

Actividad tripsina y quimotripsina como indicadores de condición larvaria: estudio de restricción alimentaria y calidad de puesta

Beatriz Cara¹, Fco. Javier Moyano¹, J. Luis Zambonino², Christian Fauvel³

¹ Dpto. Biología Aplicada, E.P. Superior, Univ. Almería (España)

² IFREMER, ARN, Plouzané (Francia)

³ IFREMER, LRPM, Palavás (Francia)

Resumen

Uno de los puntos clave en el progreso de la larvicultura marina, se basa en el desarrollo de los llamados indicadores de condición larvaria (ICL), cuya finalidad es la de evaluar el potencial de crecimiento y supervivencia de una puesta, en los distintos momentos del cultivo. Dentro de estos ICLs, las actividades de las proteasas tripsina y quimotripsina han sido propuestas como indicadoras del status nutricional, debido a su importancia en el proceso de digestión proteica y por tanto, asimilación y utilización de los nutrientes. En el presente trabajo, se ha evaluado la respuesta de dichas actividades enzimáticas en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), cuando son sometidas a una restricción del 60% en la cantidad normal de alimento. Asimismo, estos perfiles de actividad se han comparado entre dos cultivos procedentes de puestas de distinta calidad. Las diferencias encontradas revelan su posible utilización como indicadores de condición larvaria. Adicionalmente, se propone la existencia de un mecanismo compensatorio para ambas proteasas, el cual explicaría los altos valores de actividad y buenos resultados de crecimiento y supervivencia, encontrados en los grupos con alimentación restringida o baja calidad de puesta.

Summary

Trypsin and chymotrypsin activities as larval condition indicators: assay of nutritional restriction and quality spawn

One important issue in the progress of marine aquaculture is based in the development of the so-called larval condition indicators (LCI), which are able to evaluate the potential growing and survival of a spawn along the culture. Within these ICLs, the trypsin and chymotrypsin proteases activities have been propose as indicators of the nutritional status, due to their importance in protein digestion and therefore uptake and assimilation of the nutrients. In the present work, the response of these enzymes activities in sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*), fed with a standard or 60% restricted ration was evaluated. These activity profiles have also been compared between two different quality spawns. The differences found in the activity patterns, reveal them as efficient condition indicators. Additionally, a compensatory mechanism for both proteases is proposed, in order to explain the high activity and good results of growing and survival, founds in the groups with restricted ration or poor quality spawn.

Introducción

La idea de utilizar ciertos parámetros capaces de aportar información acerca del potencial de supervivencia y/o crecimiento larvario, comenzó a aparecer por primera vez en las empresas dedicadas a la explotación de pesquerías. A estos parámetros se les dio el nombre de indicadores de condición larvaria (ICL) y su función es la de medir el grado de bienestar, salud o fortaleza física de una larva (1).

Ha sido en los últimos años, con la creciente demanda de cría larvaria por parte del sector acuícola, cuando se ha comenzado a pensar en la posible aplicación de estos indicadores, a los cultivos larvarios de tierra. Según el nivel al que se han evaluado tales indicadores, han sido clasificados como morfológicos, histológicos, higiosanitarios y bioquímicos (2). Dentro de este último grupo, las enzimas digestivas son de particular interés, ya que la tasa de digestión en el sistema intestinal limita la cantidad de nutrientes que pueden ser aportados al torrente sanguíneo y por tanto influir en el crecimiento del organismo completo (3). Debido a la gran importancia de la fracción proteica en la nutrición de peces, un gran número de estudios se han centrado en la proteasa tripsina, como enzima clave en su proceso de digestión. Los niveles de secreción de esta enzima están relacionados con la ingesta de alimento y llenado del estómago (4, 5 y 6). Por esto, un período de ayuno o alimentación reducida resulta en un descenso de la actividad (4, 7 y 8). Por otro lado, otras proteasas alcalinas como la quimotripsina, pueden incluso ser un mejor indicador del status nutricional durante el estadio larvario, al menos en algunas especies (9 y 10).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posibilidad de utilización de las enzimas tripsina y/o quimotripsina como indicadores bioquímicos del status nutricional en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*), mediante inducción de una restricción en el alimento. Adicionalmente se estudiaron las posibles variaciones en su respuesta, relacionadas con la calidad original de la puesta.

