

Çipura (*Sparus aurata* L., 1758) Larvalarında Mikropartikül Yeme Geçiş Döneminde Sindirim Enzimlerindeki Değişimler

*Cüneyt Süzer, Deniz Çoban, H. Okan Kamacı, Barış Aytepe, Şahin Saka, Kürşat Fırat

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 35440, İskele, Urla, İzmir, Türkiye

*E mail: cuneyt.suzer@ege.edu.tr

Abstract: *Variations of digestive enzyme activities in gilthead sea bream larvae (Sparus aurata L., 1758) during the weaning stage.* In this study, digestive enzyme activities were investigated with larval development and survival during the weaning stage which microparticulate food introduced. During the weaning stage, trypsin activity relatively increased at the beginning of the experiment and slowly decreased until end of the weaning stage. Pepsin was firstly detected on day 38 and sharp increased, reached to peak at 45 days. Then slight declines were measured until end of the experiment. Lipase specific activity was slightly fluctuated from beginning to end of the experiment. Amylase specific activity was increased after microparticulate food introduction and slowly decreased until end of the experiment. Total length was measured as 15.45 ± 1.23 mm, and 27.13 ± 2.67 mm at the beginning and end of the experiment respectively. Also, weight was measured 21.5 ± 2.2 mg and 322.2 ± 51.2 mg at the beginning and end of the experiment respectively.

Key Words: Digestive enzymes, weaning stage, larvae, gilthead sea bream, *S. aurata*.

Özet: Bu çalışmada, çipura larvalarında mikropartikül yeme geçiş olarak kabul edilen sövraj döneminde (35–50. gün) larval gelişim ve yaşama oranının yanı sıra sindirim enzimleri aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. Mikropartikül yeme geçiş döneminde aktivitesi izlenen enzimlerden tripsin aktivitesi deneme başında göreceli olarak yüksek bir aktivite göstermiş, deneme sonuna kadar azalma devam etmiştir. Pepsin aktivitesi ilk kez 38. günde tespit edilmiştir. Bundan sonraki günlerde pepsin aktivitesi ani artış göstermiş, 45. günde maksimum seviyeye yükselmiştir. Bu günden sonra aktivitede yavaş azalmalar tespit edilmiştir. Lipaz aktivitesinde denemenin başından sonuna kadar küçük değişimler izlenmiştir. Amilaz aktivitesi ise mikropartikül yem girişinin ardından yükselmiş, denemenin başından sonuna kadar yavaş bir azalma göstermiştir. Bununla birlikte, sövraj dönemi başında, larvalara ait total boy ortalama 15.45 ± 1.23 mm, deneme sonunda ise 27.13 ± 2.67 mm olarak bulunmuştur. Ayrıca, deneme başında larvalara ait ağırlık ortalama 21.5 ± 2.2 mg, sövraj dönemi sonunda ise 322.2 ± 51.2 mg olarak bulunmuştur. Buna ek olarak, spesifik büyüme oranı ve yaşama oranı sırasıyla %3.75/gün ve %91.8 olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sindirim enzimleri, sövraj dönemi, larva, çipura, *S. aurata*.

Giriş

Günümüzde teknolojinin gelişimine paralel olarak hızlı bir gelişim gösteren akuakültür sektörü gerek Akdeniz ülkelerinde gerekse ülkemizde endüstri kolu haline gelmiştir. Bu ülkelerde sürdürülen akuakültür üretimi daha çok çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) türleri üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Çipuraların fizyolojisi ve biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar diğer türlere oranla daha azdır. Laboratuvar koşullarında çalışmaların zorluğu ve çipura balığının kültür koşullarında üretiminin oldukça güç olması bu türle ilgili araştırmaları olumsuz etkilemiştir (Moyano ve diğ., 1996). Ülkemizde bu tür ile ilgili çalışmalar larval dönem yaşama oranının artırılması, larva yetiştirme protokollerinin hazırlanması, gelişim oranının yükseltilmesi ve hastalıkların tedavisi konularında devam etmektedir (Saka ve Fırat, 2000).

Deniz balıkları üretimi içinde özellikle erken dönemleri kapsayan larva yetiştiriciliği ve bu döneme ait türe özgü biyolojik gereksinimlerin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Larval üretim periyodu boyunca üreticilerin en öncelikli hedefi, her açıdan kaliteli ve fazla sayıda larva üretmektir. Bu nedenle, larval dönem boyunca uygulanan biyotik (besleme,

hastalık) ve abiyotik (sıcaklık, tuzluluk, aydınlatma) faktörlerin optimizasyonu önemli bir adımı oluşturmaktadır. Dolayısıyla larval gelişim süreci, larva yaşama oranının ve üretilen yavru balık kalitesinin artırılmasında bilinmesi gereken en önemli süreçlerden biridir. Bununla birlikte, canlı yem üretiminin gerek maliyet gerekse kontaminasyon riski açısından birtakım sorunları içermesi, üreticiler için larval üretim periyodu süresince mümkün olan en kısa zamanda mikropartikül yeme geçme zorunluluğunu gündeme getirmiştir (Suzer ve ark., 2007b).

