse que en muchos estudios la betaina ha demostrado tener un efecto sinérgico

cuando es mezclada con otros aminoácidos tales como glicina o alanina, u otros metabolitos de pequeño peso molecular, con mejor atractabilidad que cualquiera de los componentes simples de la mezcla (Goh et Tamura 1980a,b ; Takaoka *et al.* 1995 ; Carr *et al.* 1996). Un interesante estudio realizado por Goh y Tamura (1980a) demostró que la mezcla de betaina + aminoácidos fue más atractiva para la lisa y la brema roja (*Chrysophris major*) que los componentes solos.

Tabla 3. *Betaina: Un efectivo estimulante/atractante para muchas especies de peces y crustáceos de importancia para la acuicultura.*

Grupo	Especies	Estimulación Alimenticia, Atractantes	Otros Efectos	Referencias
1. Peces			Mejora:	
1.1 Peces marinos				
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	SM*	Crecimiento	Polat & Beklevit 1998 ; García-Alcazar 1994.
Brema roja	<i>Chrysophris major</i>	M,S	N.E.	Goh & Tamura 1980 a,b.
Botete	<i>Fugu pardialis</i>	S	N.E.	Oshugi <i>et al.</i> 1978 ; Kiyohara & Hidaka 1991.
Jurel	<i>Seriola quinqueradiata</i>	S	N.E.	Hidaka & al 1985 ; Zeng & Hidaka, 1990.
Lenguado	<i>Solea solea</i>	S,M	Crecimiento, Sobrevivencia	Mackie y Al 1980, Metailler y Al 1983, Roa y Al 1982.
Gurrubata	<i>Scophthalmus maximus</i>	S	Crecimiento	Danielssen y Gulbrandsen 1987
Lisa	<i>Mugil cephalus</i>	S,M	N.E.	Goh y Tamura, 1980 ^a .
Lenguado	<i>Pleuronectes platessa</i>	M	N.E.	Carr <i>et al</i> 1996.
1.2 Salmonidos				
Trucha Arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	M*	Crecimiento, FCR, Sobrev. Osmoreg.	Koskela <i>et al.</i> 1992, Finnsugar Bioproducts 1996 ^a .
Salmón Chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	M*	Crecimiento, Osmoreg.	Clarke <i>et al.</i> 1994
Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>	M*	Crecimiento, FCR, Sobrev., Osmoreg.	Prendergast <i>et al.</i> 1994, Virtanen <i>et al.</i> 1989.
1.3 Otros				
Anguila japonesa	<i>Anguilla japonica</i>	S,M	N.E.	Takeda y Al 1984, Carr <i>et al</i> 1996.
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i>	M	N.E.	Mackie y Mitchell 1983.
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	S	Crecimiento	Saglio y Blanc 1983, Reg. Aquac. Bureau Beijing, 1995.
2. Crustáceos				
Camarón tigre	<i>Penaeus monodon</i>	S,M,M*	Crecimiento, FCR	Coman <i>et al.</i> 1996, Penafiorida & Virtanen 1996.
Camarón Kuruma	<i>Penaeus japonicus</i>	M	Crecimiento	Deshimaru & Yone 1978, Teshimna <i>et al.</i> 1993.
Camarón gigante de agua dulce	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	S	Crecimiento	Harpaz <i>et al</i> 1987, Harpaz & Steiner 1990, Harpaz, 1990.
Langosta	<i>Panulirus argus</i>	M	N.E.	Lynn <i>et al.</i> 1994.
Otros camarones marinos	<i>Palaemonetes pugio</i> <i>Penaeus chinensis</i>	S,M S	N.E. N.E.	Carr 1978, Carr <i>et al</i> 1984. Nansheng 1996.

Leyendas: S = Betaina probada como atractante individual, estimulante alimenticio, M = betaina probada en mezcla, M* betaina probada en mezcal comercial: Finnstim = 93% betaina + 3 % mezcla de L-aminoácidos. N.E. = no evaluado. FCR = Factor de Conversión Alimenticia.

En Finnstim, el aditivo comercial, la pequeña inclusión de L-amino ácidos puede mejorar significativamente las propiedades de palatabilidad del componente principal: betaina. Finnstim, verdaderamente ha demostrado ser un buen estimulante alimenticio, ha mejorado el crecimiento y la eficiencia alimenticia cuando se suplementa en dietas comerciales para trucha, salmones del Atlántico y del Pacífico, así como para camarón. El actual estancamiento y/o caída de la captura de peces silvestres ha dado como resultado una gran escasez de harina de pescado, mientras que la demanda aumenta por parte de la industria alimenticia para acuicultura, esto puede llegar a ser crítico lo que hace necesario encontrar fuentes alternativas de proteína. Debido a la amplia disponibilidad y comparativamente mas bajo costo de los productos de origen vegetal, son interesantes candidatos para reemplazar la harina de pescado. Sin embargo, la pobre palatabilidad es a menudo un obstáculo para su más amplio uso. Experimentos han demostrado que añadiendo Finnstim en dietas de camarón con alta base de proteínas puede significativamente mejorar el crecimiento y la eficacia alimenticia a niveles comparables con aquellos logrados con inclusiones altas de proteínas marinas de excelente calidad (Fig. 4).

