

Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces¹

Dr. Armando García Ortega

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán
 Av. Sábalo Cerritos s/n, Estero del Yugo, Apartado Postal 711, C.P. 82010, Mazatlán, Sinaloa, México.
 Tel: +52 69 880157, Fax: +52 69 880159. agarcia@victoria.ciad.mx

RESUMEN: La dependencia en el alimento vivo y la carencia de alimentos artificiales adecuados son los mayores obstáculos para la expansión de la larvicultura en muchas especies de peces. La baja digestibilidad y la calidad nutricional de los alimentos artificiales son factores que pueden explicar su fracaso como dietas iniciales para peces. En este trabajo, se analizan los aspectos fisiológicos relacionados con la capacidad de las larvas de peces para la digestión del alimento. Adicionalmente, la calidad de la proteína en quistes desencapsulados y nauplios de *Artemia* es evaluada, y la factibilidad de utilizar los quistes como fuente de proteína en microdietas para peces también es analizada. Para estos estudios se utilizó al bagre africano *Clarias gariepinus* como especie experimental. Los resultados indican que las larvas del bagre tienen la capacidad enzimática para digerir la *Artemia*. El suministro de enzimas digestivas en el alimento vivo tiene una contribución pequeña en el total de la capacidad de digestión de las larvas. La proteína en *Artemia* está constituida principalmente por proteínas de pesos moleculares pequeños, las cuales pueden ser más fácilmente digeribles en comparación con las proteínas en las dietas artificiales. Se sugiere que la estructura y el tamaño de las proteínas en el alimento para larvas de peces tiene un papel muy importante en su digestibilidad. Estudios *in vitro* de la digestibilidad de la proteína de quistes desencapsulados y nauplios de *Artemia*, y de microdietas hechas a base de quistes indican tasas más altas de digestibilidad para estas dietas comparadas con los alimentos comerciales. El uso de quistes desencapsulados de *Artemia* como fuente de proteína en microdietas mejoró su desempeño como dietas iniciales para larvas de peces.

PALABRAS CLAVE: *Artemia*, nutrición, dietas, peces

INTRODUCCIÓN

El periodo más crítico en la larvicultura de peces es el inicio de la alimentación exógena después de la absorción del saco vitelino. Para las larvas de especies que no tienen un estómago funcional al inicio de la alimentación exógena, el alimento vivo es esencial para un crecimiento óptimo. En cambio, para estas mismas especies el crecimiento y la sobrevivencia son más bajos cuando en la primera alimentación se ofrecen alimentos artificiales en lugar de rotíferos y *Artemia* (Jones *et al.*, 1993; Watanabe y Kiron, 1994). Por lo tanto, una pregunta clave en el cultivo de larvas es: ¿por qué el alimento vivo es mejor que el alimento artificial? Las principales hipótesis que se han propuesto para explicar esta situación son: 1) el consumo del alimento vivo es mejor debido que inducen estímulos visuales y

¹ García, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

químicos; 2) las enzimas presentes en los organismos vivos contribuyen a la digestión del alimento cuando son consumidos por las larvas de peces; 3) existen diferencias en la digestibilidad entre los alimentos vivos y artificiales, las cuales son usualmente atribuidas a las diferencias en la digestibilidad de proteína. En esta revisión se discuten principalmente las dos últimas hipótesis. Para evitar influencias en los resultados debido al primer aspecto es preferible utilizar una fuente de alimento (e.g. quistes de *Artemia*) que es bien aceptada por las larvas de peces. En el presente trabajo se discute además la investigación que se ha desarrollado respecto al estudio de la composición nutricional del alimento para larvas y los aspectos relacionados con la digestión y absorción del alimento. Por lo tanto, los principales objetivos del trabajo resumido aquí fueron realizar la caracterización nutricional de *Artemia*, estudiar que tan significativa es la contribución de enzimas exógenas del alimento para su digestión en las larvas de peces, y estudiar la importancia para la digestión de la estructura de la proteína del alimento. Los resultados de estos estudios pueden contribuir de manera significativa en el desarrollo de microdietas experimentales y prácticas que permitan obtener altas tasas de consumo y de digestión del alimento en las larvas de peces. Para lograr estos objetivos, las investigaciones fueron divididas en tres fases. En la primera fase, la composición nutricional de *Artemia* durante el desarrollo de quiste hasta nauplio fué analizada con énfasis en las composiciones de amino ácidos y ácidos grasos. Durante la segunda fase de las investigaciones, se examinó la hipótesis de que las enzimas en el alimento no tienen un papel significativo en la digestión del alimento en las larvas de peces. Y en la tercera fase, las investigaciones se enfocaron a estudiar el papel de la estructura molecular de la proteína en el alimento para la digestión y absorción. La especie experimental durante las investigaciones fue el bagre africano *Clarias gariepinus*.