Bu bağlamda, üreticiler için canlı yemden mikropartikül yeme geçiş dönemi hayati bir öneme sahiptir. Özellikle canlı yemin kademeli olarak azaltılması sırasında biyomastaki en küçük bireye kadar larval beslemenin optimal yoğunlukta sağlanması oldukça önemlidir. Bunun yanında, ortama girilen mikropartikül yemin larvalar tarafından en iyi şekilde sindirilmesi ve değerlendirilmesi önemli bir adımdır. Bu dönemde en etkin larval büyümeyi ve gelişimi sağlayacak beslenme stratejilerinin belirlenmesi ve buna uygun besleme protokollerinin oluşturulması için öncelikle sindirim enzimleri aktivitesinin bilinmesi bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu çalışmada, ülkemizde yoğun kültürü yapılan çipura larva

üretiminde mikropartikül yeme geçiş döneminde üreticiler tarafından yaygın olarak izlenen sövraj protokolü ve bu dönem süresince larval gelişim, yaşama oranı ve sindirim enzimleri aktivitesindeki değişimler incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmadaki larva üretimi Ocak-Şubat 2007 tarihleri arasında Muğla ili, Milas ilçesi Ören mevkiinde bulunan Kılıç Şirketler Grubuna bağlı Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş. Ören Kuluçkahane Tesislerinde yürütülmüştür. Anaç bireyler 20 m³lük adaptasyon tanklarına konulmuştur. Adaptasyon işleminden sonra anaç bireyler 1:1 dişi (914.7±128.3 gr)/erkek (632.8±61.3 gr) oranında ve 5 kg/m³ yoğunlukta stoklanmıştır. Anaçlardan yumurtalar doğal üreme periyodu olan Kasım-Aralık ayları süresince elde edilmiş, doğal sıcaklık (16-17 °C) ve fotoperiyot (14 aydınlık:10 karanlık) olarak uygulanmıştır. Anaçlara herhangi bir hormon uygulaması yapılmamıştır. Anaçların beslenmesinde yumurta kalitesini artırmak amacıyla taze yaş yem olarak sübye (*Sepia officinalis*), kalamar (*Loligo vulgaris*), ahtapot (*Octopus vulgaris*) kullanılmıştır. Bununla birlikte yüksek oranda doymamış yağ asitleri içeren Vitalis Repro (Trouvit) pelet yem kullanılmıştır. Anaçlara günde 2 kere doyuncaya kadar besleme yapılmıştır. Anaçlardan temin edilen yumurtalar kollektörlerden toplandıktan sonra ayrı bir kapta bekletilmiş ve ölü-canlı ayrımı yapılmıştır. Canlı yumurta miktarı tespit edildikten sonra yumurtalar 200 litre hacmindeki 375 µm göz açıklığına sahip inkübatörlere litrede 3000 yumurta/lit olacak şekilde yerleştirilmiştir.

Üç tekrarlı olarak planlanan sövraj döneminde 10 m³ hacimli, çeperleri siyah, zemin gri renkte, silindir-konik yapıda polyster tanklar kullanılmıştır. İnkübasyon aşamasından sonra larvalar 100 adet/litre olacak şekilde tanklara yerleştirilmiştir. Larva üretimi açık devre sistemde yeşil su tekniği kullanılarak yapılmıştır. Alg türü olarak *Isochrysis galbana* ve *Tetraselmis suecica* türleri 20-40 x 10³ hücre/ml oranında kullanılmıştır. Denemelerde alg kullanıldığı sürece 24 saat aydınlatma yapılması, alg kullanımı sona erdikten sonra günde 16 saat aydınlık/8 saat karanlık rejiminin uygulanması planlanmıştır. Larvalarda ağız açılımı gözlemlendikten sonra larval beslemeye S-type olarak adlandırılan *Brachionus rotundiformis* ve L-type olarak adlandırılan *Brachionus plicatilis* türü rotiferle başlanması öngörülmüştür. Başlangıç aşamasında 3. gün için %70 S-type+%30 L-type, 5. gün için %50 S-type+%50 L-type, ve 8. günden itibaren sadece L-type rotifer girişi planlanmıştır. Canlı yem yoğunluğunun 10 adet/ml olması hedeflenmiştir. Rotiferin ardından canlı yem olarak beslemeye *Artemia nauplii* ile devam edilmiştir. AF tipi artemialar yumurtadan çıktıktan hemen sonra larvalara 10. günden itibaren ve ilerleyen günlerde larva gelişimine bağlı olarak zenginleştirildikten sonra metanauplii olarak 15. günden itibaren verilmesi hedeflenmiştir. Artemia ve rotiferlerin zenginleştirilmesinde INVE firmasının Selco ürünleri kullanılmıştır. Çalışmanın temel amacını oluşturan sövraj döneminde sindirim enzimlerinde meydana gelen değişimlerin izlenebilmesi amacıyla mide

oluşumunun ardından ve Artemianın azaltılmaya başladığı günlerde tanklara ilk kez mikropartikül yem girişi yapılması hedeflenmiş ve denemelerde mikropartikül yem olarak Bernaqua firmasının Caviar sınıfı mikropartikül yemleri (100-200µ; 200-300µ) kullanılmıştır. Yemlere sindirilebilirliğin artırılması amacıyla herhangi bir enzim eklenmesi yapılmamış, ticari sürüm olarak kullanılan ürün denemelerde ele alınmıştır. Tablo 1'de Caviar mikropartikül yemlerin besin madde içerikleri verilmiştir.

Tablo 1. Denemelerde kullanılan Caviar (100-200µ; 200-300µ) mikropartikül yem besin madde içeriği (Caviar Catalogue).

Nutrient	Değer
Ham Protein (%)	50.0
Ham Yağ (%)	15.0
Ham Kül (%)	20.0
Ham Selüloz (%)	2.0
Nem (%)	8.0
Fosfor (%)	1.5
Total (n-3) HUFA	25 mg/g
DHA	12 mg/g
EPA	8 mg/g
Vitamin A	20000 IU/kg
Vitamin D ₃	4000 IU/kg
Vitamin C	1100 ppm
Vitamin E	400 ppm
Bakır	50 ppm
Astaxanthine	100 ppm
Total Enerji	5080 Kcal/kg
Sindirilebilir Enerji	4650 Kcal/kg

