

Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858

M. Sáenz de Rodrigáñez¹, F. J. Alarcón¹, M. I. Martínez², F. Ruiz²,
M. Díaz¹ y F. J. Moyano¹

¹ 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

² 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 caracterizan las proteasas digestivas de *Solea senegalensis* Kaup, 1858. El óptimo de actividad para el extracto estomacal se situó en valores de pH entre 2,0 y 2,5 y para los intestinales entre pH:9,5 y pH:10,0. El extracto de estómago se mostró muy estable a distintos valores de pH, excepto a pH:12,0. Los extractos intestinales mostraron ser inestables a pH ácido. Los óptimos de temperatura se localizaron entre 37 y 40 °C. Las proteasas fueron termolábiles por encima de 50 °C. El uso de sustratos e inhibidores específicos evidenció la presencia mayoritaria de pepsina en el estómago y de serina proteasas de tipo tripsina y quimotripsina en el intestino. Los zimogramas confirmaron la existencia de una sola proteasa en el extracto de estómago y de siete fracciones activas en el intestino.

Palabras clave: Proteasas digestivas, tripsina, quimotripsina, inhibidores de proteasas, zimogramas, lenguado senegalés.

ABSTRACT

*Characterization of digestive proteases in the Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup, 1858*

*The digestive proteases of Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup, 1858 were studied. Acid proteases showed their peak of activity between pH:2.0 and pH:2.5. Optimum activity for intestinal proteases was found in the range of pH:9.5-10.0. The results of acid protease stability under different pH indicated that only pH 12.0 affect these enzymes. Alkaline proteases were highly sensitive to acidic pH. Temperature optimums were found at 37-40 °C. Thermal stability analysis showed that proteases kept up their activities until 50 °C. The use of specific proteases inhibitors showed the presence of aspartic proteases in stomach and serine proteases (trypsin and chymotrypsin-like) in the intestine. Zymograms confirm the existence of a single protease in stomach extract, and seven active fractions in the intestine extracts.*

Keywords: Digestive proteases, trypsin, chymotrypsin, protease inhibitors, zymograms, Senegal sole.

INTRODUCCIÓN

Desde finales de la década 1981-1990 se ha venido investigando a propósito del desarrollo de técnicas de cultivo de nuevas especies con el

objetivo de diversificar los cultivos marinos tradicionales, como los de dorada *Sparus aurata* L., 1758, lubina *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) o rodaballo *Psetta maxima* (L., 1758). El lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 es una de

las denominadas nuevas especies que ha despertado el interés del sector acuícola en los últimos años (Dinis *et al.*, 1999). Su valor comercial es considerable, la tasa de crecimiento elevada y varias empresas están comenzando a acometer su engorde a escala industrial; por todo ello se le ha considerado como un posible candidato para sustituir el exceso de producción de dorada que hay en Europa. Además de presentar las ventajas enumeradas, es bastante tolerante a distintas condiciones ambientales de cultivo (oxígeno, salinidad, temperatura, etc.). No obstante, aún es necesario mejorar varios aspectos relacionados con el destete y las condiciones del preengorde (Ribeiro *et al.*, 2002), ya que estos dos factores limitan el desarrollo de su cultivo a una escala similar a la que ya existe para el rodaballo. Entre las distintas facetas de estudio que es necesario abordar, la nutrición es un aspecto cuya evaluación es obligada de cara al cultivo de cualquier organismo, lo que significa establecer sus requerimientos nutritivos y sus capacidades digestivas y de transformación de los alimentos. Además, se sabe que las características de las enzimas presentes en el aparato digestivo son un reflejo del hábito alimentario de cada especie (Jonas *et al.*, 1983). El conocimiento generado a través de este tipo de estudios tiene una aplicación directa en la fase de destete de esta especie, ya que, utilizando como referencia el patrón de los individuos juveniles, se podrá determinar en qué

momento el equipo de proteasas digestivas de las larvas está plenamente desarrollado. Dentro de este contexto, el presente trabajo pretende aportar conocimiento sobre las capacidades digestivas de los juveniles de lenguado senegalés, en particular de las proteasas, enzimas responsables de la hidrólisis de la proteína alimentaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de *S. senegalensis*, de 40 g de peso, fueron proporcionados por la empresa Predomar S.L. (en Carboneras, Almería, sureste de la península Ibérica). Los peces fueron alimentados dos veces al día, desde el destete hasta el momento de su sacrificio, con pienso comercial Gemma (55 % proteína y 12 % lípidos) (Skretting, España). Los animales fueron sacrificados en baño de hielo e inmediatamente disecados con objeto de extraer su sistema digestivo. En el tracto digestivo se diferenciaron las siguientes regiones; estómago (E), intestino proximal (I-1) e intestino distal (I-2). El criterio de separación entre las distintas regiones digestivas se basó en las diferencias histológicas que existían entre ellas (estudios previos) con el objetivo de comprobar si estas diferencias reflejaban cambios en las características de las proteasas que actúan en cada porción del digestivo (figura 1).

