

# Crecimiento y enzimas digestivas de larvas de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 alimentadas con piensos comerciales

M. Sáenz de Rodrigáñez<sup>1</sup>, C. de Oña<sup>1</sup>, F. J. Alarcón<sup>1</sup>, M. I. Martínez<sup>2</sup>,  
M. Díaz<sup>1</sup> y F. J. Moyano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Aplicada, CITE II-B. Universidad de Almería. Carretera Sacramento, s/n. E-04120 La Cañada de San Urbano (Almería), España. Correo electrónico: falarcon@ual.es

<sup>2</sup> Predomar S.L. Carretera Faro Mesa Roldán, s/n. E-04140 Carboneras (Almería), España.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

## RESUMEN

Se determina el crecimiento y las enzimas digestivas de larvas de lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 destetadas con tres piensos. Las larvas fueron alimentadas con un nivel basal de nauplios de artemia y una cantidad creciente de pienso. Las larvas alimentadas únicamente con presas vivas presentaron mejores crecimientos y supervivencias (140 mg de peso fresco por larva y 97 %, respectivamente) que las coalimentadas con piensos (60 mg de peso fresco por larva y 91 %, respectivamente). La evolución del peso en los tratamientos con pienso no mostró diferencias entre ellos. La mortalidad fue menor entre las larvas alimentadas con artemia, seguidas del tratamiento Gemma, siendo mayor con Microbaq y Aglonorse, en este orden. El patrón de actividades enzimáticas digestivas fue similar en todos los tratamientos. A pesar del menor crecimiento, las larvas desarrollan de forma adecuada sus capacidades digestivas sin que el uso de piensos ocasione modificación alguna en las mismas.

**Palabras clave:** Piensos, destete, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina, amilasa, proteasa ácida, lenguado senegalés.

## ABSTRACT

**Growth and digestive enzymes of *Solea senegalensis* Kaup, 1858 larvae weaned onto different commercial diets**

The optimization of artificial diets in the weaning of the Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup, 1858 is an essential part of improving production and promoting its culture. Feeds are very important in larval digestive development and affect survival after weaning. Some digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin, alkaline phosphatase and leucine aminopeptidase) have been proposed as indicators of the larval nutritional status. In the present study, three commercial aquafeeds (Aglonorse, Microbaq and Gemma) were used in weaning the *S. senegalensis* larvae. Growth, survival and digestive enzymes of larvae reared with the different feeds were compared.

**Keywords:** Aquafeed, weaning, trypsin, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, alkaline phosphatase, acid protease, Senegal sole.

## INTRODUCCIÓN

El lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 es una especie bien adaptada a climas templados. Se cultiva de forma extensiva en estanques de las marismas del sur de la península Ibérica. Debido al continuo incremento de la producción de peces marinos con tecnología ya desarrollada, es necesario disponer en el mercado acuícola de nuevas especies con elevada demanda. El lenguado senegalés se ajusta perfectamente a esta última característica, y el estado actual de su cultivo integral se encuentra próximo a su desarrollo completo (Flos *et al.*, 1995). Se trata de una especie abundante en las regiones del sur de la Península y se distribuye prácticamente a lo largo de todas las costas de ésta, siendo su cultivo abordable en la mayoría de las zonas. La cría larvaria del lenguado se viene realizando con relativo éxito en Andalucía desde hace varios años, aunque aún se necesita mejorar diversos aspectos hasta alcanzar un nivel de desarrollo equiparable al de dorada y lubina. La dificultad para conseguir buenos resultados en la transición de alimento vivo a alimento inerte (destete) en los alevines de lenguado ha sido, desde el comienzo, el principal aspecto limitativo del cultivo integral de esta especie (Dinis *et al.*, 1999). El empleo de alimento vivo determina altos costes en su cultivo larvario, de manera que el adelanto del momento del destete resulta imprescindible para la obtención de mayores beneficios. La calidad del alimento suministrado en esta fase del cultivo larvario es determinante, tanto para un correcto desarrollo de las larvas como para incrementar su posterior supervivencia. En el presente estudio se ha realizado un análisis comparativo de tres piensos comerciales utilizados para el destete de esta especie. Las variables determinadas han sido el crecimiento, la supervivencia y las enzimas digestivas de las larvas de lenguado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivo de larvas