Composición nutricional de Artemia durante el desarrollo de quiste a nauplio

Los organismos más importantes utilizados como alimento vivo en Acuicultura son el rotífero *Brachionus plicatilis* y el crustáceo *Artemia* spp. Varios estudios han sido realizados para determinar el valor nutricional de ambos y evaluar su uso como alimento para larvas de peces (Watanabe *et al.*, 1983; Léger *et al.*, 1986; Hagiwara *et al.*, 1997). A pesar de las ventajas que ofrece *Artemia* como alimento inicial para larvas de peces, la calidad nutricional entre los diferentes lotes de *Artemia* puede variar considerablemente (Léger *et al.*, 1986). Esta variación puede ocurrir inclusive entre lotes de *Artemia* del mismo origen. Adicionalmente, en algunos casos el valor nutricional de *Artemia* no es el óptimo y tampoco cumple con los requerimientos nutricionales de algunas larvas de peces (Watanabe *et al.*, 1983). Es por esto que, en los estudios nutricionales con larvas de peces, es importante determinar la composición bioquímica de los organismos utilizados como alimento vivo. La composición nutricional de *Artemia* ha sido ampliamente estudiada (ver revisión por Léger *et al.*, 1986). Sin embargo, esos estudios principalmente analizaron el estadio instar I y se enfocaron en la composición de los macronutrientes y los ácidos grasos. A pesar de que el principal componente de la materia seca de *Artemia* es la proteína, la información disponible sobre la composición de proteína y de amino ácidos en *Artemia* durante su desarrollo de quiste a nauplio es escasa.

Los quistes desencapsulados y los nauplios vivos instar I de *Artemia* son utilizados en la larvicultura de varias especies de peces. Los quistes desencapsulados de *Artemia* han sido probados exitosamente como alimento para larvas del bagre africano *C. gariepinus* (Verreth *et al.*, 1987; Pector *et al.*, 1994). Sin embargo, el crecimiento de los peces alimentados con quistes es significativamente mas bajo que el crecimiento obtenido con los nauplios vivos de *Artemia* (Verreth *et al.*, 1987). Los quistes de *Artemia*

están constituidos de embriones que reinician su metabolismo interrumpido una vez que son hidratados en agua salada en condiciones óptimas de temperatura e iluminación (Sorgeloos *et al.*, 1986). Después de la hidratación y desencapsulación, los quistes que contienen los embriones constituyen una fuente alimenticia que puede tener una composición bioquímica y nutricional diferente a la de los nauplios ya eclosionados. Esta diferencia puede ser parte del resultado del efecto de la técnicas de desencapsulación y de almacenamiento de los quistes, además de la calidad para eclosionar de los quistes. Adicionalmente, debido a las diferencias en el tiempo de eclosión entre los quistes de *Artemia*, una solución de nauplios cosechados puede contener diferentes estadios de vida, desde quistes no eclosionados, a estadios de ‘sombrija’, a nauplios vivos instar I. Estos factores pueden explicar las diferencias en el crecimiento observadas en larvas de bagre alimentadas con quistes y nauplios. La calidad nutricional de los diferentes estadios de *Artemia* ha sido investigada (García-Ortega *et al.*, 1998) y los resultados indican que el contenido individual de proteína y grasa disminuyen durante el desarrollo de quistes a nauplios. Sin embargo, las diferencias en la composición proximal por individuo no fueron estadísticamente significativas. La mayor parte de los constituyentes nutricionales son usados durante el desarrollo embrional, probablemente como energía. En la determinación de la calidad nutricional de *Artemia*, también es importante estudiar los cambios en la composición proximal en base al peso individual y no exclusivamente en términos relativos (% peso seco). En general, los quistes desencapsulados de *Artemia* constituyen un alimento con una composición bioquímica constante. En relación a la composición de amino ácidos y ácidos grasos se concluye que, durante el desarrollo de los quistes y nauplios de *Artemia*, los pequeños cambios observados no tienen un efecto importante en su valor nutricional como alimento para larvas de peces. El contenido total de amino ácidos en muestras de quistes y nauplios no fue significativamente diferente, y el contenido total de ácidos grasos fue mas bajo en los nauplios que en los quistes. Sin embargo, los nauplios de *Artemia* producen un crecimiento mayor en las larvas del bagre que cuando los peces son alimentados con quistes (García-Ortega *et al.*, 2000a). Esto sugiere que la cantidad de nutrientes en los quistes y nauplios no es el factor determinante para explicar la diferencia en el crecimiento cuando quistes y nauplios son comparados como alimento para las larvas de peces. Probablemente, además de la cantidad, la calidad de los nutrientes también juega un papel importante.

El factor del alimento vivo

Además de los macro-nutrientes en los organismos del alimento vivo, la atención también se ha enfocado a los micro-nutrientes para explicar el pobre crecimiento obtenido en los peces cuando los alimentos artificiales son utilizados. Una propuesta menciona que una sustancia insoluble en agua o factor de crecimiento proveniente de los nauplios de *Artemia* es esencial para lograr la metamorfosis en las larvas del pez blanco *Coregonus lavaretus* (Flüchter 1982). Sin embargo, esta especie ha sido cultivada exitosamente con dietas artificiales las cuales no contienen ningún componente del alimento vivo (Dabrowski *et al.*, 1984). Los mismos extractos de *Artemia* fueron examinados en microdietas para larvas de bagre y produjeron un crecimiento mas bajo que con quistes desencapsulados (Verreth *et al.*, 1987). Estos estudios cuestionaron los factores de crecimiento en *Artemia* encontrados por Flüchter, y de esta forma dirigieron la atención hacia otros factores alimenticios, los cuales pueden tener más importancia en la nutrición de las larvas de peces. Estos factores incluyen componentes alimenticios que inhiben o estimulan la acción de hormonas esenciales para la metamorfosis de los peces (Lam 1980; Inui *et al.*, 1989). El estudiar el papel de los micro-nutrientes en la digestión del alimento puede ayudar a comprender porqué el alimento vivo es más adecuado como dieta inicial para las larvas de peces en comparación con los alimentos artificiales. Asimismo se puede obtener

información muy valiosa de los estudios de los procesos fisiológicos involucrados en la digestión larvaria.