Material y métodos

Cultivo larvario y muestreo

Las larvas de lubina fueron obtenidas a partir de dos grupos diferentes de reproductores mantenidos en cautividad en las instalaciones de IFREMER-Palavás (Francia). Según los datos obtenidos de porcentaje de huevos viables, peso medio individual de los huevos, proporción de huevos fertilizados, y porcentajes de eclosión, se seleccionaron dos puestas de distinta calidad (BC: buena calidad y MC: mala calidad).

Tras la eclosión, las larvas fueron trasladadas a las instalaciones de IFREMER-Centro de Brest (Francia), donde fueron distribuidas en tanques de 50 l a una densidad aproximada de 1 700 larvas/tanque. Se mantuvieron en oscuridad hasta el día 6 y a continuación se incrementó gradualmente la luz hasta alcanzar un fotoperiodo de 24 h luz/0 h oscuridad. A lo largo del experimento, la temperatura del agua se mantuvo a $20.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y la concentración de oxígeno 5.1 ± 0.2 mg/l. Desde la apertura de la boca (día 6 tras la eclosión) hasta el día 15, todas las larvas fueron alimentadas con la misma ración de alimento vivo. Desde el día 15 al 18 se realizó el destete de forma progresiva, utilizando como alimento inerte una microdieta desarrollada por IFREMER (11). Desde el día 15 tras la eclosión y hasta el final del experimento, ambas puestas (BC y MC) fueron divididas en dos grupos; el grupo control (C) que fue alimentado con la ración usada habitualmente en la planta (4 g/1 000 larvas), y el grupo con alimentación restringida (R), al que se le suministró el 40% de la ración anterior. Todos los tanques fueron alimentados mediante un dispensador automático, el cual distribuye el alimento durante un período de 18 h. Cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado.

Los muestreos se realizaron tras el destete en los días 19 y 31 tras la eclosión. Para evitar las posibles variaciones en la secreción enzimática a lo largo del día, todos los muestreos se efectuaron a la misma hora; cuatro horas después del comienzo de la alimentación. El procedimiento de muestreo utilizado fue el siguiente: las larvas recién tomadas del tanque fueron matadas en N_2 líquido y enjuagadas en agua destilada. Diez de ellas se pusieron en una solución de formol al 5% para su análisis biométrico, y se almacenaron a 4°C en oscuridad. El resto de las larvas se congelaron individualmente a -20°C para su posterior liofilización y análisis bioquímico. Los porcentajes de supervivencia en cada tanque fueron evaluados al final del experimento.

Análisis biométricos

Cada larva fue pesada de forma individual mediante pesada directa en una balanza de precisión. Para la determinación de la longitud estándar (Ls) se utilizó un microscopio estereoscópico equipado con cámara digital.

Análisis bioquímicos

- **Preparación de extractos**

Los extractos de larvas individuales se prepararon en agua destilada mediante sonicación en frío y centrifugación durante 15 min a 16 000 g y 4°C . El sobrenadante así obtenido fue almacenado a -20°C para su posterior utilización en los ensayos de actividad.

- **Actividades enzimáticas**

Las actividades tripsina y quimotripsina se midieron en el mismo extracto de cada larva mediante ensayo fluorimétrico en microplacas, utilizando los sustratos específicos (CBZ-Ala-Arg)₂-rodamina para tripsina y (SC-Ala-Ala-Pro-Phe)₂-rodamina para quimotripsina (12). Las cinéticas de actividad se midieron por duplicado y a temperatura ambiente en un lector de microplacas Fluoroskan (Thermolab Systems, Finland). Una unidad de actividad se definió como el incremento en una unidad de fluorescencia relativa por minuto (UFR/min) y los datos se expresaron como unidades de actividad por larva.

Análisis estadístico

Dado que no se encontraron diferencias entre réplicas dentro de cada tratamiento tras realizar un ANOVA de una vía, se agruparon todas las muestras de cada tratamiento. Se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias debidas a la calidad de la puesta o el régimen de alimentación. Las diferencias entre medias en crecimiento, longitud estándar y supervivencia fueron estudiadas usando un test LSD. En el caso de las actividades enzimáticas, debido a la existencia de grandes diferencias en las varianzas y distribución de los datos para los distintos grupos experimentales, se compararon los tratamientos mediante un test de medianas (Wilcoxon) y evaluando las diferencias en la distribución de datos (Kolmogorov-Smirnov). Todos los tests se realizaron para un nivel de confianza del 95%. Los análisis estadísticos se hicieron mediante el software Statgraphics (Statistical Graphics Corp.).