Los huevos de *S. senegalensis* se obtuvieron del IFAPA El Toruño (Cádiz). A los treinta días de

vida, las larvas se distribuyeron en tanques de 1 m<sup>2</sup> y 30 cm de columna de agua. Tras la distribución se realizó un periodo de aclimatación de 15 días alimentándolas exclusivamente con nauplios de artemia. En cada tanque se distribuyeron 3 100 larvas y cada tratamiento se realizó por triplicado. El periodo experimental se inició desde el día 45 hasta el 105 del cultivo larvario. Se incluyó un tratamiento control con larvas alimentadas únicamente con presas vivas hasta el momento del destete total, que se realizó a los 100 días del cultivo larvario en todos los tratamientos. Durante el periodo experimental, las larvas fueron coalimentadas con los piensos Aglonorse (Fiskeriforsking, Noruega) (59 % proteína y 21 % lípidos), Microbaq (Dibaq-Diproteg, España) (64 % proteína y 8 % lípidos) y Gemma (Skretting, España) (58 % proteína y 17 % grasa) y un nivel basal constante de nauplios de artemia ( $1,2 \times 10^6$  nauplios/tanque). La cantidad de pienso se incrementó progresivamente desde 0,5 g/día en el día 45 (25 % del alimento total suministrado) hasta 8 g/día en el día 100 de cultivo (100 % del alimento ingerido). Durante el periodo experimental se controló dos veces al día la temperatura, la salinidad y el oxígeno en los tanques. Las larvas fueron alimentadas mediante tres tomas diarias: a las 8:00 h (pienso, salvo para los tanques de control), a las 12:00 h (nauplios de artemia) y a las 16:00 h (pienso, salvo en el control). Los fondos de los tanques fueron sifonados todos los días y las larvas muertas fueron retiradas y contadas para determinar la mortalidad.

### Preparación de muestras

Antes de suministrar el alimento, en los días 46, 51, 61, 71, 81 y 88 de cultivo se tomaron muestras de larvas para determinar el peso (60 individuos por tratamiento) y para los análisis bioquímicos (30 larvas por tratamiento). Las larvas fueron lavadas con agua destilada y secadas antes de ser pesadas en fresco. Posteriormente se congelaron individualmente a -40 °C, se liofilizaron y se determinó su peso seco. Para el análisis bioquímico se prepararon extractos individuales de los paquetes digestivos en agua destilada (35 mg/ml). La cuantificación de las proteasas

ácidas totales y de las  $\alpha$ -amilasas se realizó con extractos preparados a partir de varios paquetes digestivos.

### Métodos analíticos

La actividad tripsina y quimotripsina de los extractos larvarios individualizados se determinó utilizando como sustratos Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-Metilcumarina y N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amido-4-Metilcumarina, respectivamente, utilizando una modificación del método desarrollado por Ueberschär (1988). Se añadieron 10  $\mu$ l de extracto enzimático a 190  $\mu$ l de una solución 20  $\mu$ M de sustrato tamponada a pH: 8,0 con tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>. La fluorescencia de la muestra debida a la hidrólisis del sustrato se cuantificó en un fluorímetro (VersaFluor™, Bio Rad, Richmond, CA) a 380 nm y 440 nm como longitudes de onda de excitación y absorción, respectivamente. Una unidad corresponde a 1 ufr (unidad de fluorescencia relativa) por min. La actividad leucina aminopeptidasa se cuantificó usando el método modificado de Pfeiderer (1970). La actividad fosfatasa alcalina se midió a pH:9,8, siguiendo el método descrito por Bergmeyer (1974), usando 4-nitrophenol como sustrato. La actividad  $\alpha$ -amilasa fue estimada usando el método de Somogy-Nelson según el procedimiento descrito por Robyt y Whelan (1968). La actividad proteasa ácida se determinó, según la metodología de Anson (1938), con hemoglobina al 0,5 % en tampón glicina-HCl 0,1M pH:2,0 como sustrato. La actividad de las diferentes enzimas ensayadas se expresó en unidades (u), o en miliunidades (mu), por mg de digestivo (u/mg digestivo o mu/mg digestivo). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y las medias fueron comparadas con un análisis de varianza seguido de un test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento y supervivencia

La evolución del peso de las larvas de lengua coalimentadas con los distintos piensos y las

del tratamiento de control se muestran en la figura 1a,b. En general, pudo comprobarse un incremento progresivo del peso de las larvas a medida que aumentaba la edad de las mismas, tanto al expresarlo en peso fresco como en peso seco. Este incremento fue significativamente mayor en las larvas alimentadas sólo con nauplios de artemia a partir de los 60 días de edad (momento en que en los otros tratamientos ya habían transcurrido 10 días consumiendo los piensos de destete). Igualmente, desde el día 81 al 88 se observó una disminución significativa del peso fresco en las larvas que estaban consumiendo los piensos de destete ( $p < 0,05$ ), mientras que las larvas del tratamiento control siguieron incrementando su peso (figura 1a). Los valores en peso seco (figura 1b) mostraron una tendencia muy similar a la descrita para el peso fresco, si bien, en este caso, no se aprecia tan claramente la pérdida de peso en el último día analizado. Al comparar entre los tres piensos, se comprobó que el peso medio de las larvas que ingirieron Gemma fue mayor, aunque sin presentar diferencias significativas con las otras dos fórmulas ( $p > 0,05$ ).