Enzimas proteolíticas y capacidad de digestión en las larvas de peces

Los cambios anatómicos y fisiológicos durante el desarrollo de las larvas de peces son factores que definen sus requerimientos nutricionales. Los peces sin funciones estomacales durante la fase de larva son dependientes del alimento vivo como dieta inicial. Considerando que el mayor constituyente nutricional en el alimento vivo es la proteína, la capacidad proteolítica para la digestión del alimento puede ser considerada como la más importante durante la fase larvaria temprana de los peces. Este aspecto tiene implicaciones importantes en los estudios nutricionales con estos peces y fue analizado en detalle para el presente trabajo. Las larvas de peces sin un estómago funcional dependen de una digestión alcalina del tipo tripsina para la digestión del alimento (Tabla 1). Cuando el estómago es completamente funcional, la actividad proteolítica en las larvas cambia principalmente del tipo tripsina al tipo pepsina o digestión ácida. Este aspecto puede tener implicaciones en el tipo de proteína que el pez es capaz de digerir como será explicado en los siguientes párrafos. La discusión en este trabajo se centra en el potencial de las enzimas alcalinas durante los primeros días de la alimentación exógena en las larvas de peces.

Tabla 1. Actividades tipo tripsina y tipo pepsina en peces de agua dulce y peces marinos sin estómago funcional al inicio de la alimentación exógena y una vez que el estómago se ha vuelto completamente funcional. (+) presente, (++) moderadamente activa, (+++) muy activa (-) no medida.

Especies	Inicio alimentación exógena		Sin estómago funcional		Referencia
	Tripsina	Pepsina	Tripsina	Pepsina	
Pez blanco <i>Coregonus lavaretus</i>	++	-	+	-	Lauff y Hofer, 1984
Bagre africano <i>Clarias gariepinus</i>	+++	+	++	+++	Verreth <i>et al.</i> , 1992
Mero asiático <i>Lates calcarifer</i>	++	+	+	++	Walford y Lam, 1993
Mero europeo <i>Dicentrarchus labrax</i>	++	-	-	+++	Zambonino Infante y Cahu, 1994; Nolting <i>et al.</i> , 1999
Rodaballo <i>Scophthalmus maximus</i>	++	+	+	+++	Segner <i>et al.</i> , 1994

Capacidad de digestión del alimento en periodos cortos

Los procesos digestivos en las larvas de peces son rápidos y ocurren dentro de pocas horas después de la ingestión del alimento (Govoni *et al.* 1986; Hofer y Bürkle, 1986; Pedersen *et al.* 1987). A pesar de lo anterior, la mayoría de los estudios sobre la actividad proteolítica durante el desarrollo larvario han medido la actividad enzimática en espacios de tiempo de varios días, como una indicación de la condición nutricional de las larvas en periodos largos. Pocos estudios presentan datos sobre la variación de la actividad proteolítica en periodos cortos menores a un día (Pedersen y Hjelmeland 1988; Ueberschär 1993). En García-Ortega *et al.* (2000b) se encuentran los primeros datos reportados sobre los cambios en la actividad proteolítica de las larvas de peces en periodos menores a una hora. La

información obtenida de esa investigación revela la capacidad de las larvas para la digestión en cada una de las alimentaciones durante el día. Los primeros cambios en la actividad proteolítica del intestino de bagre fueron observados dentro de los primeros 30 minutos después de la alimentación. Estos constituyen cambios rápidos de actividad de las proteasas e indican una rápida secreción de enzimas y utilización en respuesta a la ingestión del alimento. Lo anterior confirma algunas observaciones previas en las larvas del arenque (Pedersen *et al.*, 1987; Ueberschär 1993). Esos resultados además indican que, cuando se estudian los procesos fisiológicos de la ingestión y digestión del alimento en las larvas de peces, se debe tener cuidado en seleccionar los tiempos de muestreo. Ya que existen variaciones significativas en la actividad proteolítica después de la alimentación, es decir, se pueden esperar actividades bajas inmediatamente (dentro de una hora) después de la ingestión del alimento (debido al uso inmediato de la enzimas disponibles para la digestión del alimento) con un subsecuente incremento en la actividad hasta la próxima alimentación. El tiempo para alcanzar las actividades proteolíticas mínimas y máximas después de la alimentación está probablemente relacionada al tipo de alimento y es dependiente de la edad y la especie. Son de esperarse actividades proteolíticas bajas cuando el pez está comiendo constantemente. En larvas que se alimentan solamente una vez al día o cuando existen periodos largos entre alimentaciones, la actividad proteolítica puede alcanzar niveles mucho más altos horas después del consumo del alimento. La respuesta rápida de las enzimas digestivas a la ingestión del alimento sustenta la idea de la existencia de procesos de digestión y asimilación del alimento altamente eficientes en larvas de peces, los cuales son necesarios para garantizar sus altas tasas de crecimiento. En las larvas de *C. gariepinus* la tasa específica de crecimiento se incrementa asintóticamente hasta un 63.9% del peso por día entre los primeros tres días después del inicio de la alimentación exógena, y en promedio, la tasa de crecimiento es de 41% durante los primeros 10 días (Verreth y Den Bieman 1987). Aunque el sistema digestivo en el bagre africano se desarrolla completamente solo hasta días después del inicio de la alimentación exógena, las larvas ya tienen la suficiente capacidad para digerir y absorber los nutrientes de los organismos del alimento vivo a partir del inicio de la alimentación exógena (Verreth *et al.* 1992).