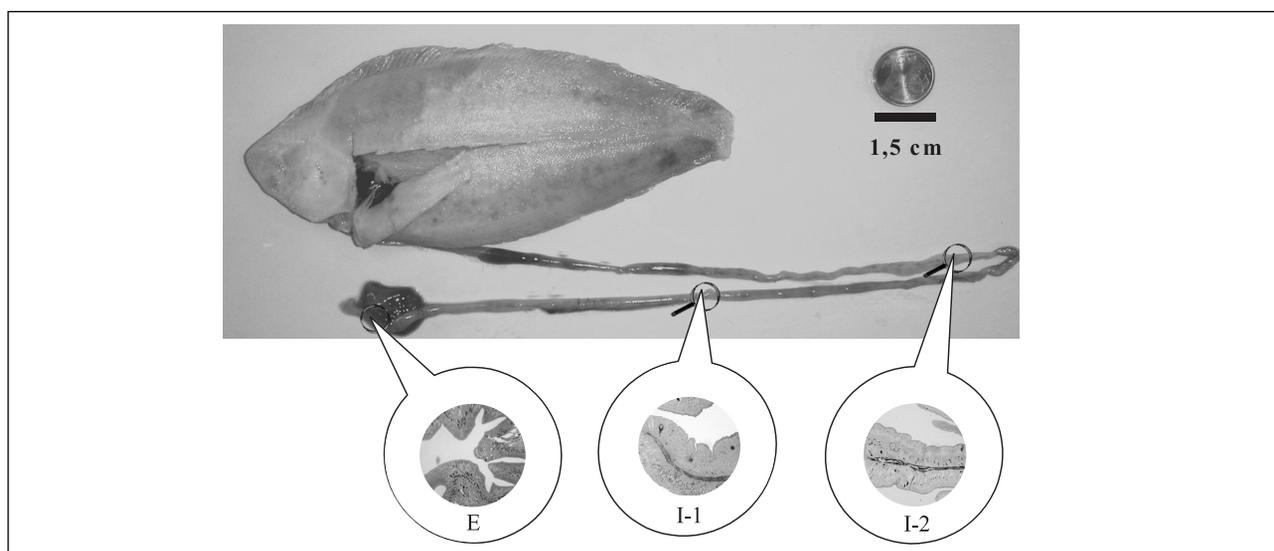


Figura 1. Sistema digestivo de *S. senegalensis* e histología de las tres secciones estudiadas. (E): estómago; (I-1): intestino proximal; (I-2): intestino distal.

La longitud intestinal relativa (LIR) es un índice que relaciona la longitud del intestino respecto a la longitud total del pez y que se utiliza como indicador del hábito alimentario del pez. Para la determinación del índice LIR se analizaron 50 individuos al azar y se calculó el valor medio de este índice. Los extractos enzimáticos fueron preparados tras homogeneizar las porciones digestivas en agua y centrifugar a 12 500 G a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso (Moyano *et al.*, 1996). La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el método de Bradford usando albúmina bovina (1 mg/ml) como estándar (Bradford, 1976). La actividad proteasa ácida se determinó mediante la técnica de Anson (1938) modificada, utilizando como sustrato hemoglobina al 0,5 %. La actividad proteasa alcalina se evaluó usando el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984), usando caseína como sustrato (0,5 %) en tampón Tris-HCl 50 mM pH:9,0. En ambos casos, la mezcla de reacción (20 µl de enzima y 500 µl de sustrato) se incubó durante 45 minutos a 25 °C y la reacción enzimática se detuvo tras la adición de 500 µl de ácido tricloroacético al 20 %. La liberación de péptidos se cuantificó determinando a 280 nm la absorbancia del sobrenadante. También se determinó en los extractos intestinales, I-1 e I-2, la actividad tripsina usando como sustrato BAPNA (N α -benzoyl-DL-arginina-P-nitroanilida) según el método de Erlanger, Kokowsky y Cohen (1961) y la actividad quimotripsina con SAPNA (succinil-(Ala)2-Pro-Phe-p-nitroanilida) según la metodología descrita por Ásgeirsson y Bjarnason (1991).

En los tres extractos preparados se determinó el nivel de actividad proteolítica, el óptimo de pH y temperatura y la estabilidad de las proteasas a diferentes valores de pH y distintas temperaturas. Para determinar el efecto del pH sobre la actividad proteasa se empleó tampón universal (Stauffer, 1989) en el rango de pH de 1,0 a 7,0 para los extractos de estómago y pH de 5,0 a 12,0 para los extractos intestinales. La estabilidad al pH de la actividad proteasa en los preparados enzimáticos se determinó preincubando los extractos enzimáticos a distintos valores de pH, desde 2,0 hasta 12,0, durante 120 min antes de realizar el ensayo de actividad proteasa. A

continuación se determinó la actividad residual y se comparó con un control preincubado con agua destilada. La actividad residual se expresó en porcentaje de actividad con respecto al control. La temperatura óptima de las proteasas de estómago e intestino se determinó en el rango de temperatura de 5 °C a 70 °C. Para determinar la termoestabilidad de las proteasas se incubaron los extractos enzimáticos a diferentes temperaturas durante 120 min y, seguidamente, se determinó la actividad residual con respecto a un control mantenido a 25 °C.

Para evaluar el tipo de proteasas presentes en cada extracto se utilizó la batería de inhibidores de proteasas que usualmente se emplea en los estudios de caracterización enzimática (Alarcón *et al.*, 1998). Los inhibidores de proteasas fueron: PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo); SBTI (inhibidor trípico de la soja) y ovomucoide como inhibidores de serina proteasas; TLCK (cetona de tosil-lisina-clorometilo) como inhibidor de tripsina; ZPCK (cetona de carboxibenzo-xi-alanina-glicina-fenilalanina-clorometilo) y TPCK (cetona de tosil-fenilalanina-clorometilo) como inhibidores de quimotripsina; EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como inactivador de metal proteasas y pepstatina A como inhibidor de proteasas ácidas.