Resultados

En cuanto al peso medio de las larvas (Tabla I), no se encontraron diferencias significativas entre las puestas de distinta calidad para el grupo alimentado de forma restringida, incluso después de 15 días de experimentación. Sin embargo en el grupo control, evidentemente, se obtuvieron pesos medios mayores en la puesta de buena calidad. Así mismo destacar, los sorprendentemente mejores resultados obtenidos respecto al control, para el grupo alimentado de forma restringida en la puesta MC. Las mismas diferencias se encontraron cuando se analizó la longitud estándar en cada uno de los grupos experimentales (Tabla II).

Como se muestra en la Tabla III, los grupos de alimentación restringida mostraron una mayor, pero no significativamente diferente tasa de supervivencia respecto a sus respectivos controles. Mientras que, como era de esperar, en la puesta BC se obtuvo un significativamente mayor porcentaje de supervivencia que en la MC independientemente del régimen de alimentación.

Tabla I

Peso (mg) de las larvas en dos momentos del muestreo (días 19 y 31 tras la eclosión) en relación al régimen de alimentación y la calidad de la puesta.

	Buena calidad		Mala calidad	
	Día 19	Día 31	Día 19	Día 31
Control	5.12 ± 1.29 ^{aA}	51.68 ± 16.93 ^{aC}	3.50 ± 1.36 ^{aB}	32.24 ± 14.61 ^{aD}
Restringido	3.99 ± 1.07 ^{aA}	39.82 ± 11.22 ^{bC}	4.40 ± 1.57 ^{bA}	40.04 ± 8.16 ^{bC}

Los valores son medias de n=30 individuos ± DS.

Los valores en cada columna (a) o fila (A) que no tienen un superíndice común son estadísticamente diferentes para p<0.05.

Tabla II

Longitud estándar (mm) de las larvas en dos momentos del muestreo (días 19 y 31 tras la eclosión) en relación al régimen de alimentación y la calidad de la puesta.

	Buena calidad		Mala calidad	
	Día 19	Día 31	Día 19	Día 31
Control	0.94 ± 0.09 ^{aA}	1.61 ± 0.15 ^{aC}	0.86 ± 0.08 ^{aB}	1.40 ± 0.18 ^{aD}
Restringido	0.87 ± 0.08 ^{bA}	1.50 ± 0.19 ^{bC}	0.87 ± 0.08 ^{aA}	1.46 ± 0.15 ^{bC}

Los valores son medias de n=30 individuos ± DS.

Los valores en cada columna (a) o fila (A) que no tienen un superíndice común son estadísticamente diferentes para p<0.05.

Tabla III

Tasas de supervivencia larvaria (en %) al final del experimento en relación al régimen de alimentación y calidad de la puesta

	Buena calidad	Mala calidad
Control	55.9 ± 8.3 ^{aA}	39.2 ± 4.4 ^{aB}
Restringido	65.7 ± 8.2 ^{aA}	47.3 ± 6.7 ^{aB}

Los valores son medias de tres tanques réplica ± DS.

Los valores en cada columna (a) o fila (A) que no tienen un superíndice común son estadísticamente diferentes para p<0.05.

Los resultados de actividad tripsina y quimotripsina en los distintos grupos experimentales están resumidos en las Tablas IV y V y en las Figuras 1, 2 y 3. Los valores de actividad determinados para ambas enzimas después de tres días de alimentación artificial fueron más bajos en las larvas MC. La restricción en un 60% del alimento proporcionó sorprendentemente un significativo incremento tanto de las actividades tripsina (1.7 veces el control) como quimotripsina (2.4 veces el control) en las larvas BC. Este efecto fue menor en el caso de las larvas MC en las que los incrementos de actividad respecto al control fueron del 1.2 y 1.9 para tripsina y quimotripsina respectivamente.

Tabla IV

Actividad tripsina (U actividad/larva) en relación al régimen de alimentación y calidad de la puesta, en los días 19 y 31 tras la eclosión.