Las larvas del bagre digieren los nauplios de *Artemia* muy rápidamente. En menos de cuatro horas los nauplios son completamente digeridos. Entonces resulta obvio que cuando los alimentos artificiales para larvas son formulados y preparados, deben seleccionarse ingredientes altamente digeribles. Asimismo, durante el cultivo de larvas, el tiempo entre una alimentación y otra debe ser suficiente para permitir a las larvas una digestión adecuada del alimento. Es por ello que la frecuencia óptima de alimentación debe ser determinada para cada especie bajo estudio. En algunas especies, parte del alimento puede ser evacuado antes de que sea completamente digerido si ocurre un consumo de nuevo alimento antes de finalizar la digestión.

Son necesarias las enzimas exógenas para la digestión del alimento?

En las larvas de *C. gariepinus* el sistema digestivo se vuelve completamente funcional en el día 5 después del inicio de la alimentación exógena (Verreth *et al.*, 1992). Sin embargo, las larvas tienen la capacidad para digerir y asimilar los nutrientes del alimento vivo a partir del día 1. De manera similar, las larvas del pez blanco *Coregonus lavaretus* (Segner *et al.*, 1989), del mero *Dicentrarchus labrax* (Cahu y Zambonino Infante, 1994), del arenque *Clupea harengus* (Pedersen *et al.*, 1987) y del rodaballo *Scophthalmus maximus* (Segner *et al.*, 1994) tienen la capacidad para una digestión óptima del alimento vivo al inicio de su alimentación exógena. Por lo que, la hipótesis de que las larvas de peces tienen baja producción de enzimas y por lo tanto tienen poca capacidad digestiva (Dabrowski y Glogowski, 1977, Lauff y Hofer, 1984; Munilla-Moran, *et al.*, 1990; Kolkovski *et al.*, 1993) puede

subestimar la capacidad para la digestión del alimento por las larvas de peces. Estos estudios sugieren que la deficiencia en la digestión de proteína puede ser compensada por el suministro de enzimas digestivas provenientes de los organismos del alimento vivo. Las diferencias funcionales en el tracto digestivo entre las especies de peces pueden explicar las diferencias en la utilización de la proteína del alimento y en el uso de las enzimas digestivas entre larvas de diferentes especies (Kawai e Ikeda, 1973; Hofer y Nasir Uddin, 1985; Baragi y Lovell, 1986; Segner *et al.*, 1989; Cahu *et al.*, 1999). La hipótesis de que las enzimas exógenas son necesarias para apoyar los procesos digestivos en las larvas de peces ha sido cuestionada en varias publicaciones. En algunas especies se ha demostrado que las enzimas del alimento vivo no tienen una contribución significativa en la digestión larvaria del alimento (Zambonino Infante y Cahu, 1994; Moyano *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 1997; Kurokawa *et al.*, 1998). Para evaluar la importancia de las enzimas en el alimento en la digestión de las larvas del bagre africano, la actividad proteolítica en los quistes desencapsulados de *Artemia* y en las larvas después de la alimentación con quistes fueron determinadas (García-Ortega *et al.*, 1998; 2000a; 2000b). La actividad proteolítica en los quistes desencapsulados y nauplios de *Artemia* no fue significativamente diferente. Por lo tanto, respecto al suministro hipotético de enzimas exógenas a las larvas de peces, no existe diferencia en alimentar a las larvas con quistes o con nauplios. Sin embargo, el mayor crecimiento en los peces es logrado cuando se alimentan con nauplios. Para determinar la importancia de las enzimas exógenas, la cantidad de quistes desencapsulados de *Artemia* ingeridos por las larvas fue cuantificado (García-Ortega *et al.*, sometido(a)). La contribución de las enzimas exógenas de los quistes de *Artemia* para al total de la actividad proteolítica medida en las larvas de bagre fue calculada y corresponde a menos del 1%.

Calidad de la proteína en el alimento

En los párrafo anteriores se ha mencionado que en varias especies de peces, las larvas tienen la capacidad para la digestión del alimento desde la primera alimentación exógena (Pedersen *et al.*, 1987; Segner *et al.*, 1989; Verreth *et al.*, 1992; Cahu y Zambonino Infante, 1994; Segner *et al.*, 1994). Esto significa que el éxito de las dietas artificiales para larvas de peces depende más de sus propiedades físicas y nutricionales que de la capacidad de las larvas para digerir el alimento. Las dietas artificiales deben satisfacer los requerimientos nutricionales establecidos por los procesos fisiológicos en las larvas de peces durante su desarrollo. En párrafos anteriores ya fué discutido que durante el desarrollo en la fase larvaria, la mayoría de las especies de peces no tienen un estómago funcional, y que la digestión de proteína depende en gran parte en la actividad proteolítica de la tripsina. No existe una pre-digestión de proteína por medio de la denaturación ácida en el estómago y por la acción de la pepsina. Bajo tales circunstancias, la digestión de la proteína en el alimento para larvas puede variar de acuerdo a la fuente de proteína y al proceso al que fueron sometidos los ingredientes durante la manufactura del alimento. Estos aspectos fueron estudiados para elucidar la diferencia entre la estructura de la proteína y su digestibilidad en el alimento vivo y en las dietas artificiales (García-Ortega *et al.*, 2000a; 2000c).