En el salmón del Atlántico, Prendergast *et al.* (1994) reportaron que Finnstim fue crítico para ayudar a la dieta utilizada, ya que toda la harina de pescado fue reemplazada por canola desfitinizada. El Finnstim tuvo una eficiencia tan buena como la dieta control que contenía harina de arenque secada con vapor indirecto Norse LT-94 aportando 59% de la proteína dietética. Se debe resaltar que el origen de la betaina parece ser crítico; en todos los ensayos alimenticios arriba mencionados para salmón y trucha fue utilizada betaina natural, la cual es altamente palatable, mientras que Hughes (1993) encontró que la forma sintética, betaina hidrociorada, tuvo un efecto significativamente negativo sobre el consumo de alimento, cuando se añadió al 1% en la dieta de pececillos de el salmón chinook. Ellos concluyeron, confirmando las afirmaciones preliminares de Rumsey (datos no publicados), que la betaina natural es la forma con propiedades atractantes para el salmón. Debería notarse también que como el cloruro de colina, el componente hidrociorado de la forma sintética debería tener un efecto negativo sobre la estabilidad de vitaminas (Cullin, 1985 ; Virtanen datos no publicados). Otro interesante ensayo a nivel comercial se realizó con trucha arco iris, engordándola en aguas salobres (20 ppmil), mostrando que un alto contenido de proteína vegetal en una dieta extruída con un bajo contenido proteínico (42% PC, 20% grasas), pero suplementada con 1% de Finnstim, tuvo mejor eficiencia que una dieta peletizada, más palatable con 52% PC (18% grasas) y una más alta inclusión de harina de pescado y proteína animal, dando 9.5% más de biomasa viva ganada y 8% menos de factor de conversión alimenticio (Finnsugar Bioproducts 1996a) (Tab.4). Sin embargo, por la naturaleza del diseño experimental del ensayo, el efecto positivo observado no podría ser atribuido enteramente a la suplementación de Finnstim, esto claramente viene en gran parte de la combinación de las propiedades atractantes y osmo reguladoras de la betaina suplementada.

4.Funciones de la Betaina como Donador de Metilo y Factor Litotrófico.

La betaina juega un papel importante en el metabolismo celular. Este lleva tres grupos metilo y da como resultado un importante donador de grupos metilo en la célula, particularmente en la metilación de la homocisteina para metionina (Virtanen & Rumsey, 1996).

Después de que ha mudado este grupo metilo y ha sido convertido a dimetilglicina, este puede dar dos grupos metilo más, cuando es convertido sucesivamente a N-metilglicina y glicina (Fig. 5).

Tabla 4. Efecto de la suplementación de betaina como estimulante alimenticio sobre el crecimiento y conversión alimenticia (FCA) de la trucha alimentada con una dieta baja en harina de pescado y proteína animal.

		SGR	Ganancia en biomasa Vivo (kg)	FCA (prod.)
Control 1 (Alta proteína)	Jaula 1	0.70	419	1.64
	Jaula 2	0.66	340	2.04
Control 2 (Baja proteína)	Jaula 1	0.59	299	2.07
	Jaula 2	0.58	296	1.86
Control 2 + Finnstim	Jaula 1	0.66	363	1.73
	Jaula 2	0.64	380	1.68

Condiciones experimentales: Seis estanques de 18 m² fueron abastecidos con 434 peces/estanque (726g/pez) y alimentados con una demanda de tres dietas. Cada dieta fue designada en dos estanques. Las tres dietas probadas fueron:

*dieta 1= control 1= alta proteína , alimento peletizado

*dieta 2 = control 2 = baja proteína, alimento extruído

*dieta 3= baja proteína, alimento extruído + 1% Finnstim

Duración: 84 días (10/89 a 01/90). Condiciones del agua: 12.9°, 20 ppt de salinidad

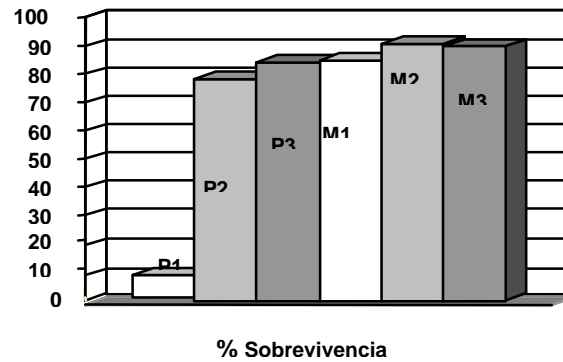
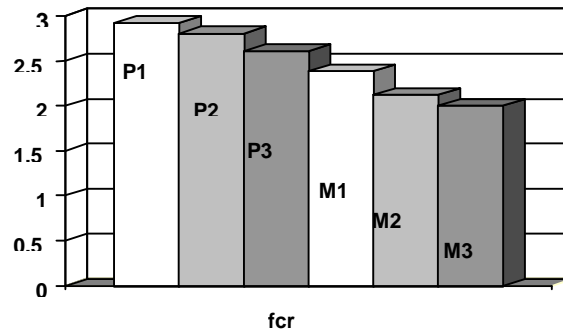
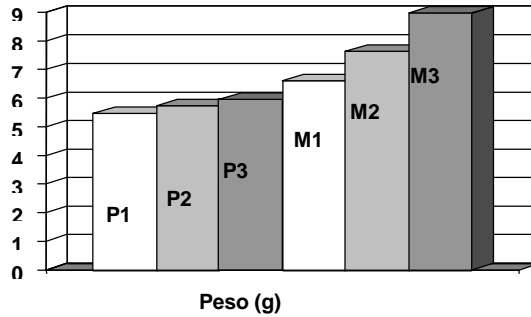
Lugar: Ednster Dvaerket Research Farm, Denmark

Conclusión: 8% en biomasa viva ganada y 9.5 % mas bajo de FCA cuando se añadió Finnstim a la dieta extruída

Fuente: Guerin, 1998, retomado de Finnsugar Bioproducts, 1996.