	Buena calidad		Mala calidad	
	Día 19	Día 31	Día 19	Día 31
Control	305 ± 159 <i>291^a</i>	219 ± 97 <i>207^a</i>	235 ± 249 <i>96^a</i>	388 ± 170 <i>350^a</i>
Restringido	525 ± 314 <i>516^b</i>	384 ± 212 <i>291^b</i>	291 ± 219 <i>267^a</i>	558 ± 406 <i>463^a</i>

Los valores mostrados son la media ± DS y las medianas (en cursiva) de las determinaciones de 40-45 individuos en cada caso.

Los valores en cada columna sin un superíndice común son estadísticamente diferentes para p<0.05.

Tabla V

Actividad quimotripsina (U actividad/larva) en relación al régimen de alimentación y la calidad de la puesta, en los días 19 y 31 tras la eclosión.

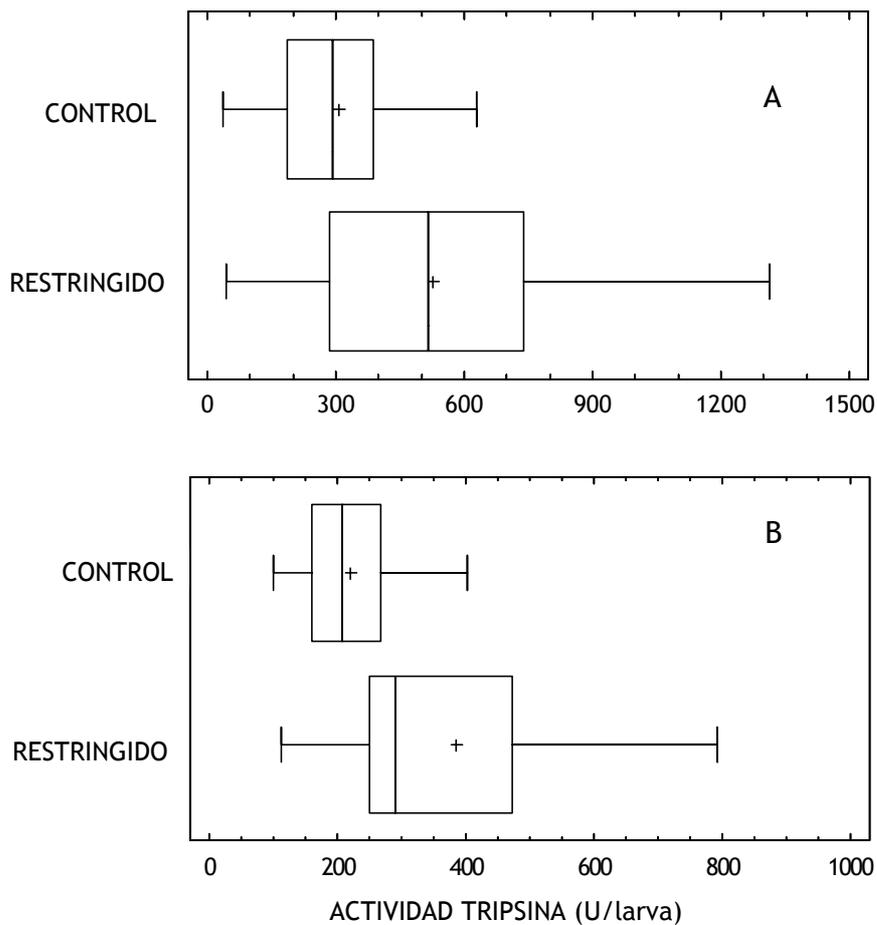
	Buena calidad		Mala calidad	
	Día 19	Día 31	Día 19	Día 31
Control	297 ± 177 <i>249^a</i>	656 ± 522 <i>545^a</i>	208 ± 262 <i>75^a</i>	777 ± 414 <i>807^a</i>
Restringido	678 ± 374 <i>604^b</i>	1229 ± 811 <i>1221^b</i>	398 ± 275 <i>353^b</i>	1283 ± 871 <i>1124^a</i>

Los valores mostrados son la media ± DS y las medianas (en cursiva) de las determinaciones de 40-45 individuos en cada caso.

Los valores en cada columna sin un superíndice común son estadísticamente diferentes para $p < 0.05$.