Las larvas de *S. senegalensis* alimentadas con piensos se adaptaron al consumo de éstos al final del experimento, pero las larvas alimentadas con artemia presentaron mayores valores de crecimiento y supervivencia. La disminución de la tasa de crecimiento en los peces coalimentados con pienso fue mucho más evidente a los 71 días de vida, momento en que el alimento inerte constituía el 52 % de la ración diaria. Este hecho pudo deberse a que las larvas tuvieran cierta dificultad para aceptar el pienso, o a que la cantidad de artemia suministrada no cubriera por completo sus necesidades nutritivas, o a ambas causas simultáneamente. En el día 88, las larvas alimentadas exclusivamente con presas vivas presentaron un peso fresco 2,3 veces mayor que las larvas coalimentadas con piensos. Los resultados obtenidos concuerdan con los descritos para esta misma especie por otros autores, en los que se pone de manifiesto que la utilización de alimento inerte en lugar de presas vivas determina menores crecimientos en el cultivo larvario (Marín-Magán, Anguis y Cañavate, 1995; Ribeiro *et al.*, 2002). Al comparar entre los piensos comerciales no se observaron diferencias signifi-

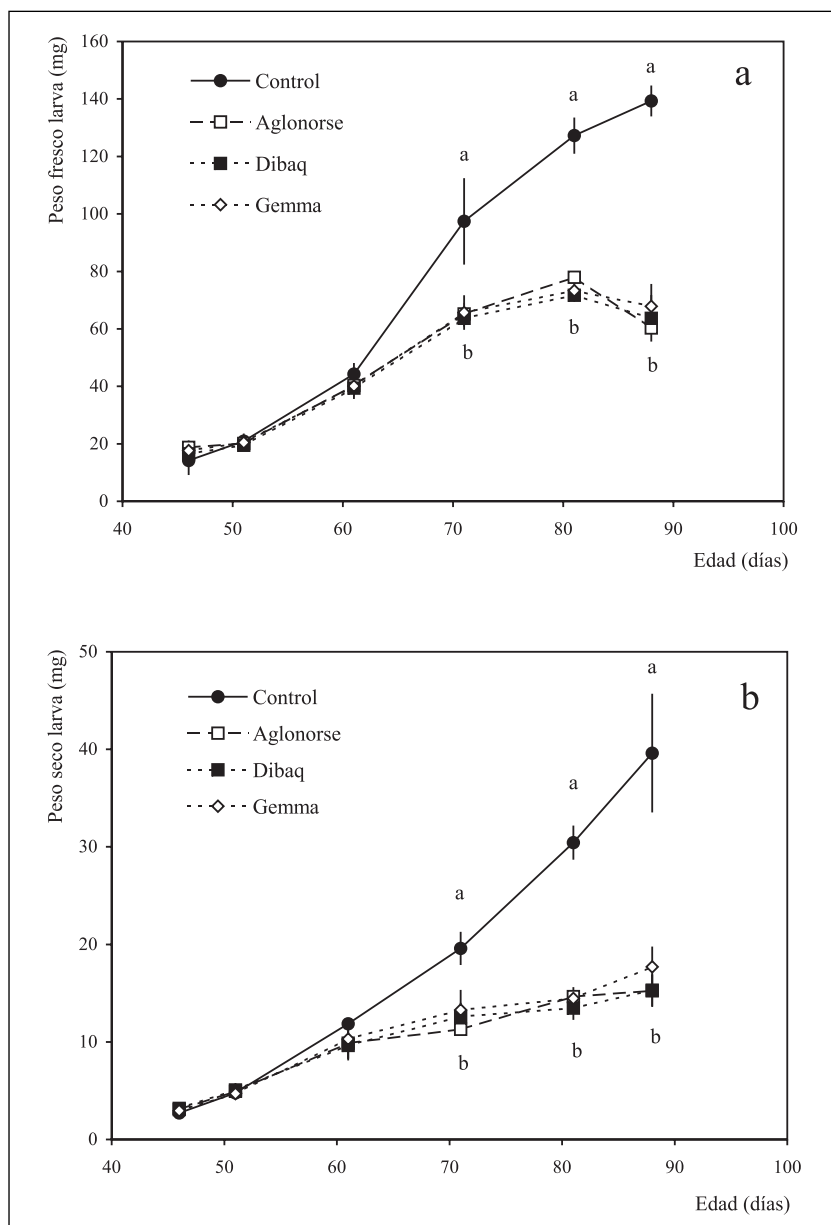


Figura 1. Evolución del peso fresco (a) y seco (b) de las larvas de lenguado durante el bioensayo. El valor representa la media del peso de 60 larvas. Para un mismo día, los valores con diferentes índices muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

cativas entre ellos, ya que las larvas mostraron el mismo peso final.