Los grupos metilo son necesarios en reacciones críticas tal como la conversión de fosfatidilserina a fosfatidilcolina, la síntesis de colina desde fosfatidil etanolamina, así como la conversión ya mencionada de homocisteína a metionina (Fig 6). Además para la betaina, la metionina es otro donador indirecto, sin embargo menos efectivo que la betaina, cuando es convertido a S-adenosilmetionina, el principal donador de metilos primario en las transmetilaciones que ocurren en el citoplasma celular, mientras la colina puede ser convertida por dos pasos del proceso oxidativo para la betaina y por lo tanto indirectamente llega a ser una fuente de grupos metilos, sin embargo esta conversión es considerada como bastante ineficiente (Virtanen et Rumsey, 1996). Como se mencionó anteriormente, la tasa de conversión de la colina a betaina puede ser altamente variable, con arriba de 5-veces la diferencia del factor observado con las mismas especies expuestas a diferentes ambientes (Pierce et al. 1995).

Aunque la colina no es por sí misma una vitamina, ya que puede ser sintetizada de la fosfatidil etanolamina, se ha observado que con el suplemento de colina en dietas libres de colina muchas especies han sido beneficiadas, y de entrada mejora el crecimiento y la sobrevivencia. Aunque Rumsey (1991) encontró en el caso de la trucha, que la suplementación de betaina no podría remplazar a la colina en dietas deficientes de colina. Él observó que las materias primas suministradas con suficiente colina natural pueden satisfacer los requerimientos esenciales y que algún suplemento de colina debería ser usado principalmente para donación de grupos metilo, a través de la conversión de betaina. El cloruro colina es la fuente usual de colina en dietas de peces y camarones, y ha mostrado tener un efecto negativo sobre la estabilidad de las vitaminas (NRC, 1993 ; Putnam, 1993), y menos efectivo como un donador de metilos, por lo que se recomienda usar la betaina para reemplazar el suplemento de cloruro de colina, cuando los requerimientos dietéticos de colina son ya sustituidos por la materia prima (NRC, 1993; Rumsey, 1991).



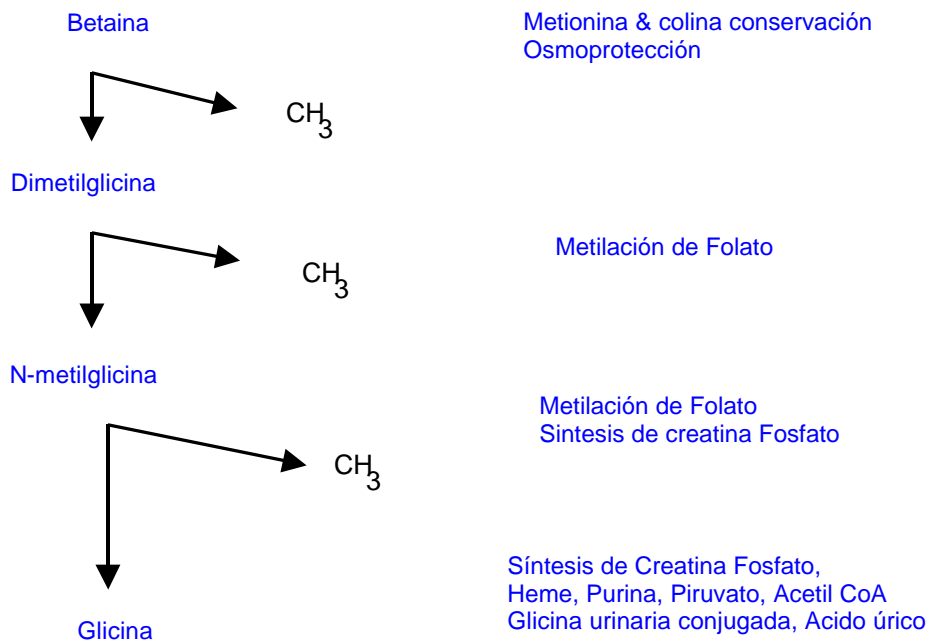
Dietas: base de proteína Vegetal: P4= Control, P2= P1+0.75% Finnstim, P3= P1+ 1.5%. Base de proteína Marina: M1 Control, M2: M1+0.75% Finnstim, M3 M1+1.5 % Finnstim Condiciones de ensayo del camarón: 18 Tanques, 3 réplicas, 10 pc/rep@ 3.5/pc, ocho semanas, alimentación *ad-libitum*. Lugar: Marine Research Station, Chulalongkorn University, Thailand. Composición de las dietas base: P1=20% harina de pescado, 40 % harina de soya, 10% gluten de trigo, 17.3% harina de trigo, 3.0% aceite de pescado, 1.0% lecitina, 0.2% colesterol. M1= 27% harina de pescado, 20% harina de soya, 10% harina de camarón, 5% harina de calamar, 5% gluten de trigo, 20.3% harina de trigo, 3% aceite de pescado, 1% lecitina, 0.2% colesterol.