Figura 1

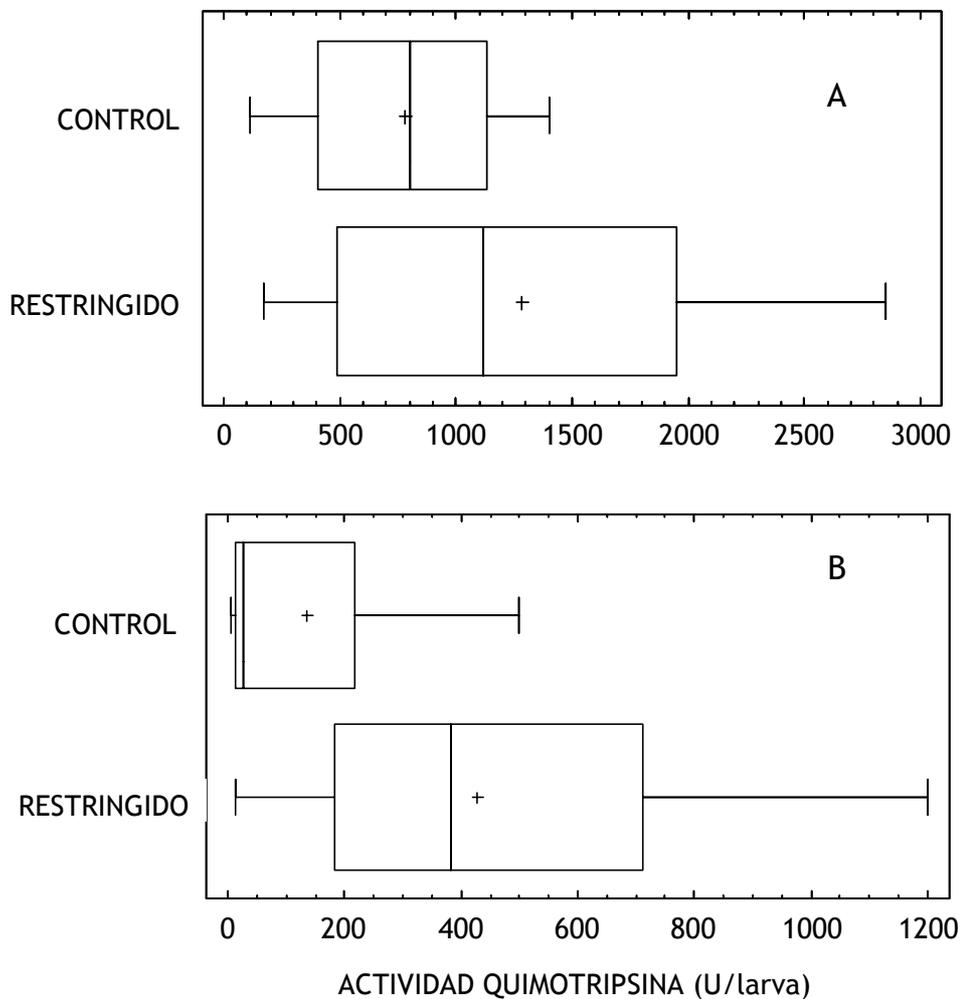
Valores de actividad tripsina en larvas BC después de (A) 3 días y (B) 15 días de experimento.



Diferencias significativas entre las distribuciones de datos fueron determinados en ambos casos.