Las observaciones realizadas durante el cultivo confirmaron que las larvas consumían los tres piensos comerciales, puesto que presentaban sus paquetes digestivos llenos de alimento. Las tasas de supervivencia a los 90 días (tabla I) fueron similares en todos los tratamientos (desde el 88 % para Aglonorse hasta el 97 % en el tratamiento de control). Sin embargo, a los 105 días de cultivo (5 días después de realizar el destete total), los valores fueron significativamente superiores para el tratamiento de control (61 %) en relación con Gemma (52 %). Para los

otros dos piensos la supervivencia al final del bioensayo fue del 26 %.

Como se ha indicado anteriormente, el valor de supervivencia para Gemma fue del 52 %, dato muy próximo al descrito por otros autores para el lenguado senegalés. Así, por ejemplo, Engrola, Conceição y Dinis (2001) obtuvieron porcentajes comprendidos entre el 45 y el 70 % a los 69 días del cultivo con larvas destetadas totalmente a los 40 días de vida. Por su parte, Ribeiro *et al.* (2002) obtuvieron el 58 % a los 82 días de cultivo larvario al destetar a los 56 días después de la eclosión. El bajo valor de supervivencia obtenido para Aglonorse en este estudio,

Tabla I. Tasas de supervivencia (%) de las larvas de lenguado senegalés durante el bioensayo con piensos de destete. Los valores representan la media  $\pm$  d.e. obtenida a partir de tres tanques por tratamiento. Los diferentes superíndices para una misma edad de las larvas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Edad de la larva (días)	Tratamiento			
	Control	Aglonorse	Dibaq	Gemma
90	97 $\pm$ 5 <sup>(a)</sup>	88 $\pm$ 7 <sup>(a)</sup>	92 $\pm$ 2 <sup>(a)</sup>	93 $\pm$ 3 <sup>(a)</sup>
105	61 $\pm$ 4 <sup>(a)</sup>	26 $\pm$ 7 <sup>(b)</sup>	26 $\pm$ 18 <sup>(b)</sup>	52 $\pm$ 11 <sup>(a,b)</sup>

en comparación con el descrito por Engrola, Conceição y Dinis (2001), puede deberse a que se evaluó la supervivencia en distintos momentos: a los 59 y a los 29 días, respectivamente. Así, el desfase de 30 días en la estimación de la tasa de supervivencia entre ambos estudios para el mismo pienso, puede haber determinado que la mortalidad acumulada sea mayor en el presente estudio.

### Actividades enzimáticas

Además de los registros zootécnicos anteriores, se han utilizado como indicadores del estado de condición de las larvas los niveles de actividad de varias enzimas digestivas (Lemieux, Blier y Dutil, 1999). El análisis de las enzimas digestivas se ha enfocado con tres perspectivas distintas: 1) las actividades tripsina y quimotripsina como indicadores de la capacidad digestiva de la larva; 2) las actividades aminopeptidasa y fosfatasa alcalina como indicadores de la funcionalidad del epitelio intestinal; y 3) las actividades amilasa y proteasa ácida como indicadores de una adecuada adaptación a la dieta inerte.

La evolución de las actividades tripsina y quimotripsina mostró una disminución progresiva a medida que aumentaba la edad del cultivo larvario (figura 2a,b). Para ambas actividades, los niveles más bajos se obtuvieron en los tanques de control (alimentados sólo con presas vivas), aunque sin mostrar diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, debido a la alta variabilidad de los valores dentro de un mismo tanque. Los resultados obtenidos muestran que en los tres primeros puntos analizados (días 46, 51 y 61 del cultivo), los niveles de actividad de todos los tratamientos son bastante heterogéneos. Para la tripsina, los valores medios oscilaron