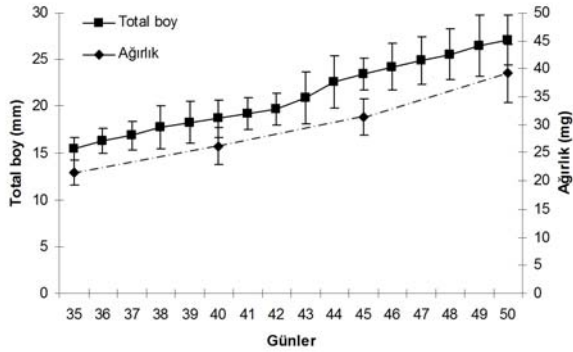
Çipura larva yetiştiriciliği kapsamında ülkemizde de yaygın olarak uygulanan sövraj protokolü baz alınmıştır. Bu bağlamda, 35. günden itibaren larva tanklarına *Artemia* metanauplii miktarı azaltılarak Caviar mikropartikül yem girişi planlanmıştır. Bunun yanında, 35. günde başlayan mikropartikül yem geçiş döneminde deneme tanklarından her gün 30 adet larva alınmış ve bu larvaların meristik karakterleri ölçülmüştür. Total boy, milimetrik oküler yardımıyla, ağırlık ise volumetrik yöntem ile digital terazi yardımıyla ölçülmüştür. Larval gelişimi tanımlayabilmek amacıyla Spesifik Büyüme Oranı hesaplanmıştır. Bu değeri hesaplayabilmek amacıyla $SBO = 100 (\ln SVA - \ln İVA) / \Delta t$ formülü kullanılmış ve İVA: İlk vücut ağırlığı, SVA: Son vücut ağırlığı ve Δt : Gün parametreleri alınmıştır.

Sövraj dönemi boyunca çipura larvalarının sindirim enzim aktivitelerini izleyebilmek için denemenin başı kabul edilen 35. günden itibaren denemenin sonuna kadar her 5 günde bir düzenli olarak 30-50 adet larva alınarak homojenize edilmiş ve pH 7.5 değerinde Tris-HCl tampon eklenerek analizler yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır. Larvaların sabah ilk yem girişi yapılmadan önce, genellikle aynı derinlikten alınması sağlanmıştır. Alınan larvalar homojenizatör yardımıyla 15000xg devir, 4 °C'de 30 dakika süre ile homojenize (1/5:homojenat/soğuk saf su) edilmiş ve elde edilen homojenata 50 mM, pH 7.5, Tris HCl ile glycerol eklenerek enzim analizleri yapılmaya dek -20°C'de saklanmıştır. Her enzim kendine özgü spesifik aktivite tayin yöntemleri ile tespit edilmiş ve spektrofotometre (Jenway 6300-Visible Spectrophotometer) cihazı yardımıyla enzim

aktiviteleri ölçülmüştür. Bu aşamada, larval evrede alınan canlı ve mikropartikül yemin sindirilmesinde önemli rol oynayan tripsin, pepsin, lipaz ve amilaz enzim aktiviteleri izlenmiştir. Tripsin enzim aktivitesinin izlenebilmesi amacıyla Tseng et al. tarafından (1982) kullanılan analiz yöntemi ve substrat madde olarak Na-Benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) kullanılmıştır. Pepsin enzim aktivitesinin izlenebilmesi amacıyla Worthington (1982) tarafından yapılan çalışmada düzenlenen şekli ve substrat madde olarak siğir hemoglobinininden yararlanılmıştır. Amilaz enzim aktivitesinin izlenebilmesi amacıyla Métais and Bieth (1968) tarafından yapılan çalışmada belirtilen analiz yöntemi ve substrat madde olarak çözünür nişasta kullanılmıştır. Lipaz enzim aktivitesinin izlenebilmesi amacıyla Versaw (1986) tarafından bulunan analiz yöntemi ve substrat madde olarak β -naphtyl caprylate kullanılmıştır. Bu analizler sonrasında protein analizi için Bradford yönteminden yararlanılmıştır (Bradford, 1976). Denemeler 3 kez tekrar edilmiş ve veriler ortalamanın standart sapması (S.D.) olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 11.0 ve Microsoft Excel 2003 yazılımlarından yararlanılmıştır.

Bulgular

Sövrāj başlarken yapılan ilk ölçümde larvalara ait total boy ortalama 15.45 ± 1.23 mm olarak tespit edilmiştir. Bundan sonraki ölçümlerde lineer artış izlenmiş, özellikle 42. günden sonra ani artış izlenmiştir. Deneme sonunda total boy ortalaması 27.13 ± 2.67 mm olarak bulunmuştur (Şekil 1).

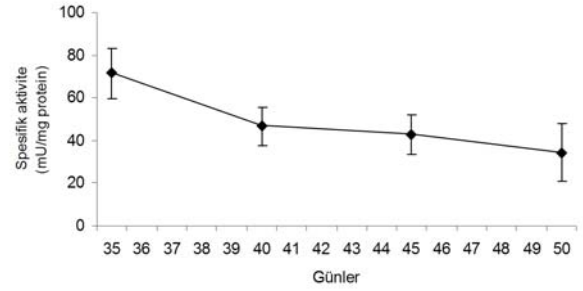


Şekil 1. Deneme süresince larvalarda izlenen ağırlık gelişimi.

Öte yandan, deneme başında larvalara ait ağırlık ortalama 21.5 ± 2.2 mg olarak tespit edilmiştir. Her 5 günde bir devam ölçümlerde ağırlık artışı izlenmiş, deneme sonunda 39.2 ± 5.2 mg olarak bulunmuştur. Şekil 1'de deneme süresince larvalarda izlenen total boy ve ağırlık gelişimi gösterilmiştir.

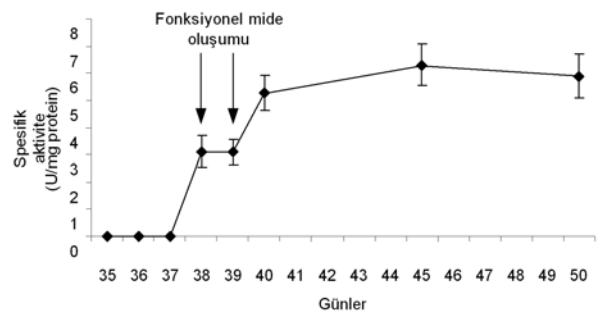
Deneme sonunda spesifik büyüme oranı ortalama $\%18.06/\text{gün}$, yaşama oranı ise ortalama $\%91.8$ olarak hesaplanmıştır.