Fuente: Guerin (1998).

Figura 4. Base del attractante de betaina, Finnstim ayuda a mejorar el desarrollo de las dietas para camarón y compensar la pérdida de rendimiento desde la reducción de harina de pescado y proteína marina en la dieta para camarón.

Metabolismo

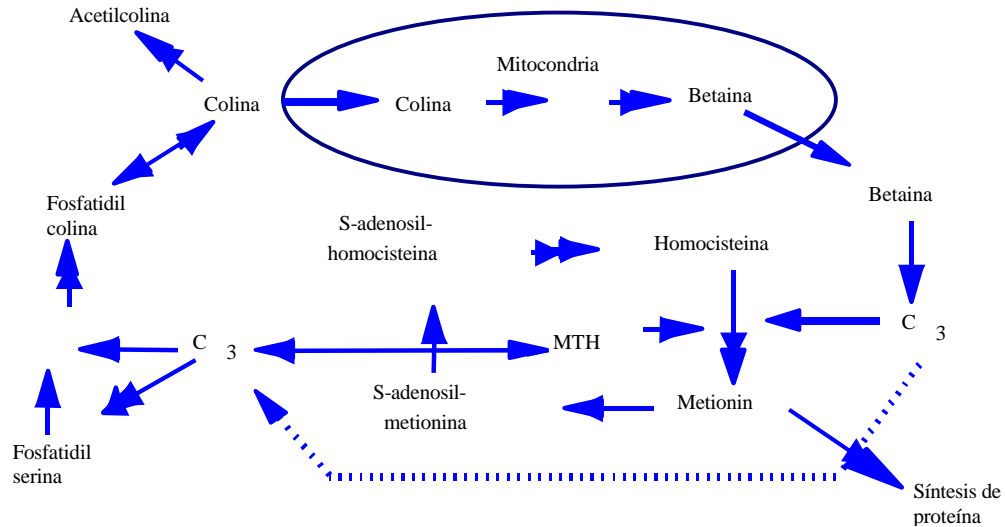
Ejemplo de Funciones



Fuente: Virtanen, datos no publicados

Figura 5. *Funciones metabólicas de la betaina*

Esto es también ampliamente practicado en nutrición de aves (Virtanen y Rumsey, 1996). Similarmente, ha sido sugerido que la betaina podría ser usada para eliminar la metionina en dietas de peces y ayudar a reciclar éste de la homocisteína, en orden para prevenir que sea desviado de esta esencial función para la síntesis de proteína, en aquellas situaciones donde la metionina es convertida a S-adenosil metionina para funciones metilo donadoras. En especies de aves, donde los requerimientos de aminoácidos están muy bien documentadas y el suplemento de metionina cristalina usado rutinariamente en la optimización de la formulación de alimentos, la betaina es verdaderamente a menudo usada en formulaciones prácticas para prescindir de la metionina (Virtanen y Rumsey, 1996).



Fuente: Virtanen y Rumsey, 1996

Figura 6. Relaciones de la colina, la metionina y la betaina

Curiosamente, en la carpa común, un pez que no tiene ningún problema en aceptar cualquier tipo de alimento y que no lo rechaza por estrés osmótico dado que es cultivado en agua dulce, en un experimento realizado en China se ha mostrado que la adición de 0.1% de betaina hidrociorada para 29% CP de la dieta conteniendo 10% harina de pescado, 20% harina de soya, 10% harina de nabo, 35% fécula de maíz, 8% levadura y vitaminas y premezcla de minerales, resultaron en un peso ganado 24% más alto que sin la suplementación de betaina, mientras que incrementando la betaina a 0.2% ó 0.3% casi no tuvo efectos adicionales (Regional Aquaculture Bureau of Beijing City, 1995). Aunque detalles de la premezcla no dieron el contenido de colina del alimento analizado, puede ser razonablemente inferido que el mejoramiento en el funcionamiento del alimento con la suplementación de la betaina viene de sus propiedades donadoras de metilos. También los ensayos con tallas grandes de trucha, creciendo en agua dulce o en muy baja salinidad (aguas salobres), y dietas alimenticias complementadas con Finnstim o no, indican fuertemente que aquellas propiedades metabólicas asociadas con los grupos metilo de la betaina, donde la principal fuente del mejoramiento observado es en crecimiento y eficiencia alimenticia, entonces la propiedades osmoprotectoras y atractantes no fueron evaluadas (Finnsugar Bioproducts 1996a). En el primer experimento realizado en Italia con trucha arco iris de 100g, crecieron en tanques de agua dulce a ca. 370g por 117 días y alimentados con 0, 0.75%, 1% y 1.5% Finnstim añadido a una dieta comercial formulada con una harina de pescado estándar. Todas las dietas suplementadas con Finnstim dieron un crecimiento y eficiencia alimenticia significativamente más alta ($P < 0.05$). Los mejores resultados se lograron con el suplemento de 1% Finnstim el cual dio como resultado un peso ganado 8.6% mayor que el control. Las dietas con Finnstim simples y sin hacer una dieta formulada con una alta digestibilidad LT-harina de pescado.