Figura 2

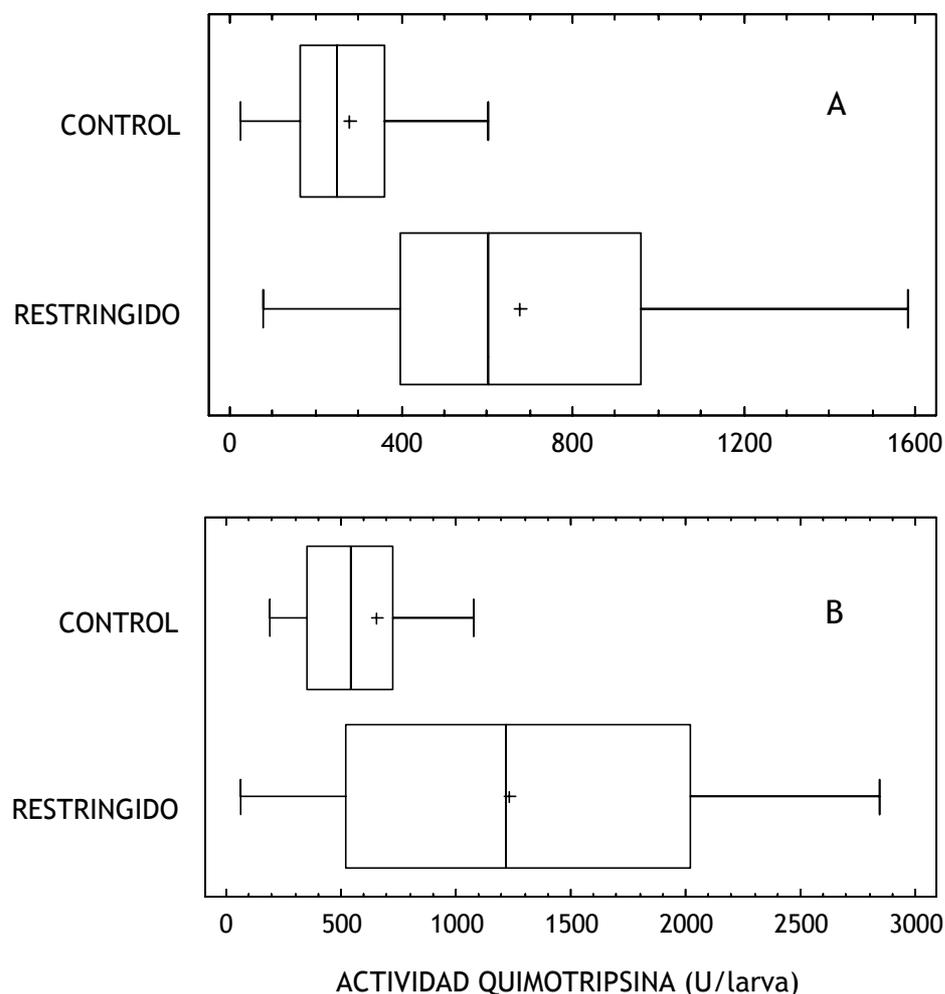
Valores de actividad quimotripsina en larvas MC después de (A) 3 días y (B) 15 días de experimento.



Diferencias significativas entre las distribuciones de datos fueron determinados en ambos casos.

Después de 15 días de experimentación, ya no se encontraron grandes diferencias en la actividad quimotripsina, entre las puestas de buena o mala calidad; si bien ésta última presentó valores superiores en actividad tripsina. El efecto de incremento de actividades para los grupos con alimentación restringida fue de nuevo evidenciado. Mientras que en el grupo BC los incrementos fueron significativos: 1.7 y 1.8 para tripsina y quimotripsina respectivamente, de nuevo en el caso de MC el efecto no fue tan marcado (1.4 y 1.6). La existencia de una gran variabilidad determinó la diferencia no significativa entre estos dos últimos tratamientos.

Figura 3
Valores de actividad quimotripsina en larvas de BC después de (A) 3 días y (B) 15 días de experimento.



Diferencias significativas entre las distribuciones de datos fueron determinados en ambos casos.

Discusión

Una enzima puede ser utilizada como indicador biológico si su actividad muestra claras variaciones genéticas (permitiendo hacer distinción entre poblaciones), o una respuesta diferente frente a cambios medioambientales. En el caso de las proteasas digestivas, existen datos apoyando la existencia de ambos tipos de variaciones. Diferencias genéticas de la enzima tripsina han sido presentadas desde un punto de vista tanto cualitativo como cuantitativo. Torrissen y cols. (13 y 14) mostraron la relación entre la presencia de isoenzimas de tripsina con un mejor funcionamiento a bajas temperaturas y las velocidades de crecimiento, digestión y uso de la proteína en salmón atlántico. La cantidad de enzima producida también parece estar relacionada con un mejor potencial de crecimiento según se concluye en los estudios de Baragi y Novell (15) con lubina rayada, Lemieux y cols. (3) con bacalao atlántico, Blier y cols. (16) con salmón coho o más recientemente en wolffish por Lamarre y cols. (17). Todos estos trabajos apoyan la idea de que la actividad de tales enzimas, principalmente la tripsina, pueden ser indicadores del status nutricional en peces,

ya que su baja actividad está directamente unida a un insuficiente suplemento de aminoácidos, resultando en un pobre crecimiento y supervivencia. En el presente trabajo, la posible existencia de diferencias genéticas en la expresión basal tanto de tripsina como quimotripsina, fue estudiada mediante su cuantificación en larvas obtenidas de dos puestas de calidades distintas, las cuales previsiblemente, podrían mostrar diferencias en los potenciales de crecimiento. Los valores de peso, longitud estándar y supervivencia obtenidos apuntan que estas diferencias en calidad existieron a lo largo del experimento. Esta diferencia en calidades fue evidenciada por ambas actividades, únicamente de forma temprana, cuando las larvas habían sido alimentadas con dieta artificial durante sólo tres días.