Finalmente la actividad proteolítica de los extractos de estómago se visualizó utilizando la metodología propuesta por Díaz *et al.* (1998) y los zimogramas de las proteasas alcalinas de los extractos intestinales se realizaron según la técnica descrita en García-Carreño, Dimes y Haard (1993). Adicionalmente, como controles se utilizaron dos extractos enzimáticos de peces marinos que previamente han sido caracterizados en el laboratorio –dorada *S. aurata* L., 1758 (Predomar, S.L., en Carboneras, Almería) y dentón *Dentex dentex* (L., 1758) (Centro Oceanográfico de Murcia del Instituto Español de Oceanografía, en Mazarrón)– y que fueron alimentados con los piensos comerciales que se usan habitualmente para el engorde de estas especies.

Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron por triplicado, y las comparaciones entre los valores medios de inhibición de los extractos intestinales se llevaron a cabo tras un análisis de varianza seguido de un test de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, la morfología del tracto digestivo de los peces es muy variable, lo que ilustra la diversidad de regímenes alimentarios y modos de vida de los mismos. En *S. senegalensis* el estómago se presenta como una pequeña bolsa situada después del esófago. Cerca del estómago se sitúa el hígado y, a continuación, un intestino muy largo (figura 1). La relación entre la longitud del tubo digestivo y la longitud corporal es un índice indicativo del hábito alimenticio de una especie (Elliot y Bellwood, 2003). Generalmente, los peces omnívoros poseen índices mayores que los peces carnívoros, ya que es habitual que éstos últimos muestren valores de este índice inferiores a 1. La longitud intestinal relativa (LIR) en *S. senegalensis* es superior a 1 ($2,81 \pm 0,38$, $n = 30$), y se encuentra mucho más próximo al de peces omnívoros que al de carnívoros.

La actividad proteasa total de los extractos se resume en la tabla I. Tanto al expresar la actividad enzimática en unidades (u) por mg de proteína (u/mg proteína) como en u/mg de digestivo, se comprobó que la región del digestivo correspondiente al estómago contiene menor actividad proteolítica que las otras dos porciones intestinales. Los niveles de actividad proteasa alcalina de los extractos I-1 e I-2 superaron en más de dos órdenes de magnitud a la actividad proteasa ácida presente en el extracto E ($p < 0,05$). Por otra parte, los dos tipos de extractos intestinales mostraron valores similares, aunque con mayor variabilidad en el caso del extracto I-1 ($P > 0,05$).

La relación entre los valores de actividad proteasa ácida y los de actividad proteasa alcalina no se asemeja a la descrita en otras especies carnívoras (Alarcón *et al.*, 1998; Essed *et al.*, 2002),

en las que se observa un mayor nivel de actividad proteasa ácida estomacal en comparación con la actividad proteasa alcalina detectada en el intestino. Este hecho indica que en *S. senegalensis* la fase de digestión ácida que ocurre en el estómago podría tener menor importancia relativa que en otros peces provistos de estómago. Así, se ha descrito que las especies fundamentalmente carnívoras poseen niveles muy altos de proteasas ácidas en comparación con las especies omnívoras o herbívoras (Jonas *et al.*, 1983).

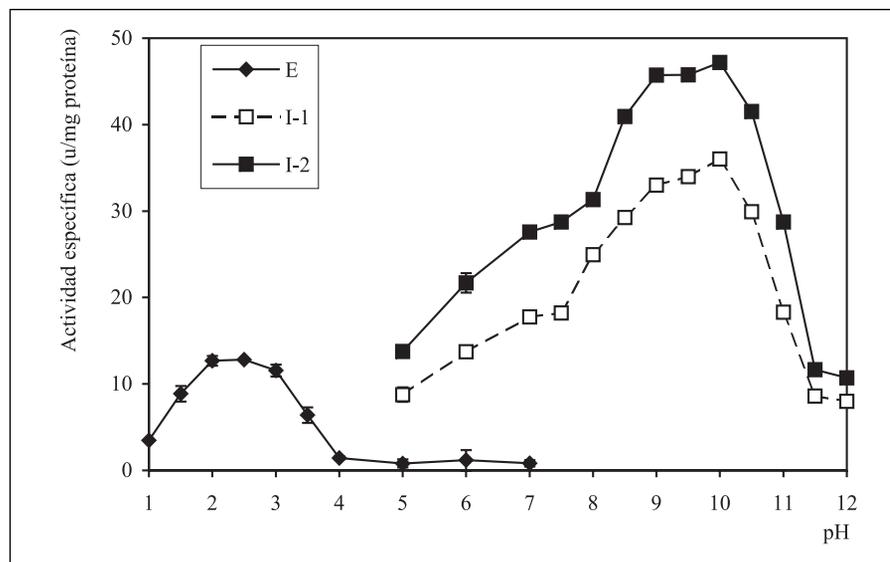
La respuesta de las proteasas digestivas de *S. senegalensis* al pH se muestra en la figura 2. Las proteasas ácidas presentes en el extracto estomacal mostraron un óptimo de actividad situado entre pH:2,0 y pH:3,0. Por su parte, las proteasas de los extractos intestinales tuvieron la misma respuesta al pH. En los dos casos se comprobó que el óptimo de actividad se localizaba en el rango de pH de 9,0 a 10,0, con un máximo bien definido para este último registro. La estabilidad a diferentes valores de pH de las proteasas en la especie estudiada se detalla en la figura 3. Se evidenció que las proteasas estomacales de *S. senegalensis* mantienen su actividad enzimática después de someterlas a un rango amplio de valores de pH, ya que sólo se vieron afectadas por un registro de éste muy alcalino (figura 3A). Por el contrario, para las proteasas intestinales se comprobó que a medida que el pH se hacía más ácido, éstas mostraron ser cada vez menos estables (figura 3B,C). Este efecto fue similar en los dos tipos de extractos intestinales.