entre 200 y 700 u/mg digestivo, mientras que para la quimotripsina fueron de 25 a 125 u/mg digestivo. Este hecho resulta llamativo si se tiene en cuenta que en ese intervalo de tiempo las larvas consumían el mismo alimento (a los 51 días se alimentaron con el 25 % de pienso de destete y el 75 % de nauplios de artemia). Esta alta heterogeneidad en las determinaciones ha sido también constatada en otras especies de peces, especialmente cuando se analiza la actividad enzimática digestiva de las larvas de forma individual (Ueberschär, 1988). Además, los valores medios de las larvas alimentadas sólo con presas vivas resultaron ser más bajos que en los otros tres tratamientos ( $p < 0,05$ ). Este incremento aparente de la actividad proteolítica en las larvas coalimentadas con pienso pudo deberse a una inducción enzimática ocasionada por el alto contenido proteínico de las fórmulas de destete. De acuerdo con Tseng, Grendell y Rothman (1982), un alto contenido en proteína en el alimento induciría a una mayor secreción de proteasas digestivas por parte de la larva. A pesar de la variabilidad inicial ya indicada, a partir de los 61 días de cultivo se observó que los valores medios de actividad disminuyeron de forma progresiva, y que, simultáneamente, se redujo de manera apreciable la dispersión entre las larvas del mismo tratamiento. En todo momento, sobre todo para la actividad tripsina, los valores medios fueron significativamente mayores en las larvas que consumieron piensos. La secreción menor de proteasas en las larvas del tratamiento de control pudo deberse a una secreción menor de proteasas por las larvas, o bien a que el alimento inerte, como ya se ha indicado, podría haber inducido a una secreción mayor de estas enzimas en las larvas de los tratamientos que incluían pienso.

En la figura 3a,b se muestra la evolución de las actividades leucina aminopeptidasa y fosfatasa