Importancia de los amino ácidos y de la estructura de la proteína en el alimento

La mayoría de las investigaciones sobre nutrición en larvas de peces se ha concentrado en los requerimientos y la utilización de los lípidos y ácidos grasos (Watanabe y Kiron, 1994; Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1997). Sin embargo, la proteína y los amino ácidos también son importantes para el desarrollo de las larvas (Fyhn, 1989). La proteína es el principal componente en la materia seca de *Artemia* y debido a que la composición de proteína y amino ácidos entre quistes y nauplios no es significativamente diferente, algunos factores de calidad pueden tener un efecto importante en el crecimiento de las larvas de peces. Probablemente la proteína está presente en pequeños péptidos o en una forma más fácil de digerir en los nauplios que en los quistes. Para obtener evidencia que apoye esta hipótesis, la digestibilidad de la proteína en *Artemia* y la caracterización de su tamaño molecular fué investigada (García-Ortega *et al.*, 2000c; sometido(b)). De acuerdo con varios autores (Fyhn, 1989; Walford y Lam, 1993; Segner *et al.*, 1994; Rønnestad *et al.*, 1999), la inclusión de amino ácidos libres y de péptidos de bajo peso molecular en las dietas iniciales podría facilitar la digestión y absorción de proteína en las larvas de peces. El alto contenido de amino ácidos libres en los organismos del zooplancton (Dabrowski y Rusiecki, 1983; Fyhn *et al.*, 1993) corrobora esta idea. Adicionalmente, el pool de amino ácidos en los huevos y larvas de saco vitelino de los peces marinos consiste principalmente de amino ácidos libres, los cuales son agotados durante la etapa de saco vitelino. Lo anterior sugiere un papel especial de los amino ácidos libres en el metabolismo de los estadios de vida tempranos. Después de la absorción del saco vitelino, los peces dependen de una fuente similar de amino ácidos, los cuales son provistos por los organismos del zooplancton en su habitat natural. Asimismo, algunos estudios sobre las capacidades proteolíticas de las larvas de peces han sugerido que la incorporación de pequeños péptidos o de hidrolizados de proteína en las dietas para larvas mejoran los procesos de desarrollo en el tracto digestivo de las larvas (Cahu y Zambonino Infante, 1995; Zambonino Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999). Toda esta información sustenta la hipótesis de que la estructura de la proteína en las dietas para larvas puede ser de gran importancia para determinar su digestibilidad. Los resultados de nuestras investigaciones indican que la mayor parte de la proteína en los nauplios de *Artemia* consiste en proteínas de tamaño pequeño con un peso molecular entre 7.4 y 49.2 kiloDaltons (kDa), y las proteínas en los quistes tienen un peso de entre 29.4 a 82 kDa.

Digestibilidad de la proteína en el alimento vivo y en dietas artificiales

Los resultados obtenidos con dietas artificiales como alimento inicial para larvas de peces pueden mejorarse incluyendo en el alimento componentes que sean altamente digeribles. Para evaluar la digestibilidad de las dietas para larvas de peces, se desarrolló una nueva técnica *in vitro* para determinar la digestibilidad de la proteína (García-Ortega *et al.*, 2000c). Esta nueva técnica permite la simulación de las condiciones en las cuales ocurre la digestión de la proteína en un medio alcalino como lo es el tracto digestivo de las larvas. Los resultados confirmaron una alta digestibilidad de proteína en los quistes desencapsulados y nauplios de *Artemia* (87.1 y 86.2% respectivamente) y de microdietas que contienen quistes como fuente de proteína. La técnica también fue usada para examinar si el procesamiento de los ingredientes afecta la calidad nutricional de las dietas para larvas.

Durante el procesamiento del alimento, las propiedades nutricionales de la proteína pueden ser afectadas. Los cambios en las propiedades de la proteína pueden ocasionar, al mismo tiempo, efectos en la calidad nutricional total del alimento. Algunos de estos efectos han sido estudiados en *Artemia* (García-Ortega *et al.*, sometido(b)). Una baja digestibilidad de proteína se encontró en microdietas hechas a base de harina de pescado, la cual es comúnmente utilizada como fuente de proteína en los

alimentos para peces. Las microdietas hechas a base de quistes desencapsulados de *Artemia* tuvieron una mejor digestibilidad. Esto puede ser el resultado de el procesamiento del alimento sobre la calidad de la proteína. El procesamiento del alimento con calor cambia la conformación de la proteína y consecuentemente su calidad nutricional (Boye *et al.*, 1997). Estos cambios en la estructura de la proteína pueden ser benéficos o negativos dependiendo de las condiciones de calentamiento (de Wet, 1983) y de las preferencias del sistema digestivo de las larvas. Los efectos del calor en la calidad de proteína de los quistes de *Artemia* fueron estudiados (García-Ortega *et al.*, 2000a), y los resultados indican que el tratamiento de los quistes desencapsulados con calor incrementó la desnaturalización y disminuyó la solubilidad de la proteína. Calentar a 80°C tuvo un efecto negativo sobre la digestibilidad *in vitro* de la proteína de quistes desencapsulados comparados con quistes no sometidos al calor. Estos resultados resaltan la importancia del procesamiento del alimento cuando se manufacturan dietas para larvas. En experimentos posteriores con microdietas preparadas con harina de pescado y dietas comerciales, éstas produjeron el crecimiento más bajo en larvas de *C. gariepinus*. De manera interesante, estas mismas dietas tuvieron la digestibilidad *in vitro* de proteína más baja comparadas con microdietas hechas a base de quistes desencapsulados de *Artemia*. De esta forma se sugiere que las altas temperaturas y presiones de cocción utilizadas en la preparación de alimentos comerciales y/o harina de pescado están asociados a estos resultados.