El efecto del pH sobre las proteasas ácidas no difiere de los resultados observados en otras especies de peces marinos (Alarcón, 1997; Guillaume y Choubert, 1999; Essed *et al.*, 2002). Así,

Tabla I. Actividad proteasa de los tres tipos de extractos enzimáticos de *S. senegalensis*. Los resultados son la media \pm d.e. de tres determinaciones. Dentro de una misma columna, los valores medios con distinto superíndice (a, b) muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Región del digestivo	Proteína soluble (mg proteína/ml)	Actividad específica (u/mg proteína)	Actividad específica (u/mg de digestivo)
E	$8,8 \pm 1,7^a$	$10,5 \pm 2,8^b$	$185,6 \pm 48,1^b$
I-1	$9,2 \pm 2,3^a$	$21,3 \pm 7,3^a$	$391,9 \pm 132,6^a$
I-2	$7,9 \pm 2,1^a$	$29,0 \pm 1,1^a$	$460,3 \pm 13,8^a$

Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad proteasa ácida (E) y alcalina (I-1 e I-2) de los extractos enzimáticos de *S. senegalensis*.



la actividad máxima de las proteasas estomacales del lenguado senegalés se sitúa en un rango de pH de 2,0 a 2,5. La existencia de un óptimo bien definido en lenguado senegalés pone de manifiesto la presencia en el estómago de una única enzima con actividad proteolítica, hecho que es confirmado posteriormente en el zimograma de extractos estomacales (figura 4A). Por el contrario, en otras especies se ha comprobado que la presencia de un máximo menos acentuado y (o) de varias puntas de actividad en las curvas de pH indica la existencia de varias isoformas de pepsinas con diferentes óptimos de pH (De Oña *et al.*, 2005). Por otra parte, las proteasas estomacales mostraron ser estables a pH relativamente alcalinos. Esto constituye una ventaja adaptativa de los animales marinos, que traigan habitualmente importantes cantidades de agua salada (cuyo pH supera la neutralidad), ya que después de ingerirla, las proteasas estomacales no se inactivarían mientras no se alcanza el pH ácido en el interior del estómago. Las proteasas intestinales presentaron un óptimo bien definido en torno a pH:9,5-10,0 y mostraron ser activas en un rango de pH mucho más amplio que las proteasas estomacales (desde pH:5 hasta pH:12), fenómeno habitual en los extractos intestinales y que demuestra la contribución de varios tipos de proteasas (Alarcón *et al.*, 1998). En este caso, el zimograma reveló la existencia de siete fracciones activas en los extractos I-1 e I-2 (figura 4B).

La figura 5 muestra la influencia de la temperatura en la actividad de las proteasas digestivas de lenguado senegalés. El óptimo de actividad se encontró entre 35 y 40 °C en todos los extractos, seguido de una pérdida progresiva de la actividad enzimática a temperaturas superiores a 50 °C.

Estos resultados concuerdan con los descritos para otras especies de peces marinos, ya que es común que las enzimas de especies poiquilothermas alcancen sus óptimos de actividad a temperaturas inferiores que sus homólogas de animales homeotermos (Haard, 1992). De este modo, un óptimo de actividad a baja temperatura determina que las proteasas funcionen a pleno rendimiento a las temperaturas habituales del medio acuático. Por lo que respecta a la termoestabilidad de estas proteasas, en la figura 6 se ilustran los resultados obtenidos. En este caso, tanto las proteasas ácidas como las alcalinas mostraron una respuesta similar frente a esta variable. En los tres casos la actividad se mantiene en 60-90 % a temperaturas inferiores a 50 °C, llegando a perderse hasta 70-85 % de la misma cuando los extractos se mantienen durante dos horas a 50 °C. Con una perspectiva nutricional, la determinación de la termoestabilidad no tiene una aplicación directa en la acuicultura, pero esta peculiar característica de las enzimas de peces determina que sean buenas candidatas para su utilización en procesos biotecnológicos (Simpson y Haard, 1987).