Tripsin: Pankreastan salgılanan proteinlerin sindiriminde görev alan tripsin enzim aktivitesi, deneme başında göreceli olarak yüksek bir aktivite göstermiş (71.53 ± 11.9 mU/mg protein), ardından aktivitede ani bir düşüş gözlenmiştir (46.63 ± 8.8 mU/mg protein). 40. günden itibaren aktivitedeki azalma yavaşlamış ve deneme sonuna kadar bu şekilde devam etmiştir (34.35 ± 13.6 mU/mg protein). Şekil 2'de deneme süresince tripsin enzim aktivitesindeki değişimler gösterilmiştir.



Şekil 2. Deneme süresince tripsin enzim aktivitesindeki değişimler.

Pepsin: Proteinlerin sindiriminde görev alan diğer bir enzim olan pepsin, deniz balıklarında ilk olarak sentezlenmesi fonksiyonel mide oluşumunun en önemli işaretidir. Sövrājın ilk günlerinde yapılan ölçümlerde pepsin aktivitesi gözlenmezken, ilk kez 38. günde tespit edilmiştir (3.12 ± 0.59 U/mg protein). Bundan sonraki günlerde pepsin aktivitesi ani artış göstermiş, 45. günde maksimum seviyeye yükselmiştir (6.31 ± 0.76 U/mg protein). Bu günden sonra aktivitede yavaş azalmalar tespit edilmiştir (5.88 ± 0.81 U/mg protein). Şekil 3'de deneme süresince pepsin enzim aktivitesindeki değişimler gösterilmiştir.

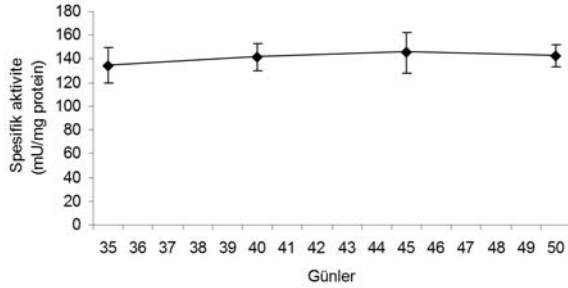


Şekil 3. Deneme süresince pepsin enzim aktivitesindeki değişimler.

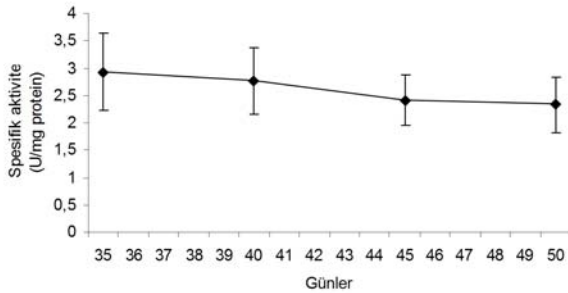
Lipaz: Lipidlerin sindiriminde görev alan lipaz enzimi, mikropartikül yemin ilk verildiği deneme başında (134.36 ± 15.2 mU/mg protein) durağan bir aktivite göstermiş, ve sonrasında önemsiz küçük artışlar izlenmiştir. Bu stabil aktivite düzeyi deneme sonuna kadar devam etmiştir (142.41 ± 9.42 mU/mg protein). (Şekil 4).

Amilaz: Karbonhidratların sindiriminde görev alan amilaz enzim aktivitesinde denemede kullanılan 2 farklı

mikropartikül yemin nişasta içeriğinin aynı (<%12) olması nedeniyle ani bir değişim izlenmemiş, deneme süresince amilaz spesifik aktivitesinin önemsiz yavaş azalmalar şeklinde sürdüğünü göstermiştir (Şekil 5).



Şekil 4. Deneme süresince lipaz enzim aktivitesindeki değişimler.



Şekil 5. Deneme süresince amilaz enzim aktivitesindeki değişimler.

Tartışma ve Sonuç

Çipura larva yetiştiriciliğinde, larva boyutlarının levrek larvasına göre daha küçük olması ve fonksiyonel mide oluşumunun sövraj döneminde oluşması larvaların yeterli şekilde beslenmesini ve buna bağlı olarak yaşama oranını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu bağlamda, özellikle fonksiyonel mide oluşumunun hemen ardından uygulanacak yeterli ve etkin bir larval besleme protokolü bu sorunların ve mortalitelerin azaltılmasında önemli bir adımı oluşturacaktır. Dolayısıyla, sövraj döneminde ve özellikle fonksiyonel mide oluşumu sırasında sindirim enzimleri aktivitesindeki değişimlerin bilinmesi ve enzimatik profillerinin ortaya konması hayati önem taşımaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde kültürü yoğun olarak yapılan çipura larvalarının uygulanan standart sövraj protokolü kapsamında sindirim enzimleri aktivitesindeki değişimler incelenmiş ve enzimatik profilleri tanımlanmaya çalışılmıştır. Çipura larvaları ile yapılan ilk enzimatik çalışmalar daha çok türün sindirim enzimleri ontogenisi üzerine yürütülmüştür. Yapılan kimi çalışmada çipura larvalarında larval dönem boyunca (0-40 gün) sindirim enzimlerinin ilk tespit edilme zamanı ve larval gelişime bağlı olarak enzimatik profilin değişimleri izlenmiştir (Moyano ve diğ., 1996). Proteinlerin sindiriminde önemli rol oynayan tripsin

enziminin ağız açılımı ve eksojen besin alımı ile birlikte eş zamanlı olarak sentezlenmeye başladığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde, kültürü yapılan ve son zamanlarda Akdeniz ülkelerinde alternatif türler arasında yer alan diğer Sparid türlerinden sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*), kıırma mercan (*Pagellus erythrinus*) ve kırmızı bantlı mercan (*Pagrus auriga*) larvalarında 3. günde tespit edilmiştir (Süzer ve diğ., 2006; 2007a, Moyano ve diğ., 2005). Bu çalışmalarda tespit edilen zamanlar ağız açılımı ve eksojen besin alımının başladığı günlerdir. Deniz balıkları larvalarının gelişiminde, yumurtadan çıkar çıkmaz tespit edilen ilk enzimlerden biri de tripsindir. Özetle, ince bağırsağa pankreas kanalıyla dökülen pankreas özsuyu proteinlere doğrudan etki eden tripsin, kimotripsin ve karboksipeptidaz adı verilen enzimleri içermektedir. Tripsin, inaktif şekli olan tripsinojen şeklinde salgılanmakta ve tripsinojeni ince bağırsaklardan salgılanan enterokinaz aktive etmektedir (Zambonino Infante and Cahu, 2001; Kolkovski, 2001).