Debido a la alta digestibilidad de la proteína en los quistes y nauplios de *Artemia*, su capacidad autolítica y la solubilidad de la proteína deben considerarse para explicar su éxito como alimento para larvas de peces. Cuando se utiliza *Artemia* en experimentos de digestión, se pueden esperar altos coeficientes de digestibilidad debido a la actividad autolítica presente en los organismos del zooplancton (Hjelmeland *et al.*, 1993). En estudios con larvas del arenque *Clupea harengus*, se observó que secretan más tripsina pancreática cuando se alimentan de organismos del alimento vivo en comparación con esferas de plástico (Hjelmeland *et al.*, 1988). Esto probablemente se debe a un estímulo hormonal para la secreción de enzimas en el páncreas ocasionada por el exoesqueleto de la presa o por productos de degradación derivados del alimento vivo (Pedersen 1984; Hjelmeland *et al.*, 1988). Recientemente, ésta hipótesis también se toma en cuenta para explicar las altas tasas de actividad de tripsina en larvas del mero *Dicentrarchus labrax* alimentadas con *Artemia*, comparadas con las larvas alimentadas con dietas artificiales (Nolting *et al.*, 1999). Pocas publicaciones se han enfocado al estudio de la capacidad de autólisis de los organismos del alimento vivo y su efecto en los procesos digestivos de las larvas de peces. No obstante, la autólisis y los productos de degradación de los organismos del alimento vivo son factores que están ausentes en las dietas artificiales. Un enfoque para compensar por la falta de autólisis en las dietas artificiales es el procesar los ingredientes del alimento para obtener una dieta más digerible. Procesos como la pre-digestión por medio de hidrólisis enzimática o el uso de hidrolizados de proteína de pescado pueden mejorar la digestibilidad de las dietas artificiales para larvas.

Consumo del alimento en larvas de peces

Además de las investigaciones que se han descrito en los párrafos anteriores respecto a la capacidad digestiva de las larvas de peces, el consumo y la evacuación del alimento en las larvas también fue evaluado. La estimación del consumo del alimento en larvas de peces es difícil porque se carece de métodos precisos para evaluar la ingestión y la evacuación del alimento. Para estudiar el consumo del alimento durante el desarrollo de las larvas de peces un nuevo método fue desarrollado (García-Ortega

et al., sometido (a). Este nuevo método consiste en medir la acumulación temporal del ácido ascórbico sulfatado (AAS) en las larvas de peces después de ser alimentadas con quistes de *Artemia*. Los experimentos mostraron que no existe biosíntesis o degradación de AAS en larvas del bagre. Estos resultados apoyan la hipótesis de que en las fases larvaria y juvenil los peces teleostos no son capaces de utilizar AAS como precursor de ácido ascórbico (Dabrowski *et al.*, 1990a; Dabrowski *et al.*, 1990b). Las altas tasas de consumo de alimento encontradas para larvas del bagre (46.5 a 53.8% del peso seco de la biomasa) durante los primeros días de la alimentación exógena son congruentes con los requerimientos de nutrientes para mantener esas altas tasas de crecimiento en estas etapas del desarrollo. Los resultados de este trabajo fueron similares a aquellos encontrados para las larvas y juveniles de cinco ciprínidos y la perca, las cuales presentan tasas de consumo arriba de 50% del peso seco de la biomasa (Marmulla y Rösch, 1990).

Probablemente, uno de los aspectos más interesantes de nuestros estudios en el consumo del alimento es que se hace disponible un método fácil y preciso para medir el consumo del alimento en las primeras etapas de alimentación de los peces. Utilizando esta nueva técnica se pueden realizar estudios nutricionales más detallados porque el consumo de alimento puede estimarse con un alto grado de precisión. Esta técnica fue utilizada para obtener la información necesaria para estimar el consumo de enzimas exógenas en las larvas de peces para determinar su contribución a la digestión total del alimento en las larvas.

Dietas artificiales para larvas de peces

Las dietas nutricionalmente adecuadas son esenciales para el éxito de la larvicultura en muchas especies de peces. Varias dietas artificiales para larvas han sido probadas con éxito relativo. De las dietas que fueron probadas, los mejores resultados se obtuvieron con las dietas que incluían en su formulación levadura o proteína derivada de organismos unicelulares, como fue demostrado para las larvas del pez blanco (Rösch y Appelbaum, 1985), la carpa común (Dabrowski y Poczyczynski, 1988) y el bagre africano (Uys y Hecht, 1985). Sin embargo, con éstas dietas, el crecimiento y sobrevivencia obtenidos fueron inferiores que los logrados con el alimento vivo. Se pueden obtener tasas de crecimiento más altas al combinar en la alimentación las dietas artificiales con un suplemento de alimento vivo o mediante la co-alimentación (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Fernández-Díaz y Yúfera, 1997; Rosenlund *et al.*, 1997). La incorporación de quistes desencapsulados de *Artemia* en la formulación de microdietas para larvas de peces puede ser comparada con este enfoque de la co-alimentación. El uso de quistes de *Artemia* como dieta modelo en estudios nutricionales con larvas de peces se fortalece por los mejores resultados en la utilización de las dietas cuando los quistes son incluidos en las microdietas. También se permite el estudio de algunos factores en el alimento vivo los cuales pueden tener un efecto positivo para la utilización de las dietas por las larvas. Recientemente, el uso de hidrolizados de proteína de pescado en las dietas para larvas ha mejorado la utilización de las dietas y el crecimiento, comparado a las fuentes convencionales de proteína (Cahu y Zambonino Infante, 1995; Berge y Storebakken, 1996; Carvalho *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999). Los hidrolizados están constituidos de proteína que fue pre-digerida por hidrólisis enzimática para obtener péptidos de tamaño pequeño. Sin embargo, el uso de altas cantidades de hidrolizados de proteína puede tener efectos no deseados en la calidad de la dieta y en el crecimiento de los peces (Carvalho *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999). Por esto se requiere de más investigación en este campo para obtener formulaciones adecuadas para dietas a ser utilizadas en diferentes especies.