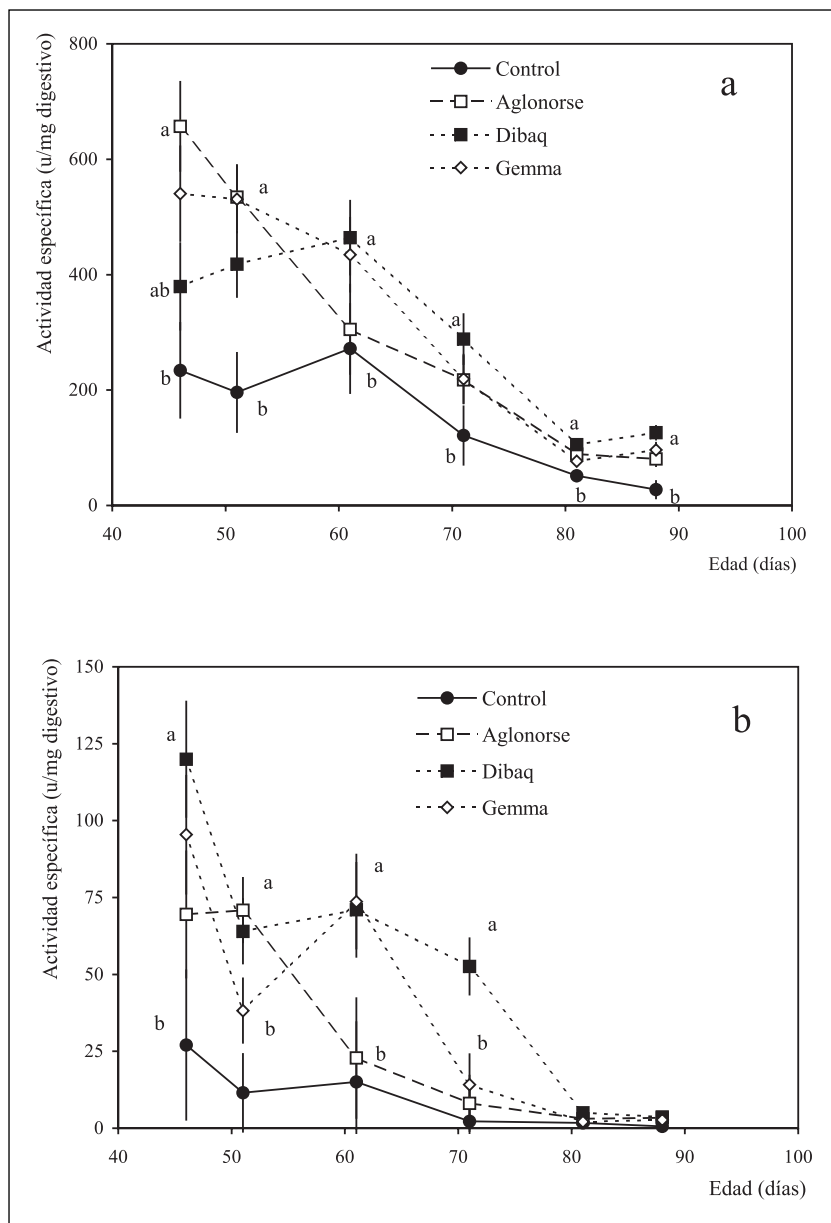


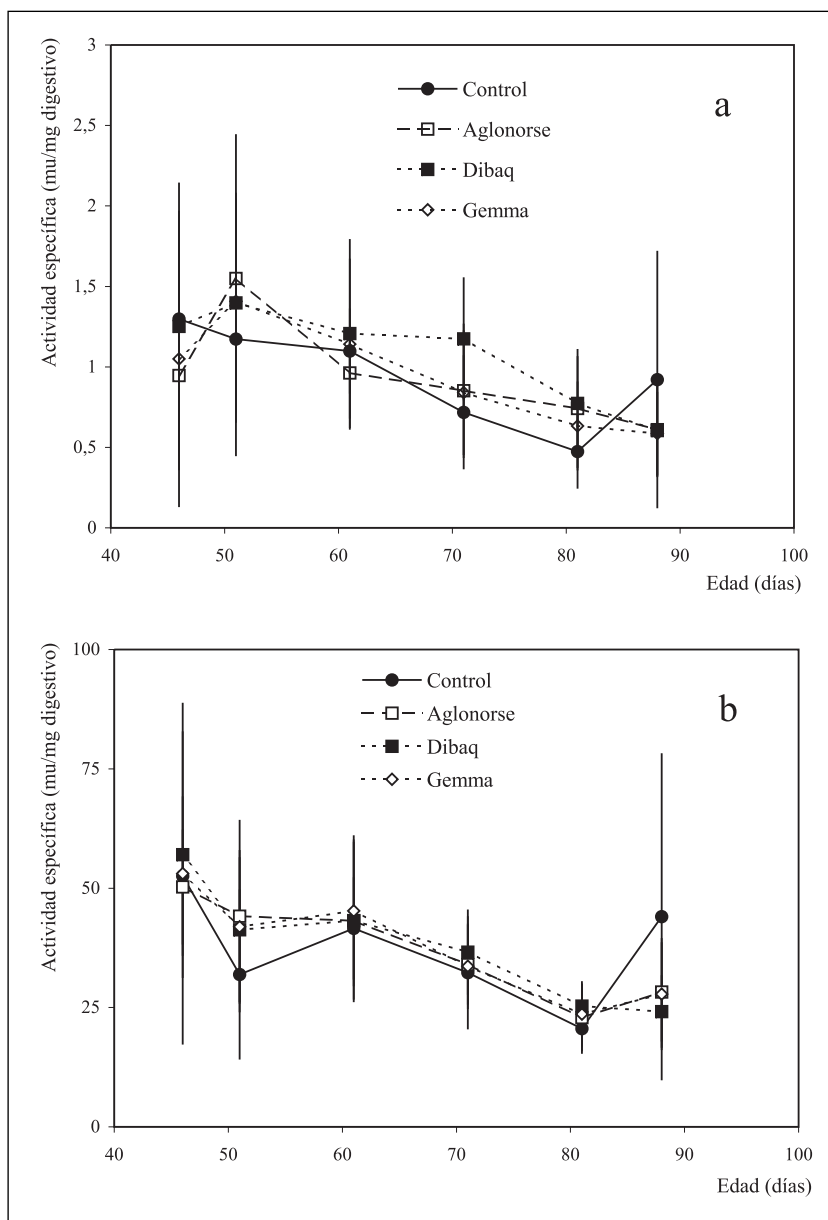
Figura 2. Actividades proteolíticas, expresadas en unidades/mg de digestivo, en larvas de lenguado alimentadas con distintos piensos comerciales. (a): tripsina; (b): quimotripsina. Los valores son la media  $\pm$  d.e. de la determinación realizada en 30 larvas. Diferentes letras para una misma edad indican diferencias significativas entre los tratamientos  $p < 0,05$ ).

alcalina. En este caso se comprobó que no existían diferencias significativas en ninguno de los tratamientos a lo largo del periodo de tiempo analizado. No obstante, se apreció una ligera disminución en el nivel basal de estas enzimas cercano al día 60 de cultivo, aunque sin presentar diferencias significativas con los otros días considerados. Las actividades leucina-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina se utilizan como indicadores de funcionalidad del epitelio intestinal y están relacionadas con los procesos de absorción y transporte a través de membrana (Smith, 1992; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Sin embargo, en el presente estudio no se han encontrado

diferencias en relación con éstas para ninguno de los tratamientos. Los valores medios permanecieron prácticamente constantes en todo el periodo estudiado, aunque mostraron una gran variabilidad interindividual. En comparación con las del control, las larvas coalimentadas con piensos presentaron perfiles enzimáticos similares, lo que indica que la sustitución del alimento vivo por inerte no parece modificar del patrón de estas enzimas.