Bununla birlikte, tripsin spesifik aktivitesinin larval dönem süresince sergilediği enzimatik değişimler yalnızca larva yaşına bağlı değildir. Özellikle yem alımı ve kullanılan canlı yem ya da mikropartikül yemin besin madde içerikleri ve biyokimyasal kompozisyonları da son derece önemlidir (Beccaria ve diğ., 1991; Cahu and Zambonino Infante, 2001; Kolkovski, 2001; Alvarez-González ve diğ., 2001). Sözelimi, levrek larvalarında farklı oranlarda yapılan besleme uygulamasının enzim aktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiş ve besleme oranının azalmasına bağlı olarak enzim aktivitesinin azaldığı vurgulanmıştır (Zambonino Infante ve diğ., 1996). Ayrıca, dil balığı (*Pseudopleuronectes americanus*) ve sarıkuyruk (*Seriola sp.*) larvalarından oluşan 3 farklı grupta yapılan denemelerde, en yüksek sindirim enzimleri aktivitesine mikropartikül yemin kullandığı grupta en az aktiviteye ise aç bırakılan grupta rastlanmış, yem alımı ve besin madde içeriğinin enzim aktivitesini doğrudan etkilediği vurgulanmıştır (Baglolle ve diğ., 1998). Tripsin enzim aktivitesinin alınan yemin protein miktarı, larva yaşı ve yem alımı ile doğrudan ilişkili olduğunu gösteren sonuçlar, kuruma karidesinde (*Penaeus japonicus*) Le Vay (1993), çizgili levrekte (*Lates calcarifer*) Walford and Lam, (1993), tatlı su levreği (*Perca fluviatilis*) ve turnada (*Esox lucius*) Kuz'mina (1996), levrekte Cahu and Zambonino Infante, (2001), ve çipurada Kolkovski (2001) tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca, tripsin enzim aktivitesi larva besinsel koşulların tanımlanmasında anahtar bir araç olarak kullanılmaktadır.

Mikropartikül yeme geçiş döneminde kullanılan yemin boyutları, besin madde içeriği ve üretim teknolojisi büyük önem taşımaktadır. *Lates calcarifer* türü üzerinde yürütülen bir sövraj çalışmada ülkemizde de yaygın olarak kullanılan INVE firmasının Proton ve Skretting firmasının Gemma mikropartikül yemlerini kullanılmış ve deneme sonunda, Gemma ürünü ile beslenen gruptaki larval gelişim ve yaşama oranı verileri Proton ürünü ile beslenen gruba göre göreceli olarak yüksek bulunmuştur (Curnow ve diğ., 2006). Bu çalışmada, Gemma mikropartikül yemin besin madde içeriğinin (HP ve HY oranı, aminoasit profili daha fazla) ve

sindirilebilirliğinin daha yüksek olması sonucu etkileyen önemli faktör olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca, İspanya ve Portekiz'de kültürü yaygın olarak yapılan Senegal dil (*Solea senegalensis*) türü üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, mikropartikül toz yeme başlangıç gününün bu tür için fonksiyonel mide oluşumu (28. gün) ile eş zamanlı başlamasının önemi vurgulanmıştır (Riberio *et al.*, 1999; Dinis *et al.*, 1999).

Öte yandan, larva kültürü üzerine son yıllarda yapılmış olan çalışmalarda yaygın olarak değinilen konuların başında larvalarda erken sövraj (early weaning) konusu gelmektedir (Hamlin ve diğ., 2000; Baskerville-Bridges ve diğ., 2000; Süzer ve diğ., 2007b). Erken sövraj uygulamasının temel mantığı, canlı yem kültürünün finansal bakımdan pahalıya mal olması, içeriğindeki besin madde kompozisyonunun sabit olmaması ve bununla birlikte patojen mikroorganizmaların varlığı üreticilerin erken larval dönemdeki canlı yem sarfiyatını azaltma girişimlerine sebep olmuştur. Bu nedenden dolayı çeşitli tiplerde, larva ağız açıklığına uygun nitelikte mikropartikül yemler geliştirilmiş ve erken larval dönemde kısmi olarak canlı yemlerin yerine kullanımı ile ilgili denemeler gerçekleştirilmiştir. Fakat canlı yemlerin yerine kullanılan mikropartikül yemlerin deniz balıkları larva yetiştiriciliğinde, düşük yaşam oranı ve büyüme performansı nedeniyle sınırlı bir başarısı olmuştur. Erken sövraj konusu ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok kültürü yoğun olarak yapılan türler üzerine yoğunlaşmış ve sindirim enzimleri aktivitesindeki değişimlerin yakından izlenmesi ile yorumlanmıştır.