En el segundo ensayo realizado en Finlandia con trucha creciendo desde 536g a 2070g, en jaulas de talla comercial, a 5 ppmil de salinidad, las dietas suplementadas con Finnstim, mejoraron la producción de peces por unidad de alimento en un 8% (Tab. 5). En este ensayo, fue proporcionalmente menos la deposición de grasa en el abdomen y áreas dorsales que en todo el pez, indicando una mejor movilización de la grasa. Esto puede venir de las propiedades lipotrópicas de la betaina las cuales han sido mucho mejor documentadas en animales terrestres y cerdos, donde los ensayos han mostrado que la suplementación de la betaina en los alimentos para aves y cerdos podría reducir la deposición de grasa en el cuerpo y prevenir el hígado grasoso. El mecanismo exacto de cómo la betaina afecta directamente el esqueleto grasoso calma la necesidad de ser propiamente estudiado, pero esto probablemente viene de esta participación indirecta como donador de metilos en el metabolismo de lípidos y la síntesis de fosfatidilcolina a través de metionina y colina evitando la actividad, tal como en la síntesis de carnitina (Virtanen y Cambell 1994). Algunos de esos resultados de ensayos alimenticios con aves y cerdos han sido ligados a la betaina para mejorar la utilización de la energía en dietas deficientes de energía (Remus, 1998 ; Casarin *et al.* 1997 ; Matthews *et al.* 1997) la cual puede volver a ser ligada a las propiedades lipotrópicas de la betaina, pero esto es comúnmente el resultado de un bajo gasto de energía para osmoregulación debido al efecto osmoprotector de la betaina. Es necesario realizar investigaciones para clarificar el modo exacto de acción, y cómo esto puede ser mejor aplicado en los alimentos acuícolas, pero si se confirman estos datos, esto podría resultar en un ahorro sustancial de costos debido al rápido incremento de costos de la energía dietética proveniente de aceite de pescado o proteínas.

Tabla 5. *Mejoramiento en el aumento de biomasa, conversión alimenticia y repartición de grasa en el esqueleto de la trucha arco iris criada en jaulas con dietas alimenticias prácticas con o sin suplementación de un aditivo a base de betaina.*

Tratamientos		Ganancia en peso (g)	Ganancia en biomasa (Kg.)	Alimento consumido (Kg.)	FCA	Mortalidad (%)
Control	Jaula 1	1533	310.4	449.1	1.447	9.6
	Jaula 2	1540	319.5	461.6	1.445	11.6
Finnstim	Jaula 3	1516	335.5	449.1	1.339	9.2
	Jaula 4	1510	313.4	418.9	1.337	6.4
Tratamientos		Contenido de grasa En el filete (%)	Proporción de grasa totales abdominales	Dorsal/Proporción total de grasas		
Control		9.25	2.53	1.08		
Finnstim (1.5%)		9.97	2.18	0.91		
Significancia		NS	P<0.05	P<0.01		

Condiciones de crianza: Trucha arco iris, agua salobre 5 ppmil, jaulas de 5x5x4, 2 jaulas por dieta, 250 peces/jaula, 537g/peces al inicio. Alimentación manual 2 veces por día basado en la temperatura del agua y talla. Dieta: extruída, 41%CP, 20% grasa, tipo comercial. Lugar: Salmón Research Ltd., Kustavi, Finland. Conclusiones: Finnstim mejoró la producción de peces por unidad alimenticia en 8% y mejoró la distribución de grasas. No se observaron diferencias en las propiedades organolépticas del filete.

Fuente: Finnsugar Bioproducts (1996).

5. Conclusión: Uso de la Betaina en Alimentos Acuícolas – Usos Actuales y Tendencias Futuras

La betaina natural es ampliamente usada en alimentos para acuicultura. La principal aplicación es probablemente para la osmoregulación en dietas de transferencia para salmón, con inclusiones prácticas variando de 0.5% a 1%, aunque en los niveles comerciales pueden encontrarse tan altas como 1.5%. Es claro que con la rápida expansión de las granjas de peces marinos en Europa y Asia, y un continuo progreso de las granjas de camarón, hay aun libertad para extender la aplicación de las propiedades osmoprotectoras de la betaina a esas especies, especialmente porque en muchos casos la betaina ya es usada en las dietas tanto por su capacidad de sustituir a la colina, como por sus propiedades atractantes. Para estas aplicaciones, las inclusiones tienden a ser bajas (0.1% a 0.3%), aunque si se usa la betaina solo como attractante, se deba quizá añadir arriba de 0.5-1.0%, especialmente en alimentos de iniciación. En los casos donde la betaina puede escasear, la colina es usada para la donación de grupos metilo; se ha calculado que 1 kg de betaina pura puede reemplazar 3.5 kg. de cloruro de colina 60%, lo cual en muchos casos llega a ser conveniente en la relación costo-eficiencia, si se toma en cuenta que hay un menor deterioro de las vitaminas y una mejor palatabilidad (Finnsugar Bioproducts 1998).