CONCLUSIONES

La pregunta de porqué el alimento vivo es mejor para las larvas de peces que las dietas artificiales aún no ha recibido una respuesta definitiva. Sin embargo, se han logrado avances significativos respecto al conocimiento de los procesos digestivos en las larvas y nuevas técnicas fueron desarrolladas para ayudar en los estudios nutricionales con larvas de peces.

Lo que hemos aprendido con el trabajo aquí descrito es que la composición nutricional de los quistes desencapsulados y nauplios de *Artemia* es similar y ambos tienen altos coeficientes de digestibilidad. Un próximo paso sería el de simular estas propiedades en microdietas artificiales. Esto ya se ha hecho parcialmente con resultados alentadores. Sin embargo, se requiere de más información sobre las propiedades funcionales de las proteínas como un factor que determina la calidad nutricional en el alimento para larvas de peces. En este sentido, se ha enfatizado que los efectos del procesamiento del alimento deben ser considerados en la elaboración de dietas artificiales, debido a los efectos positivos o negativos que éstos pueden tener en la calidad nutricional de las dietas.

El presente trabajo también apoya el uso de *Artemia* como dieta modelo en los estudios dedicados al desarrollo de dietas artificiales para larvas de peces sin estómago, como es el caso de la mayoría de los peces marinos en cultivo. El mejor desempeño del alimento vivo sobre las dietas artificiales indica que la mayor parte de los nutrientes requeridos y otros factores están incluidos en el mismo alimento vivo. Así, se sugiere que se puede aprender más al probar en experimentos con larvas de peces las dietas que incluyan en su formulación *Artemia* u otro organismo del alimento vivo, que el probar nuevos ingredientes o fuentes de proteína comúnmente utilizadas en la elaboración de alimentos para juveniles o adultos.

REFERENCIAS

- Baragi, V., Lovell, R.T., 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 115, 478-484.
- Berge, G.M., Storebakken, T., 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 145, 205-212.
- Boye, J.I., Ma, C.-Y., Hardwalkar, V.R., 1997. Thermal denaturation and coagulation of proteins. In: Damodaran, S., Paraf, A. (Eds.), *Food proteins and their applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 25-56.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213-222.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431-437.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109-119.
- Carvalho, A.P., Escaffre, A.-M., Oliva Teles, A., Bergot, P., 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquacult. Int.* 5, 361-367.
- Dabrowski, K., Glogowski, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54, 129-134.
- Dabrowski, K., Rusiecki, M., 1983. Content of total and free amino acids in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture* 30, 31-42.
- Dabrowski, K., Poczyczynski, P., 1988. Comparative experiments on starter diets for grass carp and common carp. *Aquaculture* 69, 317-332.
- Dabrowski, K., Bergot, P., Kaushik, S., 1984. Rearing of coregonid larvae using dry and live food. Preliminary data. *Aquaculture* 41, 11-20.