Levrek larvaları ile yapılan erken dönem sövraj çalışmasında, larvaların ağız açıldıktan 10, 15, 20 ve 25. günlerden itibaren mikropartikül, kontrol grubu ise *Artemia* ile beslenmiştir. Larvaların pankreatik (tripsin ve amilaz) ve intestinal (Alkalin fosfataz, leucine-amino peptidaz, γ -glutamil transpeptidaz) sindirim enzimleri üzerine olan aktivitelerini incelenmiştir (Cahu and Zambonino Infante 1994). Bu çalışmaya ek olarak yürütülen erken sövraj çalışmasında, levrek larvaları ağız açıldıktan 15, 20 ve 25. günlerden itibaren mikropartikül, kontrol grubu ise *Artemia* ile beslenmiş, 25. günde girilen mikropartikül yemin larval gelişim ve yaşama oranları üzerine önemli etkilerinin olduğunu belirtilmiştir (Süzer ve diğ. (2007b). Ayrıca, *Melanogrammus aeglefinus* larvaları ile yürütülen çalışmada mikropartikül yemlerin başarılı bir şekilde en erken dönemde verilme zamanının belirlenmesi amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada mikropartikül toz yem girişi 14, 21, 28 ve 35. günlerde gerçekleştirilmiş, kontrol grubu *Artemia* ile beslenmiştir. Erken toz yem girilen grupların yaşama oranlarında (% 2.5-6.3) önemli bir fark saptanmaz iken, kontrol grubunun % 37.9 yaşama oranı ile önemli bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Hamlin ve diğ., 2000). Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvaları ile yapılan çalışmada 8, 15, 22 ve 29. günlerde mikropartikül toz yem girişine başlamışlardır. Bu gruplara toz yem girişine kadar rotifer ile besleme yapılmış, beşinci gruba ise 10 gün süreyle *Artemia* girilmiştir. İlk dört gruptaki yaşam oranları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (% 32,7-39,4). Toz yem giriş zamanının cod larvalarının gelişimleri üzerine önemli

ölçüde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bununla beraber, beşinci grupta gelişimin daha iyi olduğu saptanmıştır. 71. günde 24 mm total boya, 20 mg kuru ağırlığa ulaştığı saptanmıştır (Baskerville-Bridges ve diğ., 2000).

Proteinlerin sindiriminde rol alan enzimlerden biri de mideden salgılanan pepsin enzimidir. Midedeki asiditenin artmasıyla birlikte pH 2.0'ye yükselmekte ve aktif pepsinin varlığında polipeptidin N terminalinden 42 aminoasitlik bir kısmın koparılması ile proenzim aktif formu olan pepsin haline dönüşmektedir. Pepsin, protein molekülünün iç kısımlarına özellikle tirozin ya da fenilalanin iştirak ettiği peptid bağlarına etki eder. Bu şekilde proteinlerden proteozlar, peptonlar, çeşitli büyüklükteki peptidler ve kısmen de serbest amino asitler meydana gelir. (Zambonino Infante and Cahu, 1994a; Cahu and Zambonino Infante, 2001; Zambonino Infante and Cahu, 2001). Deniz balıkları larva kültüründe üretim süreci boyunca larvalarda pepsin enziminin sentezlenmesi son derece önemli bir adımı oluşturmaktadır. Çünkü pepsin aktivitesinin ilk olarak tespiti larvalarda eş zamanlı olarak fonksiyonel mide oluşumunda en büyük işareti olarak kabul edilmektedir. Larvalarda fonksiyonel mide oluşumunun hemen ardından özellikle mikropartikül toz yemin larvalara ilk olarak verilmeye başlanması yaygın bir uygulamadır. Özellikle mikropartikül yemlerin pepsin ve bazı pankreatik sindirim enzimlerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada (Zambonino Infante and Cahu, 1994a), levrek larvalarında pepsin enzim aktivitesinin 24. günde tespit edildiği ve fonksiyonel midenin bu günden itibaren oluştuğu bildirilmiştir. Ayrıca, mikropartikül yemin kullanıldığı gruplarda pepsin aktivitesinin daha yüksek olduğu, farklı besin madde içeriğine sahip yemlerde ise protein oranının yüksek olduğu yemlerle beslenen larvaların pepsin aktivitelerinin daha yüksek olduğunu vurgulamıştır. Mikropartikül yem kullanımının tripsin ve kimotripsinin yanı sıra özellikle pepsin spesifik aktivitesini artırdığı diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir (Kolkovski ve diğ., 1993; Kolkovski ve diğ., 1997; Kolkovski, 2001; Zambonino Infante and Cahu, 2001; Cahu and Zambonino Infante, 2001).

Bu çalışmada pepsin aktivitesi ilk olarak 25. günde tespit edilmiştir. Öte yandan, Zambonino Infante and Cahu (1994a) yaptıkları çalışmada levrek larvalarında ilk pepsin aktivitesini 24. günde tespit ettiklerini bildirmiştir. Bu sonuç, bu çalışmadan elde edilen sonuçla oldukça yakındır. Önceki paragrafta da belirtildiği gibi, larval enzimoloji çalışmalarında pepsin enzim aktivitesinin tespit edilmesi, fonksiyonel mide ve sindirim sistemi oluşumunun net bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu durum, Zambonino Infante and Cahu (2001), Cahu and Zambonino Infante (2001) ve Kolkovski (2001) tarafından da bildirilmiştir. . Kültürü yapılan deniz balıkları larvalarında fonksiyonel mide oluşumu ve pepsin sentezi levrek larvaları için 24. gün (Cahu and Zambonino Infante, 1994), çipura larvaları için 40. gün (Moyano ve diğ., 1996), kıırna mercan larvaları için 26. gün (Süzer ve diğ., 2006), sivriburun karagöz larvaları için 32. gün (Süzer ve diğ., 2007a) ve sargos larvaları için 28. gün olarak (Cara ve diğ., 2003) bildirilmiştir. Bu çalışmada ise ilk pepsin sentezi 38. günde izlenmiş ve fonksiyonel mide oluşumunun da bu günde gerçekleştiği tespit

edilmiştir. Elde edilen bu sonuç Moyano ve diğ. (1996) tarafından yapılan çalışma ile benzerlikler göstermektedir. Pepsin enziminin aktivitesinin tespiti ile birlikte tripsin enzim aktivitesinde azalmalar görülmüştür. Fonksiyonel mide oluşumundan (ilk pepsin sentezi) önce ortama mikropartikül yem girişinin larvalarda hazımsızlık, kabızlık nedeniyle mortalitelere yol açacağını belirtilmiştir.