Debido a la falta de abastecimiento de harina de pescado y al incremento en la demanda de fuentes de proteína de alta calidad, el rápido incremento de los precios de la harina de pescado esta forzando a los formuladores de alimentos acuícolas a buscar fuentes alternativas de proteínas, especialmente proteínas de origen vegetal. Esto debería resultar en un aumento en la necesidad suplementar las dietas con atractantes y aminoácidos cristalinos esenciales, tal como la metionina. En estos casos, debido al efecto de ahorro de metionina en presencia de betaina, a su buena palatabilidad y sinergia con otros atractantes, la betaina puede ser un buen complemento para proteínas de origen vegetal.

Finalmente, los efectos potenciales de la betaina sobre las grasas del cuerpo en peces y el ahorro de energía en la dieta, probablemente llegará a ser una importante aplicación, especialmente en un ambiente económico donde tanto la calidad de los peces, como la reducción en los costos de producción, son prioritarios.

Referencias:

- Carr W.E.S.** 1978. Chemoreception in the shrimp, *Palaemonetes pugio*: the role of amino acids and betaine elicitation of a feeding response by extracts. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A, pp127-131.
- Carr W.E.S., J.C. Netherton III, M.L. Milstead.** 1984. Chemoattractants of the shrimp, *Palaemonetes pugio*: variability in responsiveness and the stimulatory capacity of mixtures containing amino acids, quaternary ammonium compounds, purines and other substances. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77(3), pp469-474.
- Carr W.E.S., J.C. Netherton III, R.A. Gleeson, C. Derby.** 1996. Stimulants of feeding behaviour in fish: analyses of tissues of diverse marine organisms. *Biol. Bull.*, 190, pp149-160.
- Casarin A., M. Forat, B.J. Zabarás-Krick.** 1997. Interrelationships between betaine (Betafin-BCR) and level of feed intake on the performance parameters and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *J. Anim.Sci.* 75 (Suppl.1), p75.
- Charest R.P., M. Chenoweth, A. Dunn.** 1998. Metabolism of trimethylamines in kelp bass (*Palabrax clathratus*) and marine and freshwater pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *J. Comp. Physiol. B.*, 158, pp609-619.

- Cho S.Y., J.K. Jeon, S.-Y. Chung, Y.-J. Cha, E.H. Lee.** 1983. The taste compounds of yellowfin puffer, *Fugu xanthopterus* (Temminck et Sclegel). Bull. Natl. Fish. Univ. Busan (Nat.Sci.), 23(1), pp46-51.
- Clarke W.C., E. Virtanen, J. Blackburn, D.A. Higgs.** 1994. Effects of dietary betaine/amino acid additive on growth and seawater adaptation in yearling Chinook salmon. Aquaculture 121, pp137-145.
- Coman G.J., H.Z. Sarac, D.Fielder, M. Thorne.** 1996. Evaluation of crystalline amino acids, betaine and AMP, as food attractants of the giant Tiger prawn (*Penaeus monodon*). Comp. Biochem. Physiol. 113A, pp247-253.
- Cullin A.W.R.** 1985. Vitamin stability, the influence of betaine and choline. Betafin seminar, Finnsugar Bioproducts, Helsinki, Finland.
- Dall W. D.M. Smith.** 1981. Ionic regulation of four species of penaeid prawn. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 55, pp219-232, 1981.
- Dalla Via G.J.** 1986a. Salinity responses of the juvenile Penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. I. Oxygen consumptions and estimations on productivity. Aquaculture, 55, pp297-306.
- Dalla Via G.J.** 1986b. Salinity responses of the juvenile Penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. II. Free amino acids. Aquaculture, 55, pp307-316.
- Danielssen, D.S., K.E. Gulbrandsen.** 1987. Growth rate of turbot and sole fed dry pellets. Aqua Culture Europe 87 Int. Conf. & Exhib., Amsterdam, pp28-29.
- Dragolovich and S.K. Pierce.** 1992. Comparative time courses of inorganic and osmolyte accumulation as horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) adapt to high salinity. Comp.Biochem. Physiol. Vol.102A, No.1, pp 79-84.
- Duston J.** 1993. Effects of dietary betaine and sodium chloride on seawater adaptation in atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 105A., No.4, pp673-677.
- Ferraris R.P., F.D. Parado-Estepa, J.M. Ladja, E.G. De Jesus.** 1986. Effect on salinity on the osmotic, chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). Comp. Biochem. Physiol., 83A, pp701-708.
- Finnsugar Bioproducts.** 1996. The Finnstim briefing. 64p.
- Finnsugar Bioproducts.** 1996. The Betafin briefing. 92p.
- Gabbay-Azaria R., E. Tel-Or, M.Schönfeld.** 1988. Glycinebetaine as an osmoregulant and compatible solute in the Marine Cyanobacterium *Spirulina subsalsa*. Arch. Biochem. Biophys., 264(9), pp333-339.
- Garcia-Alcazar, E. Abellan, M.R.L. Dehesa, M. Arizcun, J. Delgado y A. Ortega.** 1994. Experiencias de alimentación en preengorde y engorde de dorada (*Sparus aurata* L.) y lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) con dietas de distinta relación proteína/grasa. Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 10(2), pp191-201.
- Goh Y., T. Tamura.** 1980a. Olfactory responses to amino acids in two marine teleosts – red seabream and mullet. Comp. Biochem. Physiol., 66C, pp217-224.
- Goh Y., T. Tamura.** 1980b. Effect of amino acids on the feeding behaviour in red sea bream. Comp. Biochem. Physiol., 66C, pp225-229.
- Guérin M.** 1998. Future role and perspectives of feed additives and biotechnologies in aquafeeds: helping the industry move towards sustainable development. Aquaculture 98, Las Vegas, 18/02/98
- Harpaz S.** 1992. Chemoreception in fish and crustaceans and its effect on feeding behaviour and food consumption. Bamidgeh, 44(4), pp 126-127.
- Harpaz S., D.Kahan, R.Galun, I.Moore.** 1987. Responses of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to chemical attractants. J.Chem.Ecol., 13(9), pp1957-1965.
- Harpaz S.** 1990. Analysis of betaine-induced feeding behavior in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)(Decapoda, Caridea). Crustaceana 58(2), pp175-185.
- Hidaka I., T. Ohsugi, Y. Yamamoto.** 1985. Gustatory response in the young yellow tail *Seriola quinqueradiata*. Bull. Jap.Soc.Sci.Fish., 51(1), pp21-24.
- Jeon J.-K., D.-S. Joo, C.-W. Park, H.-T. Huh, E.-Ho. Lee.** 1990. Bull. Korean Fish Soc., 23(4), 334-338.
- Hayashi T., K. Yamaguchi, S. Konosu.** 1978. Studies on flavor components in boiled crabs. 2. Nucleotides and organic bases in the extracts. Bull. Jap.Soc.Sci.Fish., 44(12), pp1357-1362.
- Hughes S.G.** 1993. Single-feeding response of Chinook salmon fry to potential feed intake modifiers. The Progr. Fish-Cult., 55, pp40-42.
- Hughes S.G., G.L. Rumsey.** 1991 Starter salmon diets. Feed management. 42(4), pp58-62.apr.