- Dabrowski, K., El-Fiky, N., Köck, G., Frigg, M., Wieser, W., 1990a. Requirements and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 91, 317-337.
- Dabrowski, K., Lackner, R., Doblander, C., 1990b. Effect of dietary ascorbate on the concentration of tissue ascorbic acid, dehydroascorbic acid, ascorbic sulfate, and activity of ascorbic sulfate sulfohydrolase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 1518-1525.
- Díaz, M., Moyano, F.J., García-Carreño, F.L., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Int.* 5, 461-471.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed microcapsules. *Aquaculture* 153, 93-102.
- Flüchter, J., 1984. Substance essential for metamorphosis of fish larvae extracted from *Artemia*. *Aquaculture* 27, 83-85.
- Fyhn, H.J., 1989. First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy? *Aquaculture* 80, 111-120.
- Fyhn, H.J., Finn, R.N., Helland, S., Rønnestad, I., Lømsland, E., 1993. Nutritional value of phyte and zooplankton as live food for marine fish larvae. In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L., Tvinnerheim, K. (Eds.), *Fish Farming Technology*, Balkema, Rotterdam, pp. 121-126.
- García-Ortega, A., Verreth, J.A.J., Segner, H., Coutteau, P., Huisman, E.A., Sorgeloos, P. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161, 501-514.
- García-Ortega, A., Verreth, J., Segner, H. 2000b. Post-prandial protease activity in the digestive tract of African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae fed decapsulated cysts of *Artemia*. *Fish Physiol. Biochem.*, 22: 237-244.
- García-Ortega, A., Koussoulaki, A., Boer, H., Verreth, J. 2000c. *In vitro* protein digestibility of *Artemia* cysts and nauplii, and of microbound diets for larval fish. *Aquacult. Res.* 31, 475-478.
- García-Ortega, A., Verreth, J., Van Hoornyc, A., Segner, H. 2000a. Heat treatment affects protein quality and protease activity in decapsulated cysts of *Artemia* when used as starter food for larvae of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquacult. Nutr.* 6, 25-31.
- García-Ortega, A., Verreth, J., Vermis, K., Nelis, H.J., Sorgeloos, P., Verstegen, M.W.A. A new method for the quantification of *Artemia* consumption in nutrition studies with fish larvae. Sometido (a)
- García-Ortega, A., Huisman, E.A., Sorgeloos, P., Verreth, J. Evaluation of protein quality in microbound starter diets for larvae of African catfish (*Clarias gariepinus*) made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal as protein source. Sometido (b).
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fish.* 16, 59-77.
- Hagiwara, A., Balompapueng, M.D., Munuswamy, N., Hirayama, K., 1997. Mass production and preservation of the resting eggs of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* and *B. rotundiformis*. *Aquaculture* 155, 223-230.
- Hjelmeland, K., Pedersen, B.H., Nilssen, E.M., 1988. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacea prey. *Marine Biology* 98, 331-335.
- Hjelmeland, K., Ugelstad, I., Olsen, Y., 1993. Proteolytic activity and *post mortem* autolysis in prey for marine fish larvae. In: *Physiological and biochemical aspects of fish development* (ed. by Walther, B.T. & Fyhn, H.J.), pp. 229-232. Univ. of Bergen, Norway.
- Hofer, R., Nasir Uddin, A., 1985. Digestive processes during the development of the roach *Rutilus rutilus* L. *J. Fish Biol.* 26, 683-689.
- Hofer, R., Bürkle, O. 1986. Daily food consumption, gut passage rate and protein utilization in whitefish larvae (*Coregonus sp.*). *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 22, 189-196.
- Inui, Y., Tagawa, M., Miwa, S., Hirano, T., 1989. Effect of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in premetamorphic flounder larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74, 406-410.
- Jones, D.A., Kamarudin, M.S., Le Vay, L., 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 199-210.
- Kawai, S., Ikeda, S., 1973. Studies on digestive enzymes of fishes. III. Development of digestive enzymes of rainbow trout after hatching and effect of dietary change on activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39, 817-823.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 203-209.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. *Aquaculture* 161, 491-499.
- Lam, T.J., 1980. Throxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon* (*Tilapia*) *mossambicus*, Ruppel. *Aquaculture* 21, 287-291.

- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335-346.
- Léger, P., Bengtson, D.A., Simpson, K.L., Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of *Artemia* as food source. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24, 521-623.
- Marmulla, G., Rösch, R., 1990. Maximum daily ration of juvenile fish fed on living natural zooplankton. *J. Fish Biol.* 36, 789-801.
- Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzymes activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15, 121-130.
- Munilla-Moran, R., Stark, J.R., Barbour, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 88, 337-350.
- Nolting, M., Ueberschär, B., Rosenthal, H., 1999. Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 138-142.
- Pector, R., Tackaert, W., Abelin, P., Ollevier, F., Sorgeloos, P., 1994. A comparative study on the use of different preparations of decapsulated *Artemia* cysts as food for rearing African catfish (*Clarias gariepinus*) larvae. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 366-370.
- Pedersen, B.H., 1984. The intestinal evacuation rates of larval herring (*Clupea harengus* L.) predated on wild plankton. *Dana* 3, 21-30.
- Pedersen, B.H., Nilssen, E.M., Hjelmeland, K., 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Marine Biology* 94, 171-181.
- Pedersen, B.H., Hjelmeland, K., 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods. *Marine Biology* 97, 467-476.
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L., Mugnier, C., 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *J. World Aquacult. Soc.* 24, 211-224.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Rønnestad, I., Fyhn, H.J., 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Rev. Fish. Sci.* 1, 239-259.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177, 201-216.
- Rösch, R., Appelbaum, S., 1985. Experiments on the suitability of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus* L. *Aquaculture* 48, 291-302.
- Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155, 183-191.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.
- Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., von Poeppinghausen, K.J., 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* 35: 249-263.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology* 119, 471-486.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P., Tackaert, W., Versichele, D., 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in Aquaculture. Faculty of Agriculture, State University of Ghent, Belgium. pp 319.
- Ueberschär, B., 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. pp. 233-237. Edited by Walther, B.T. and Fyhn, H.J. University of Bergen, Norway.
- Uys, W., Hecht, T., 1985. Evaluation and preparation of an optimal dry feed for the primary nursing of *Clarias gariepinus* larvae (Pisces: Clariidae). *Aquaculture* 47, 173-183.
- Verreth, J., Den Bieman, H., 1987. Quantitative feed requirements of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell) larvae fed with decapsulated cysts of *Artemia*. I. The effect of temperature and feeding level. *Aquaculture* 63, 251-267.
- Verreth, J., Storch, V., Segner, H., 1987. A comparative study on the nutritional quality of decapsulated *Artemia* cysts, micro-encapsulated egg diets and enriched dry feeds for *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture* 63, 269-282.
- Verreth, J., Torreele, E., Spazier, E., Van der Sluiszen, A., Rombout, J., Booms, R., Segner, H., 1992. The development of a functional digestive system in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *J. World Aquacult. Soc.* 23, 286-298.

- Walford, J., Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzymes activity in seabass (*Late calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109, 187-205.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34, 115-143.
- Watanabe, T., Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture* 124, 223-251.
- de Wet, P.J., 1983. Effect of processing on nutritive value of feeds: Protein. In: *Handbook of Nutritive Value of Processed Food*, (Rechigl, M. ed.), pp. 321-341. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 399-408.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127, 608-614.