Özetle, ülkemizde çipuranın yanı sıra kültürü yoğun olarak levrek türü üzerinde mikropartikül yem girişi ile yapılan çalışmalarda, fonksiyonel mide oluşumunun 24-25. günlerde olduğu ve bu günden sonra yem girişinin yaşama oranını artıracağı belirtilmiştir (Cahu and Zambonino Infante, 1994, Suzer ve diğ., 2007b). Ayrıca, levrek larvalarında daha erken dönemde (10, 15, 20. gün) mikropartikül yem verilmesi çalışmaları yapılmıştır. Ancak sonuçta, 25. günden önce verilen mikropartikül yemlerin sindirilmediği, sindirim tüpünde koyu kitle halinde birikerek anüsü kapattığı ve kabızlığa bağlı ölümlere yol açarak yaşama oranını düşürdüğü belirtilmiştir (Cahu and Zambonino Infante, 1994, Suzer ve diğ., 2007b).

Larval enzimolojide amilaz spesifik aktivitesi verilen yemin besin madde içeriği daha da ötesinde nişasta içeriği ile çok yakın ilişkilidir. Genellikle deniz balıkları larvalarında ağız açılımdan bir gün önce tespit edilen amilaz aktivitesi larval gelişime bağlı olarak artış göstermekte ancak sonraları giderek azalarak, sabit bir düzeyde seyretmektedir. Levrek larvalarında yapılan bir çalışmada amilaz enzim aktivitesinin larval periyodun ilk günlerindeki artışını sonraki günlerde azalma izlemiş, sonuçta genç larvalardaki mRNA amilaz enzim düzeyinin yaşı daha büyük olan larvalara göre daha yüksek olduğunu ve sonraki günlerde azalmanın sabit düzeyde devam etmesinin nedenin mRNA düzeyinin kopyalanarak devam bildirilmiştir (Perés ve diğ., 1998). Bu durum, Zambonino Infante and Cahu (1994b), Krogdahl and Sundby (1999), Riberio ve diğ. (1999), Buchet ve diğ. (2000), Kolkovski (2001), Zambonino Infante and Cahu (2001), Cahu and Zambonino Infante (2001) ve Suzer ve diğ. (2006, 2007a) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar açısından genetik programlanmayı doğrular niteliktedir. Bu çalışmada da, mikropartikül yem kullanımı ile birlikte amilaz aktivitesi önemli ölçüde artış göstermiştir. Bu durumun mikropartikül yem içeriğindeki %12 oranında nişasta varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuç, benzer yapılan çalışmalarla büyük benzerlik taşımaktadır (Zambonino Infante and Cahu, 1994a,b; Cahu ve diğ., 1995; Nolting ve diğ., 1999).

Deniz balıkları larvalarında lipaz aktivitesi ilk olarak genellikle ağız açılımdan 1 gün sonra görülmektedir. Bu enzimatik gelişim profilinin larval gelişim ontogenesisi içinde genetiksel programlamadan kaynaklandığı düşünülmektedir (Zambonino Infante and Cahu, 2001; Cahu and Zambonino Infante, 2001). Bu bağlamda, levrek larvalarında ilk lipaz aktivitesi tespiti ağız açılımı ve eksojen besin alımı ile birlikte 5. günde tespit edilirken (Cahu and Zambonino Infante, 1994), kırma mercan ve sivriburun karagöz larvalarında ağız açılımı ve eksojen besin alımının başlamasından 1 gün sonra tespit edilmiştir (Suzer ve diğ., 2006; 2007a). Aynı şekilde, ilk lipaz

aktivitesi sargos larvalarında 4. günde bulunurken (Cara ve diğ., 2003) eşkine larvalarında (*Sciaenops ocellatus*) ise 3. günde tespit edilmiştir (Buchet ve diğ., 1997, 2000; Lazo ve diğ., 2000). Larval dönemdeki lipaz aktivitesi kullanılan yem içeriğindeki trigliserid ve lipid miktarı ile doğrudan ilişkilidir (Zambonino Infante and Cahu, 2001; Cahu and Zambonino Infante, 2001). Özellikle son yıllarda larval beslemede canlı yemlerin zenginleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan Selco türevli ticari zenginleştiriciler fazla miktarda HUFA ve trigliserid türü lipid molekülleri içermektedir. Larval besleme süresince en önemli canlı yem grubunu oluşturan *Artemia* naupliilerin 24 saat boyunca Selco türevli ticari zenginleştiriciler ile zenginleştirilmesi sonrasında larvaların lipaz aktivitesinde göreceli olarak önemli artışlar tespit edilmiştir. Bu değerlere benzer sonuçlar, Senegal dil balığı (Martinez ve diğ., 1999), eşkine (*Sciaenops ocellatus*) (Buchet ve diğ., 1997, 2000) ve levrek (Zambonino Infante and Cahu, 2001) için bildirilmiştir. Öte yandan, metamorfoz ve fonksiyonel mide oluşumunun ardından başlayan mikropartikül toz yem uygulaması sonrasında da lipaz aktivitesinde göreceli olarak artışlar izlenmektedir. Bunun nedeni olarak mikropartikül toz yemin besin madde içeriğine bağlı olarak içerdiği lipid düzeyidir. Bütün bu açıklamaların ışığında kısaca vurgulamak gerekirse, sonuçta, larval dönemdeki lipaz aktivitesi kullanılan yem içeriğindeki trigliserid ve lipid düzeyi ile doğrudan ilişkilidir (Zambonino Infante and Cahu, 2001; Cahu and Zambonino Infante, 2001). Mikropartikül yem girişinin ardından, amilaz ve lipaz aktivitesindeki artış kültürü yapılan levrek, Senegal dil, çizgili levrek, kırma mercan (*Pagellus erythrinus*) ve fangri (*Pagrus pagrus*) gibi türler için önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Cahu and Zambonino Infante, 1994, Walford and Lam, 1993; Ribeiro et al., 1999; Darias et al., 2005; Suzer et al., 2006). Ayrıca, mikropartikül yem üretim teknolojisinde bağlayıcı madde olarak nişasta kullanımı (<%12), hammaddeler içinde önemli bir yer tutan balık yağının (<%15) kullanımı amilaz ve lipaz enziminin aktivitesini artıran önemli etkidir. Bu bağlamda, çipura larvaları ile yaptığımız bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalarla benzerlik taşımaktadır.