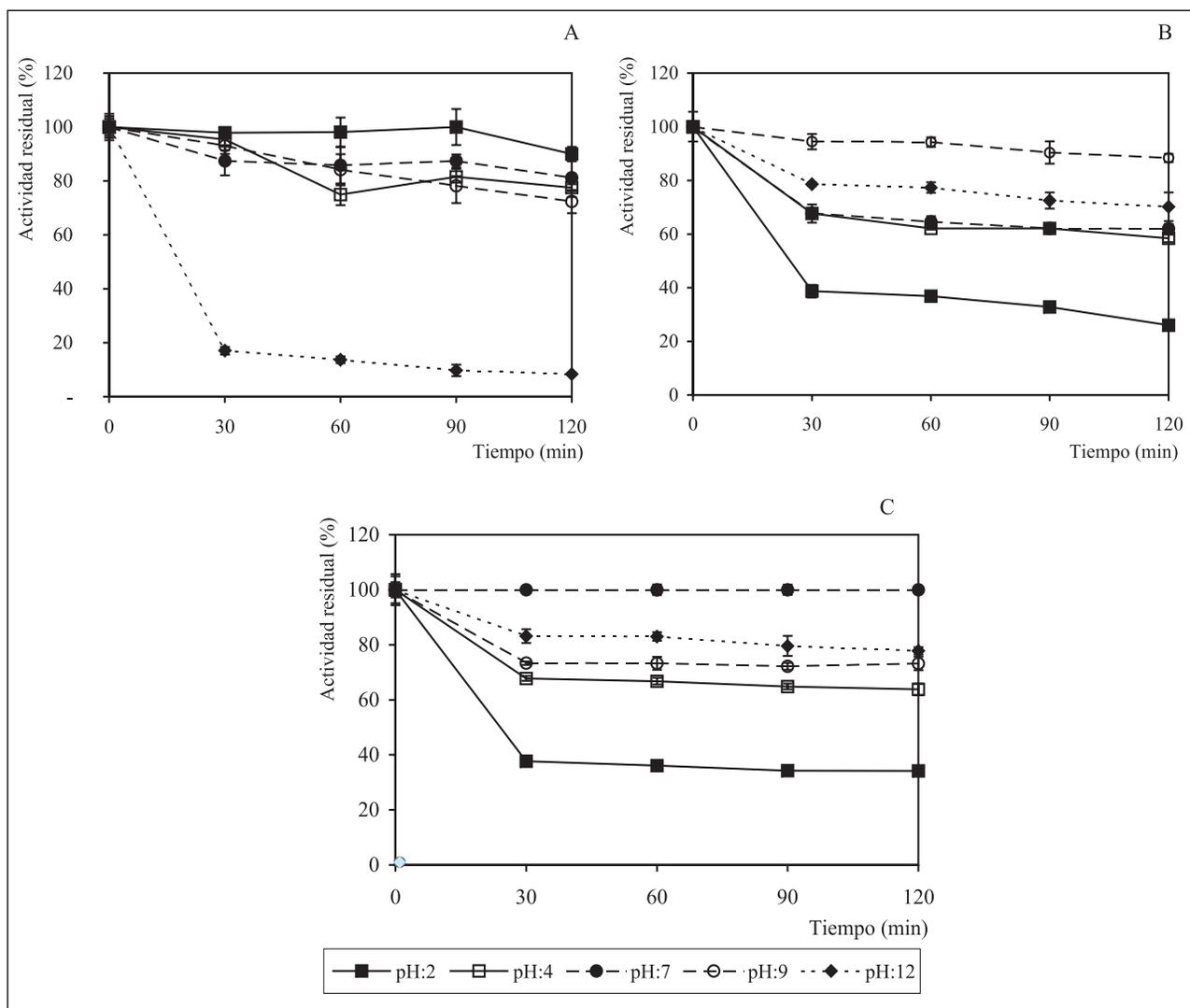


Figura 3. Efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasa ácida del extracto enzimático E (A) y de la actividad proteasa alcalina de los extractos I-1 (B) e I-2 (C) de *S. senegalensis*.

Para determinar el tipo de proteasas que componían los extractos enzimáticos se usó una batería de inhibidores comerciales (tabla II). La inhibición total de los extractos estomacales sólo se produjo por la pepstatina A, un inhibidor específico de pepsina, mientras que el resto de los inhibidores no afectaron a su actividad. Para los extractos intestinales I-1 e I-2 se encontraron patrones de inhibición muy similares. Así, SBTI y ovomucoide, dos inhibidores naturales, redujeron en el 74 y el 68 % la actividad proteasa de I-1 y en el 77 y el 65 % la actividad de I-2, respectivamente. El TLCK, específico de tripsina, redujo la actividad en 35-41 %; el efecto de los inhibidores específicos de quimotripsina fue más variable: para el TPCK entre 4-6 % y para el

ZPCK un 29 % de inhibición. Por otra parte, la incubación con quelantes (EDTA) redujo en menos del 20 % la actividad de los extractos, mientras que la pepstatina A no ejerció ningún efecto sobre los mismos. En la tabla III se muestran los resultados del mismo ensayo pero realizado con sustratos específicos de tripsina y quimotripsina, en lugar de hemoglobina o caseína. Los datos de inhibición confirman que la hidrólisis de BAPNA es producida fundamentalmente por enzimas de tipo tripsina (88 % de la actividad), mientras que la hidrólisis de SAPNA es ocasionada en el 81 % por quimotripsina (inhibidas por el ZPCK).