Un segundo factor que afecta a la secreción de proteasas es la cantidad total de comida proporcionada. Ya que la secreción de proteasas se produce como una respuesta a la tasa de ingestión, sería esperable que aquellas larvas alimentadas bajo un régimen restringido sufrieran una reducción significativa en la actividad. Sorprendentemente, valores tanto de tripsina como de quimotripsina se incrementaron significativamente en las larvas sometidas a restricción alimentaria. Esta capacidad de sobreexpresión enzimática fue notoriamente menor en las larvas MC. Las mayores diferencias entre tratamientos se encontraron para la enzima quimotripsina, lo que pone de manifiesto la posibilidad de usar esta enzima como un mejor indicador del estatus nutricional de la larva. Sunde y cols. (9) también consideraron la actividad de esta enzima, y encontraron que la ratio tripsina/quimotripsina correlacionaba mejor con la SGR en salmón atlántico que la tripsina por sí sola. Un reciente trabajo de Appelbaum y Holt (10) en larvas de corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) también apoya esta idea, ya que encontraron diferencias significativas en los valores de actividad quimotripsina correlacionados con el status de alimentación de las larvas.

La ausencia de diferencias significativas en supervivencia entre las larvas control o con ración restringida, y la mejora de los pesos y longitudes estándar en la puesta MC a causa de la restricción, puede tener dos posibles explicaciones:

- a) Mientras que la ración fijada para el grupo restringido se ajustó apropiadamente a los requerimientos metabólicos de la larva, la ración proporcionada como control, excedía en gran medida tales necesidades; por tanto, una cantidad significativa de comida no fue ingerida ni usada para promover crecimiento en estas larvas. Pero en este caso, ninguna diferencia en las actividades enzimáticas deberían haberse observado entre ambos grupos.
- b) Una reducción en la cantidad de alimento ingerido llevó a un incremento en la actividad proteasa, que determinó una mejor digestión de la fracción proteica y compensó la menor ingesta.

Esta segunda hipótesis, apunta a la existencia de un efecto compensatorio y podría explicar mejor los resultados obtenidos en el presente trabajo. Un tipo de compensación ha sido descrito previamente por Einarson y cols. (6), quien encontró diferencias en la actividad tripsina entre dos grupos de salmón clasificados por sus potenciales de crecimiento. Aquellos que pertenecían al grupo de bajo crecimiento produjeron significativamente más tripsina en primavera, el período más favorable para crecimiento cuando una mayor cantidad de alimento es proporcionada. Este grupo también mostró una más sensible respuesta a la inyección de colecistoquinina, la hormona que media en la secreción de tripsina. Este efecto compensatorio probablemente reflejó una adaptación digestiva en las larvas cuando la restricción del alimento no fue demasiado drástica. En un experimento de alimentación similar, pero usando alimento vivo, Zambonino y cols. (18) mostraron que solamente una ración altamente restringida (75% y 90%) produjo un descenso en el peso de las larvas después de 11 días de alimentación. Este mismo efecto fue encontrado por Cara y cols. (19) tras aplicar una restricción del 75% en la alimentación a larvas de lenguado (*Solea senegalensis*).

El efecto compensatorio observado en este experimento no solamente determinó que las larvas MC alcanzaran un peso final similar a las larvas BC, sino también que las tasas de supervivencia en el primero fueran significativamente mejoradas. Esto apunta a la posibilidad del uso de patrones de alimentación durante los estadios larvarios como herramienta para incrementar el éxito final de la operación, un campo que aún requeriría de una mayor investigación.