- Kiyohara S. and I. Hidaka.** 1991. Receptor sites for alanine, proline, and betaine in the palatal taste system of the puffer, *Fugu pardialis*. J. Comp. Physiol. A, 169, pp 523-530.
- Knights B.** 1996. Studies of feeding stimulation in young eels, *Anguilla anguilla* L., before and after first-feeding using a novel rapid-screening method. Aquac. Res., 27, pp379-385.
- Koskela J., J. Pirhonen, E. Virtanen, S.J. Kaushik J., P. Luquet.** 1991. Effects of attractants on feed choice of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. 4. Int. Symp. Fish Nutrition and Feeding. Biarritz (France), june, pp 24-27.
- Lee E.H., B.G. Chung, J.S. Kim, C.B. Ahn, K.S. Oh.** 1989. Studies on the food components of triploid carp muscle. 1. The taste compounds of triploid carp muscle. Bull. Korean Fish. Soc., 22(3), pp154-160.
- Lynn W.H., E. Meyer, C.E. Peppiatt, C.D. Derby.** 1994. Perception of odor mixtures by the spiny lobster *Panulirus argus*. Chemical senses, 19(4), pp331-347.
- Mackie A.M., J.W. Adron and P.T. Grant.** 1980. Chemical nature of feeding stimulants for the juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). J. Fish Biol., 16, pp701-708.
- Mackie A.M., A.I. Mitchell.** 1982. Further studies on the chemical control of feeding behaviour in the Dover sole (*Solea vulgaris*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 73A, No. 1, pp89 to 93, 1982.
- Mackie A.M., A.I. Mitchell.** 1983. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for the juvenile European eel, *Anguilla anguilla* (L.). J. Fish Biol. 22, pp425-430.
- Margolis L.** 1992. The effect of Finnstim on growth and seawater adaptation in yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) smolts. Intl.Salm.Smolt Workshop, 19-23 october, 1992.
- Matthews J.O., L.L. Southern, T.D. Bidner.** 1997. Interactive effects of betaine (Betafin-BCR), crude protein, and net energy on growth, carcass, traits and serum metabolites of gilts. J.Anim. Sci. 75 (Suppl.1) p62, 1997.
- Mearns K.J., O.F. Ellingsen, K.B. Doving, S.Helmer.** 1987. Feeding behaviour in adult rainbow trout and Atlantic salmon parr, elicited by chemical fractions and mixes of compounds identified in shrimp extract. Aquaculture 64, pp47-63.
- Metailler R., M. Cadena-Roa, J. Person-le Ruyet.** 1983. Attractive substances for the weaning of Dover sole (*Solea vulgaris*): qualitative and quantitative approach. J. World Maricul. Soc. 14, pp679-684.
- Nansheng C.** 1995. Chemoreception in the ingestion behavior of juvenile *Penaeus chinensis* Osbeck. Mar.Sci./Haiyang Kexue, 1, pp35-39.
- National Research Council.** 1993. Nutrient requirements of fish. NRC(U.S.), 113pp.
- Ohsugi T., I. Hidaka, M. Ikeda.** 1978 Taste receptor stimulation and feeding behaviour in the puffer, *Fugu pardialis*. II. Effects produced by mixtures of constituents of clam extracts. Chemic. Senses and Flavour. Vol.3, 4, pp355-368.
- Peñaflorida, V.Dy., E. Virtanen.** 1996. Growth, survival and feed conversion of juvenile shrimp (*Penaeus Monodon*) fed a Betaine/Amino Acid additive. The Israel Journal of Aquaculture – Bamidgheh, 48 (1), pp 3-9.
- Pierce S.K., L.M. Rowland-Faux, B.N. Crombie.** 1995. The mechanism of glycine betaine regulation in response to hyperosmotic stress in Oyster Mitochondria: a comparative study of Atlantic and Cheasapeake bay oysters. J.Exp.Zool., 271, pp161-170.
- Polat A. G. Beklevik.** 1998. The importance of betaine and some attractants as fish feed additives. TECAM workshop on aquaculture feed manufacturing practice within the Mediterranean region. 27 march, 1998, Reus, Spain.
- Prendergast A.F., D.A. Higgs, D.M. Beames, Bakhshish S. Dosanjh and Greg Deacon.** 1994. Searching for substitutes: Canola. North. Aquaculture, may-june 1994, pp 15-19.
- Putnam M.** 1983. Feed compounding and vitamin stability. Paper presented at the meeting of the Society of Feed Technologists, York, UK, 1983 (Roche information on Animal Nutrition Events).
- Regional Aquaculture Bureau of Beijing City.** 1995. Effect of betaine and betaine premix supplement in carp feed. China Feed, 10, pp17-18.
- Remus J.** 1998. Betaine in non-ruminant diets. Submitted for publication.
- Roa M.C., C. Huelvan, Y. Le Borgne and R. Metailler.** 1982. Use of rehydratable extruded pellets and attractive substances for the weaning of sole (*Solea vulgaris*). J.World Maricul. Soc., 13, pp246-253.