La incubación del extracto estomacal con los inhibidores de proteasa confirmó la presencia

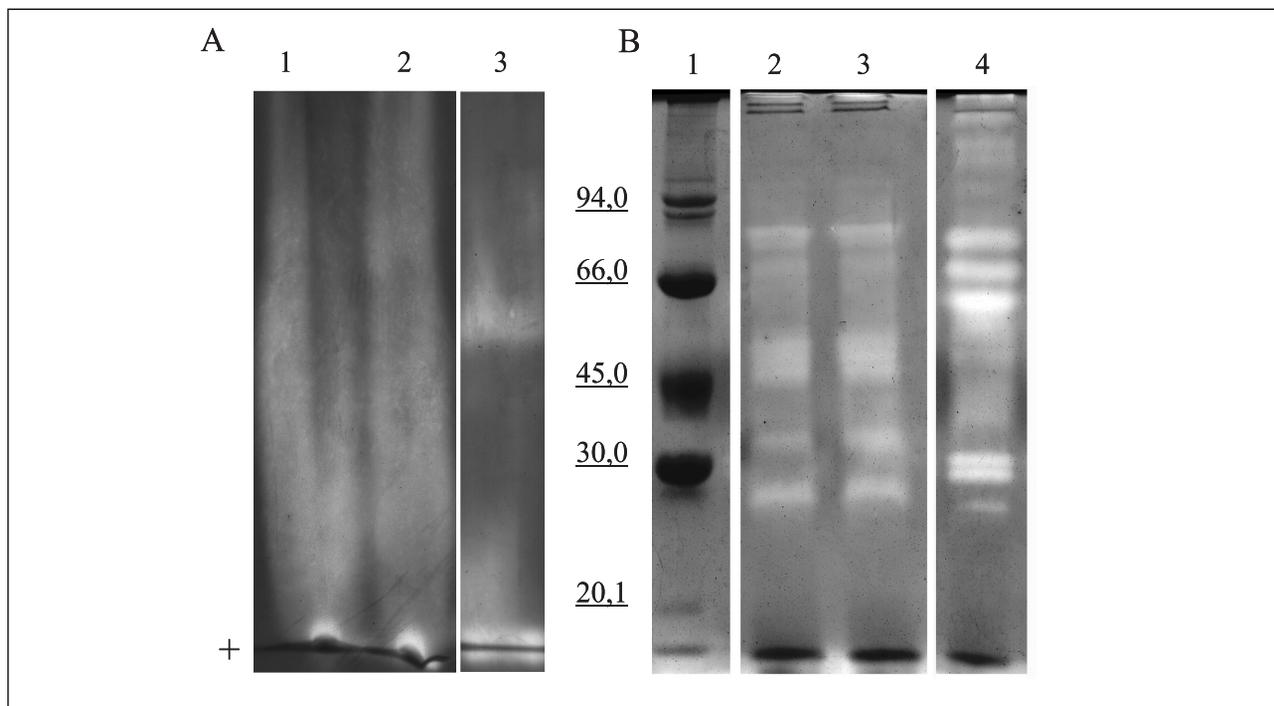


Figura 4. Visualización de las proteasas estomacales (A) e intestinales (B) de los extractos enzimáticos de *S. senegalensis*. Carriles: (A1 y A2): E; (A3): dorada; (B1): marcador de pesos moleculares; (B2): I-1; (B3): I-2; (B4): dentón.

mayoritaria de proteasas aspárticas en éste, ya que su inhibición total con pesptatina A permitió identificar a las mismas como pepsinas. En cuanto a las proteasas intestinales, se identificaron como serina proteasas, tanto de tipo tripsina

como quimotripsina, que son las enzimas proteolíticas mayoritarias que actúan en el digestivo de los peces marinos (Essed *et al.*, 2002).

En la figura 4A se muestra el zimograma del extracto estomacal E y se compara con el perfil

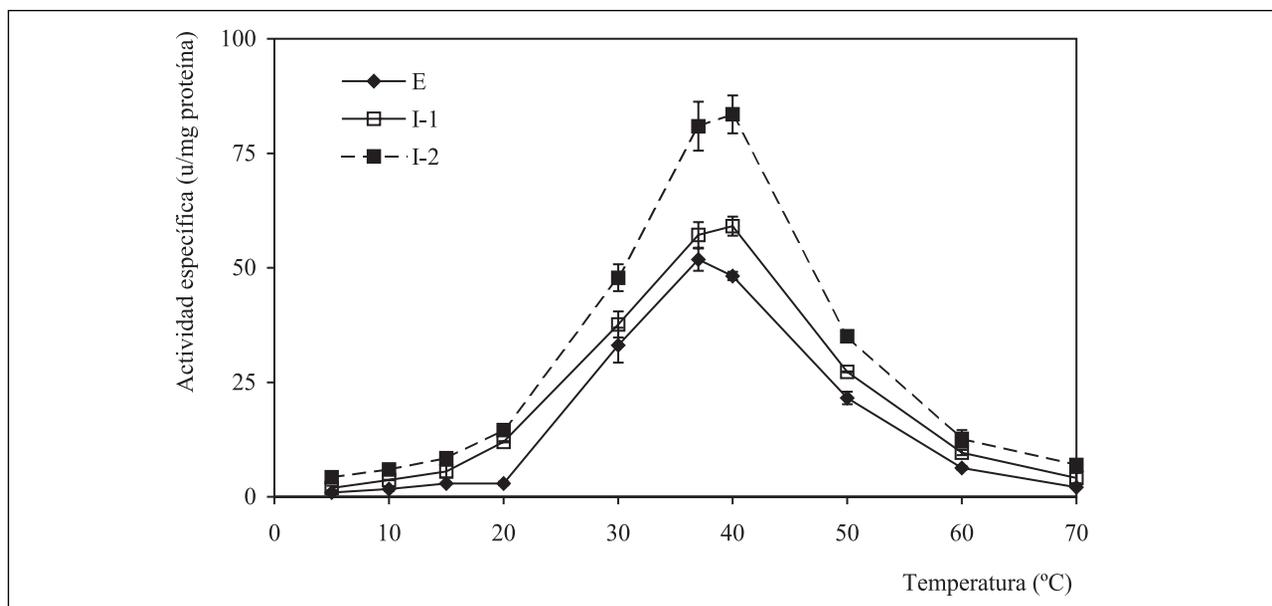


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa ácida (E) y alcalina (I-1 e I-2) de los extractos enzimáticos de *S. senegalensis*.