Para la actividad  $\alpha$ -amilasa se comprobó, en todos los casos, una ligera subida cercana al día 60 y una caída progresiva hacia el final del ensayo (figura 4a). En cuanto a la proteasa ácida,

Figura 3. Actividades leucina aminopeptidasa (a) y fosfatasa alcalina (b), expresadas en miliunidades/mg de digestivo, en larvas de lenguado alimentadas con distintos piensos comerciales. Los valores son la media  $\pm$  d.e. de la determinación realizada en 30 larvas. Las comparaciones para una misma edad y actividad enzimática que no se indican con letras no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios ( $p > 0,05$ ).



también se produjo un aumento progresivo de la actividad hasta el día 70, aunque en este caso los valores se mantuvieron constantes a partir de este momento (figura 4b). A diferencia del estudio de Ribeiro *et al.* (2002), la actividad  $\alpha$ -amilasa no parece estar influida por la calidad del alimento suministrado, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En general, se comprobó que, a medida que las larvas aumentaron su edad, se incrementó la secreción de esta enzima, con la excepción del día 88, en el que se apreció una ligera disminución. Los resultados apuntan a que las variaciones encontradas

parecen deberse a un fenómeno programado genéticamente durante el desarrollo de esta especie, más que a la influencia del tipo de alimento suministrado durante el cultivo larvario (Henning, 1987). Para la actividad proteasa ácida, fundamentalmente debida a la pepsina del estómago, se encontró un comportamiento similar al ya descrito para la  $\alpha$ -amilasa, si bien la caída en el día 88 no fue tan acentuada. Tampoco en este caso se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. Por otra parte, resulta curioso comprobar que el aumento de la secreción de estas dos enzimas coincide en el tiempo con el descenso de la