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que, ambas enzimas presentaron inicialmente valores más altos de actividad en larvas consideradas como el grupo BC cuando fueron comparadas con MC. Así, las enzimas pueden ser usadas para distinguir *a priori* entre lotes de larvas con diferentes potenciales de supervivencia. El segundo hecho encontrado es que los valores de actividad tripsina o quimotripsina pueden servir como indicadores nutricionales sólo frente a cambios drásticos en la tasa de ingestión. Una creciente liberación de ambas enzimas puede estar relacionada no con un mejor estatus alimentario, sino como consecuencia de proceso de compensación enzimática debida a la baja disponibilidad de nutrientes. El resultado final del cultivo larvario, expresado en términos de crecimiento y supervivencia, será dependiente de la severidad de tal restricción y de la capacidad de la especie para afrontar dicho estrés metabólico.

Agradecimientos

Este trabajo estuvo financiado por el Programa de la UE ASEFAF y el Proyecto AGL2000-0697-C02-02 de la Dirección General de Investigación, MCYT (España).

Referencias

1. POPE KL, KRUSE CG. Assessment of Fish Condition Data. En: GUY C, BROWN M, ed. *Statistical Analyses of Freshwater Fisheries Data*. American Fisheries Society Publication 2001. URL: http://wfs.sdstate.edu/StatsProject/ch10_draft.pdf
2. FERRON A, LEGGETT WC. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.* 1994; 30:217-303
3. LEMIEUX H, BLIER P, DUTIL JD. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiol. and Biochem.* 1999; 20:293-303
4. PEDERSEN BH, NILSSEN EM, HJELMELAND K. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.* 1987; 94:171-81
5. PEDERSEN BH, ANDERSEN KP. Induction of trypsinogen secretion in herring larvae (*Clupea harengus*). *Mar. Biol.* 1992; 112:559-65
6. EINARSSON S, SPENCER-DAVIES P, TALBOT C. The effect of feeding on the secretion of pepsin, trypsin and chymotrypsin. *Fish Physiol. Biochem.* 1996; 15:439-46
7. HJELMELAND K, HUSE I, JÜRGENSEN T, MOLVIK G, RAA J. Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. En: DAHL E, DANIELSSEN DS, MOKSNESS E, eds. *The propagation of cod, Gadus morhua L. an International Symposium, Arendal, 14-17 June 1983*. Part 1. Norway: Inst. of Marine Research, 1984:189-211
8. UEBERSCHÄR B. The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES Mar. Sci. Symp.* 1995; 201:119-29
9. SUNDE J, TARANGER GL, RUNGRUANGSAK-TORRISSEN K. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Fish Physiology and Biochemistry* 2001; 25:335-45

10. APPLEBAUM SL, HOLT AJ. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mar. Biol.* 2003; 142:1159–67
11. CAHU CL, ZAMBONINO-INFANTE JL, BARBOSA V. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Brit. J. Nutr.* 2003; 90:21-8
12. CARA JB, MOYANO FJ. Evaluation of specific fluorogenic substrates for accurate determination of digestive protease activities in marine fish larvae (Abstract). *XXXIII Colloquium Spectroscopicum Internationale*. Granada, 2003
13. TORRISSEN KR. Genetic variation in growth rate of Atlantic salmon with different trypsin-like isozyme patterns. *Aquaculture* 1991; 93:299–312
14. TORRISSEN KR, SHEARER KD. Protein digestion, growth and food conversion in Atlantic salmon and Arctic charr with different trypsin-like isozyme patterns. *J. Fish Biol.* 1992; 41:409–15
15. BARAGI V, LOVELL RT. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1986; 115:478–84
16. BLIER PU, LEMIEUX H, DEVLIN RH. Is the growth rate of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity of the tissues? Insight from transgenic coho salmon. *Aquaculture* 2002; 209:379–84
17. LAMARRE SG, LE FRANÇOIS NR, FALK-PETERSEN I, BLIER PU. Can digestive and metabolic enzyme activity levels predict growth rate and survival of newly hatched Atlantic wolffish (*Anarichas lupus* Olafsen)? *Aquacult. Res.* 2004; 35:608-13
18. ZAMBONINO INFANTE JL, CAHU CL, PÉRES A, QUAZUGUEL P, LE GALL, MM. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 1996; 139:129-38
19. CARA B, MOYANO FJ, DÍAZ M, YÚFERA M. Evaluación de las actividades tripsina y quimotripsina como indicadores de condición nutricional en larvas de peces marinos. *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003*. 2003. URL: <http://www.civa2003.org>