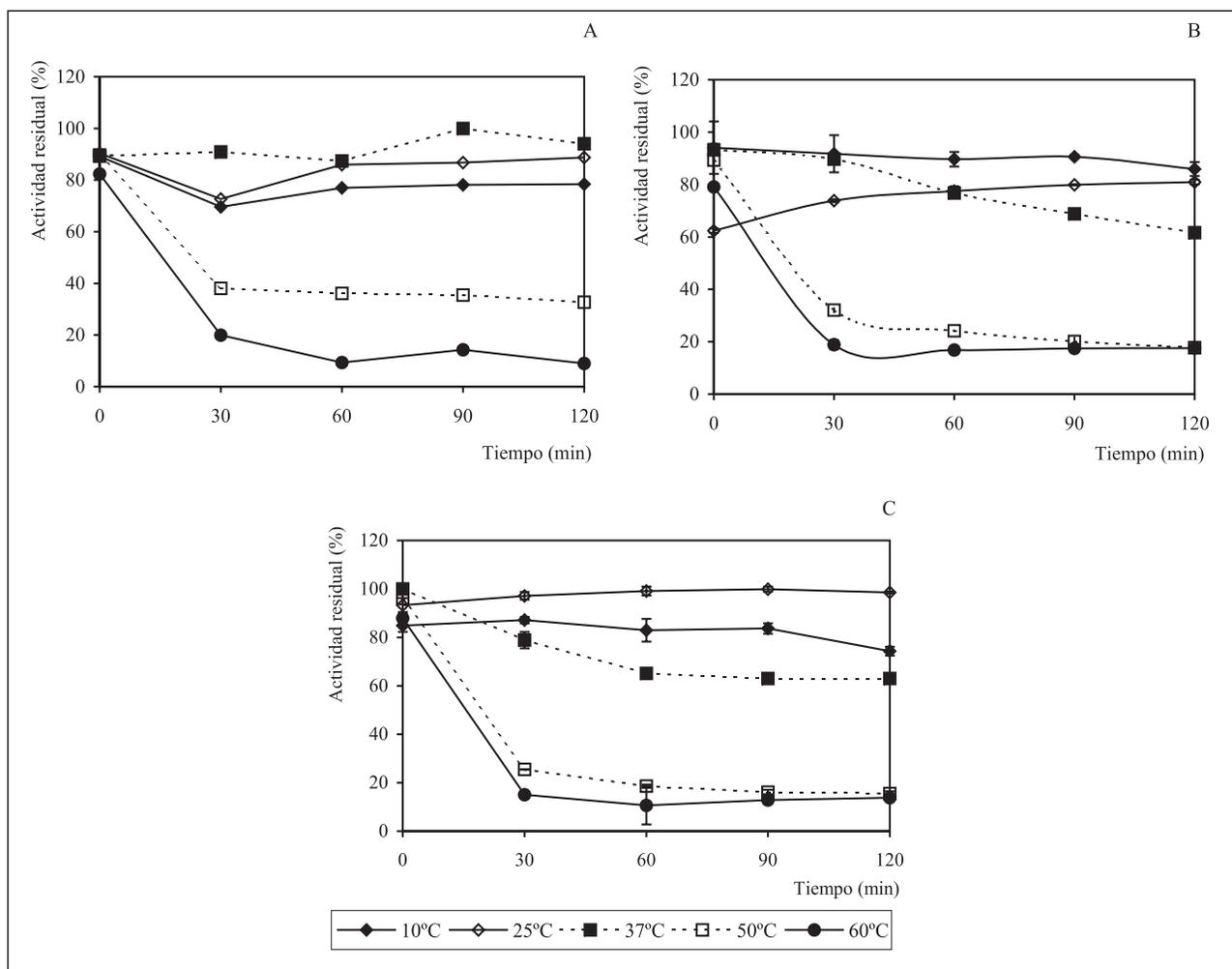


Figura 6. Termoestabilidad de la actividad proteasa ácida del extracto enzimático E (A) y de la actividad proteasa alcalina de los extractos I-1 (B) e I-2 (C) de *S. senegalensis*

Tabla II. Inhibición de la actividad proteolítica de los extractos de *S. senegalensis* por inhibidores comerciales de proteasas. Enzimas dianas: serina proteasa (1), tripsina (1a), quimotripsina (1b), metal proteasa (2) y proteasa ácida (3). Sólo se realizó la comparación de los valores medios de inhibición entre los extractos de intestino I-1 e I-2, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ningún inhibidor ensayado ($p > 0,05$).