- Ross B., L. Ross.** 1986. Report on a trial carried out to assess the acceptability of a diet containing a potential feeding stimulant produced by the Finnish Sugar corporation. Nutrition Group report Number 86/BR/101. Unit of aquaculture Nutrition, Institute of Aquaculture, University of Stirling. 15pp.
- Rudolph A., J. Crowe, L. Crowe.** 1986. Effects of three stabilising agents – proline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids. Arch.Biochem.Biophys., 245, pp134-143.
- Rumsey G.** 1991. Choline-betaine requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 95, pp107-116.
- Saglio P., J.-M. Blanc.** 1983. Etude en olfactometre de la réponse comportementale aux L. acides aminés chez le juvénile de carpe, *Cyprinus carpio* L. Biology of Behaviour, 8, pp359-370.
- Santoro M.M., L.Y. Liu, S.M.A. Khan, L-X. Hou, D.W. Bolen.** 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. Biochem. 31(23), pp 5278-5283.
- Takeda M., K. Takii, K. Matsui.** 1984. Identification of feeding stimulants for juvenile eel. Bull. Jap.Soc.Sci.Fish., 59(4), pp645-651.
- Takaoka O., K. Takii, M. Nakamura, H. Kumai, M. Takeda.** 1995. Identification of feeding stimulants for Tiger Puffer. Fisheries Science, 61(5), pp833-836.
- Teshima S.-I., A. Kanazawa, S. Koshio.** 1993. Recent developments in nutrition and microparticulate diets of larval prawns. Israeli J. Aquac. – Bamidgah 45(4), pp175-184.
- Valdez Martinez S.E.** 1983. Simultaneous determination of choline and betaine in some fish materials. Analyst, 108, pp1114-1119.
- Virtanen E. and M. Muona.** 1993. Effect of dimethylglycine (Betaine) on the response of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to experimental *Vibrio anguillarum* infection. Fish & Shellfish Immun., 3, pp439-449.
- Virtanen E. and R. Campbell.** 1994. Reduzierung der Rückenspeckdicke durch Einsatz von Betain bei Mastschweinen (Reduction of backfat thickness through betaine supplementation of diets for fattening pigs). Handbuch der tierischen Veredlung. Verlag H. Kamlage, Osnabruek, Deutschland., 19, pp145-150.
- Virtanen E. and R. Campbell.** 1995. Effects of betaine on methionine requirement of broilers under various environmental conditions. Proc. Austr. Poult. Sci. Sym., 7, pp88-92.
- Virtanen E. and G. Rumsey.** 1996. Betaine supplementation can optimise use of methionine, choline in diets. Feedstuffs., 68(42).
- Virtanen E., M. Junnila and A. Soivio.** 1989. Effects of food containing betaine/amino acid additive on the osmotic adaptation of young Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture, 83 pp109-122.
- Virtanen E., M. Junnila, K.-E. Slinning, and R. Hole.** 1992. Betaine supplementation enhances the seawater adaptation of salmon. Presented at the Cultivation of Atlantic Salmon Symposium. 16-20 august 1992, Bergen, Norway.
- Yancey P.H.** 1992. Compatible and counteracting aspects of organic osmolytes in mammalian kidney cells in vivo and in vitro. In: G.N. Somero, C.B. Osmond and Bolis, (C.L.): Water and life, pp33-51, Berlin/Heidelberg.
- Zeng C. and I. Hidaka.** 1990. Single fiber responses in the palatine taste nerve of the yellow tail *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi, 56(10), 1611-1618.