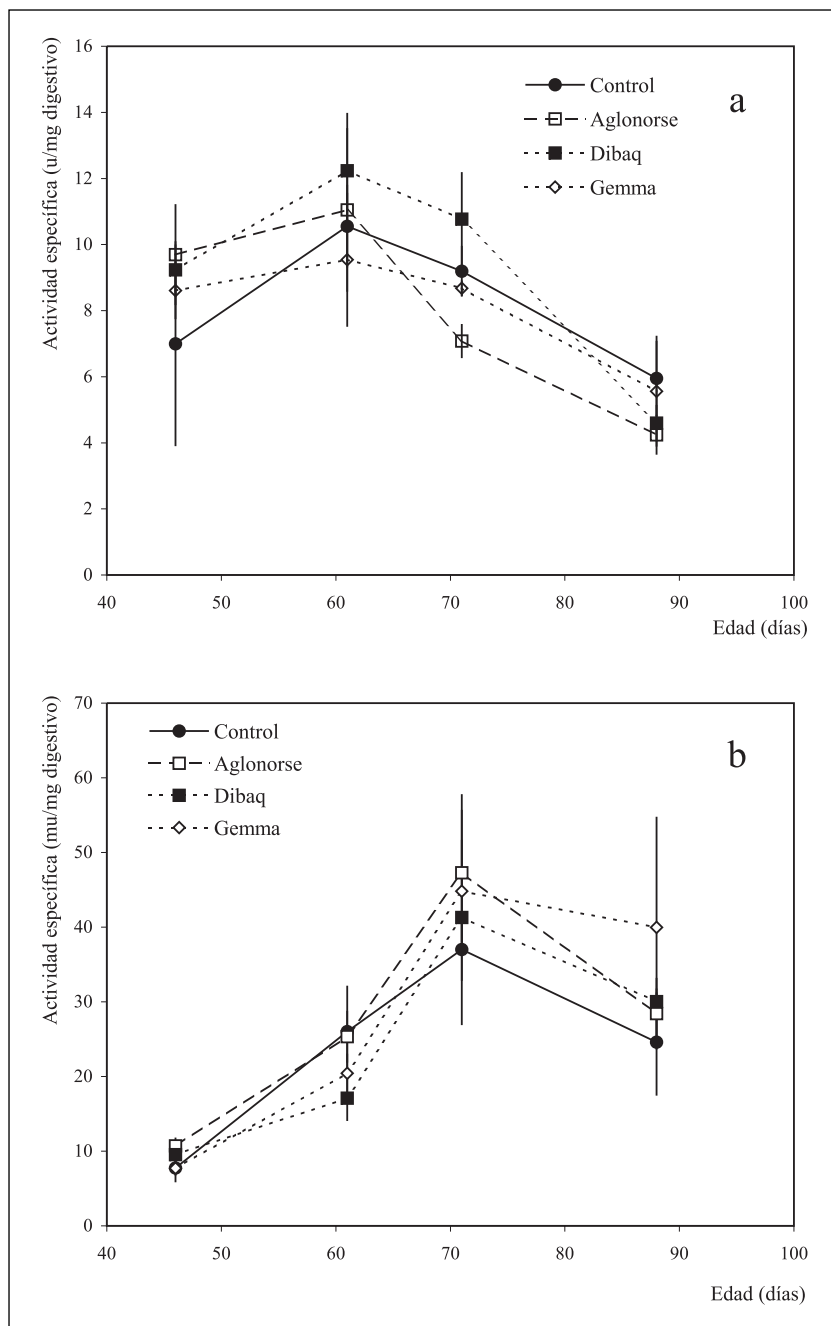


Figura 4. Actividad  $\alpha$ -amilasa (a), expresada en unidades/mg de digestivo, y proteasa ácida (b), expresada en miliunidades/mg de digestivo, en larvas de lenguado alimentadas con distintos piensos comerciales. Los valores son la media  $\pm$  d.e. de actividad de tres extractos distintos preparados con 10 individuos cada uno. Las comparaciones para una misma edad y actividad enzimática que no se indican con letras no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios ( $p > 0,05$ ).

secreción de otras proteasas intestinales (tripsina y quimotripsina). A falta de un estudio más profundo, este fenómeno induce a concluir que existe un mecanismo de modulación entre las distintas enzimas digestivas, ya que el incremento de las primeras parece compensar la disminución de las segundas. Así, la digestión global del alimento no se vería afectada (Ribeiro *et al.*, 2002). Por otra parte, la eficiente secreción de proteasas ácidas de las larvas coalimentadas con pienso revela que no se altera ni el patrón

normal de desarrollo del estómago ni su funcionalidad, y que los mecanismos de síntesis y secreción del páncreas se desarrollan con toda normalidad.

A modo de resumen, se ha comprobado que los piensos de destete utilizados en el cultivo de *S. senegalensis* determinan crecimientos y supervivencias menores que el alimento vivo. Por otra parte, los resultados de las actividades enzimáticas digestivas indican que las larvas desarrollan de forma adecuada sus capacidades digestivas

sin que el uso de estos piensos ocasione una modificación en los patrones de las mismas. Por tanto, puede concluirse que el uso de pienso determina una tasa de crecimiento menor en el cultivo y que este hecho puede ser debido a otros factores distintos de la capacidad digestiva que posee la larva.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por los proyectos ACU03-022-C1 y C2 INIA, del Ministerio de Educación y Ciencia (España) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *Journal of General Physiology* 22: 79-89.
- Bergmeyer, H. V. 1974. Phosphatase. En: *Methods of enzymatic analysis*. H. S. Bergmeyer (ed.) 2: 856-860. Verlag Chemie Academic Press. Nueva York.
- Dinis, M. T., L. Ribeiro, F. Soares y C. Sarasquete. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176: 27-38.
- Engrola, S., L. E. C. Conceição y M. T. Dinis. 2001. Effect of pre-weaning feeding regime on weaning success of *Solea senegalensis*. En: *Larvi 2001, Fish and Shellfish Larviculture Symposium* (3-6 de septiembre, 2001. Gante, Bélgica). C. I. Hendry, G. Van Stapen, M. Wille y P. Sorgeloos (eds.). *European Aquaculture Society, Special Publication* 30: 178-181. Ostende, Bélgica.
- Flos, R., J. V. Fernández, P. P. Ambrosio y R. Carbo. 1995. Ensayos preliminares para el cultivo de lenguado. En: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura* (10-13 de mayo, 1995. Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, España). F. Castelló i Orvay y A. Calderer i Rey (eds.): 839-844. Publicacions de la Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- Henning, S. J. 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract. 2nd Ed.* L. R. Johnson (ed.): 285-300. Raven Press. Nueva York.
- Lemieux, H., P. Blier y J. D. Dutil. 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 293-303.
- Marín-Magán, V., V. Anguis, y J. P. Cañavate. 1995. Uso de alimento inerte en larvas y alevines del lenguado *Solea senegalensis*. En: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura* (10-13 de mayo, 1995. Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, España). F. Castelló i Orvay y A. Calderer i Rey A. Calderer (eds.): 432-436. Publicacions de la Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- Pfeiderer, G. 1970. Particle bound peptidase from pig kidney. *Methods in Enzymology* 19: 514-521.
- Ribeiro, L., J. Zambonino-Infante, C. Cahu y M. T. Dinis. 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 61-69.
- Robyt, J. F. y W. J. Whelan. 1968. *Starch and its Derivatives*. J. A. Radley (ed.): 477-497. Academic Press. Londres.
- Smith, M. V. 1992. Diets effects on enterocyte development. *Proceedings of the Nutrition Society* 51: 173-178.
- Tseng, H. C., J. H. Grendell y S. S. Rothman. 1982. Food, duodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. *American Journal of Physiology* 243: 304-312.
- Ueberschär, B. F. R. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforsch.* 32: 144-154.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 130: 477-487.