Inhibidor	Tipo	Inhibición (%)		
		E	I-1	I-2
SBTI	1	0	74,0 ± 2,2	76,9 ± 1,3
Ovomucoide	1	0	67,5 ± 2,5	64,7 ± 2,9
PMSF	1	0	39,1 ± 1,7	43,5 ± 2,6
TLCK	1a	0	41,5 ± 0,8	35,6 ± 3,1
ZPCK	1b	0	28,7 ± 2,0	29,4 ± 2,0
TPCK	1b	0	4,3 ± 0,4	6,0 ± 1,2
EDTA	2	0	17,0 ± 5,2	10,0 ± 4,5
Pepstatina A	3	100,0 ± 0,7	0	0

obtenido para la dorada (*S. aurata*). Los resultados indican que *S. senegalensis* presenta en su estómago una única fracción proteica con actividad proteolítica. Los zimogramas de los extractos intestinales, I-1 e I-2 (se incluye también el perfil del dentón como control), revelaron que esta especie posee un equipamiento de proteasas alcalinas constituido por tres grupos bien diferenciados; un grupo formado por dos proteasas mayores de 60 kDa, un segundo grupo de tres enzimas de unos 45 kDa y un último grupo de dos proteasas de peso molecular cercano a 30 kDa. Igualmente, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el patrón de proteasas es similar en las dos regiones analizadas.

Tabla III. Inhibición de la actividad de tipo tripsina y quimotripsina de los extractos intestinales de *S. senegalensis* por inhibidores específicos para tripsina (TLCK) y quimotripsina (ZPCK y TPCK).

	Tripsina (BAPNA)	Quimotripsina (SAPNA)
TLCK	87,9 ± 2,7	16,9 ± 1,7
ZPCK	10,2 ± 0,9	80,9 ± 2,0
TPCK	0	9,0 ± 7,4

Considerando los datos obtenidos se puede concluir que el lenguado senegalés presenta un equipo de proteasas digestivas compuesto tanto por proteasas estomacales como intestinales, si bien estas últimas presentan una actividad más intensa y superior número de isoformas. Este hecho constata la mayor importancia relativa de la fase de digestión intestinal en el proceso de hidrólisis global de la proteína alimentaria. Finalmente, tanto el análisis morfométrico como el estudio de las proteasas digestivas apuntan a que *S. senegalensis* es un pez con hábitos alimentarios más característicos de un pez omnívoro que de un carnívoro estricto.

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

- Alarcón, F. J. 1997. *Procesos Digestivos en Peces Marinos. Caracterización y Aplicaciones Prácticas*. Tesis doctoral. Universidad de Almería. Almería, España: 325 pp.
- Alarcón, F. J., M. Díaz, F. J. Moyano y E. Abellán. 1998. Characterization and properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 257-267.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 248-254.
- Ásgeirsson, B. y B. Bjarnason. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 327-335.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Díaz, M., F. J. Moyano, F. J. Alarcón, F. L. García-Carreño y M. A. Navarrete del Toro. 1998. Characterization of fish proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 121: 349-377.
- Dinis, M. T., L. Ribeiro, F. Soares y C. Sarasquete. 1999. A review on the cultivation potencial of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176: 27-38.
- Elliot, J. P. y D. R. Bellwood, 2003. Alimentary tract morphology and diet in three coral reef fish families. *J. Fish Biol.* 63: 1598-1609.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Essed, Z., I. Fernández, F. J. Alarcón y F. J. Moyano. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). En: *VIII Congreso nacional de acuicultura: Acuicultura y desarrollo sostenible* (22-25 de mayo, 2001. Santander, Cantabria, España). I. Arnal Atarés, C. Fernández-Pato, C. Martínez-Tapia y C. Mosquera de Arancibia (eds.). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18 (1-4): 99-107.
- García-Carreño, F. L., L. E. Dimes y N. F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous protease inhibitors. *Anal. Biochem.* 214: 65-69.
- Guillaume, J. y G. Choubert. 1999. Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. En: *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacées*. J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot y R. Métailler (eds.): 489 pp. INRA-Ifremer. Versailles, Francia.
- Haard, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1: 17-35.

- Jonas, E., M. Ragyanski, J. Olah y L. Borros. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.) herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*, VAL) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. *Aquaculture* 30: 145-154.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.
- Moyano, F. J., M. Díaz, F. J. Alarcón y M. C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 121-130.
- Oña, C. de, F. J. Alarcón, M. D. Gaviño, T. F. Martínez, M. Díaz y E. Abellán. 2005. Caracterización de las proteasas ácidas digestivas del dentón (*Dentex dentex*), pargo (*Pagrus pagrus*) y del híbrido *Dentex x Pagrus*. En: *IX Congreso Nacional de Acuicultura (Cádiz, mayo 2003). La acuicultura como actividad económica en las zonas costeras: Libro de Actas* (12-16 de mayo, 2003. Cádiz, España): 101-105. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, España.
- Ribeiro, L., J. L. 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.
- Simpson, B. K y N. F. Haard. 1987. Cold adapted enzymes from fish. En: *Food Biotechnology*. D. Knorr (eds.): 495-527. Marcell Dekker, Inc. Nueva York.
- Stauffer, C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York: 317 pp.
- Walter, H. E. 1984. Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. J. Bergmeyer (eds.) V: 270-277. Verlag Chemie. Weinheim, Alemania.