Sonuç olarak, ülkemizde çipura larva üretiminde mikropartikül toz yeme geçiş dönemi, pratikte tanklardaki canlı ağırlık oranı dikkate alınmadan 30-35. günlerden itibaren (levrek larva üretiminde olduğu gibi) ya da 42-44. günlerden sonra başlamaktadır. Bu noktada yapılan uygulamadaki en temel yanlış, fonksiyonel mide oluşumunun dikkate alınmaması nedeniyle özellikle mikropartikül yemin ilk verildiği günlerde sindirilememe sonucu kabızlığın neden olduğu yüksek oranda mortalitedir. Levrek larvasında fonksiyonel mide oluşumunun (ilk pepsin sentezi) 24-25. günde meydana gelmesi bu mortalite oranını oldukça düşürürken, erken dönemde verilen mikropartikül yem çipura larvalarında yüksek oranda ölüme yol açmaktadır. Bu bağlamda, fonksiyonel mide oluşumu tespitinin belirleyici bir dönüm noktası olduğu göz önüne alındığında özellikle 38-40. günlerde başlayacak mikropartikül yem girişi, mortaliteyi oldukça aza indirecektir.

Öte yandan, kullanılan yemin üretim teknolojisi, rengi,

sudaki dağılım süresi, sindirilebilirliği, özellikle boyutu (100–200 μ arası) ve besin madde içeriği sövraj sırasında yaşama oranını artmasını sağlayacak önemli unsurların başında gelmektedir. Bununla birlikte, sövraj sırasında mikropartikül yemin yenmemesi nedeniyle tank zemininde oluşan fekes ve yem artıklarının düzenli temizlenmesi, azotlu bileşiklerin ve sudaki çözülmüş oksijen düzeyinin sıkı takibi de mortalitenin azalmasında kuşkusuz önemli bir adımı oluşturacaktır.

Teşekkür

Denemelerin yürütülmesinde sahip oldukları teknik imkanları sınırsızca kullanmamızı sağlayan tüm Kılıç Deniz Ürünleri A.Ş. Ören Kuluçkahane Tesisleri personeline teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Baccaria, C., J.P. Diaz, R. Connes and B. Chatain. 1991. Organogenesis of exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture*, 99: 339–354.
- Baglole, C.J., G.P. Goff and G.M. Wright. 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *J. Fish Biol.* 53: 767–784.
- Baskerville-Bridges, B., L. J. Kling. 2000. Early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture*, 189:109–117.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Buchet, V., J.L. Zambonino Infante and C.L. Cahu. 1997. Variation in activities of some digestive enzymes during larval development of *Sciaenops ocellatus*. In: Creswell, L., Harache, Y. (Eds.), *Island Aquaculture and Tropical Aquaculture. Communications and Abstracts Martinique 97 — European Aquaculture Society International Conference, Les Trois Ilets, Martinique, 4-9 May 1997. European Aquaculture Society, Oostende*, pp. 55–56.
- Buchet, V., J.L. Zambonino Infante and C.L. Cahu. 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*, 184: 339–347.
- Cahu, C.L. and J.L. Zambonino Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109 (A): 213–222.
- Cahu, C.L., and J.L. Zambonino Infante. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive function in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 431–437.
- Cahu, C.L., and J.L. Zambonino Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161–180.
- Cara J.B., F.J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Díaz and M. Yúfera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology*, 63: 48–58.
- Cumow J., J. King, G. Partridge and S. Kolkovski. 2006. Effects of two commercial microdiets on growth and survival of barramundi (*Lates calcarifer* Bloch) larvae within various early weaning protocols. *Aquac. Nutr.*, 12: 247–255.
- Darias, M.J., H.M. Murray, G. Martínez-Rodríguez, S. Cárdenas, M. Yúfera. 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*, 248: 245–252.
- Dinis, M.T., L. Ribeiro, L.E.C. Conceição and C. Aragão. 2000. Larvae digestion and new weaning experiments in *Solea senegalensis*. *Cah. Options Méditerr.*, 47: 193–204.
- Hamlin, H.J. and L.J. Kling. 2001. The culture and early weaning of larval haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) using a microparticulate diet. *Aquaculture*, 201: 61–72.
- Kolkovski, S., A. Tandler, G.W. Kissil, A. Gertler. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead sea bream larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 203–209.
- Kolkovski, S., A. Tandler, M.S. Izquierdo. 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148: 313–322.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and application to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181–201.
- Krogdahl, A. and A. Sundby. 1999. Characteristics of pancreatic function in fish. In: Pierzynowski, S.G., Zabielski, R. (Eds.), *Biology of the Pancreas in Growing Animals*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 437–458.
- Lazo J.P., G.J. Holt and C.R. Arnold. 2000. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition*, 6: 183–192.
- Martinez, I., F.J. Moyano, C. Fernández-Díaz and M. Yúfera. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 317–323.
- Métais, P. and J. Bieth. 1968. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.*, 26: 133–142.
- Moyano, F. J., M. Diaz, F. J. Alarcon and M.C. Sarasquete. 1996. Characterisation of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 121–130.
- Moyano, F.J., A.M. Barros, A. Prieto, J.P. Cañavate and S. Cárdenas. 2005. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). *Revista AquaTIC*, 22: 39–47.
- Nolting M., B. Ueberschar and H. Rosenthal. 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.
- Péres, A., J.L. Zambonino Infante and C.L. Cahu. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 145–152.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu and M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179: 465–473.
- Saka, Ş. and K. Firat. 2000. Reproductive Biology and Culture Techniques of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.). Republic of Turkey, The Ministry of Agriculture and Rural Affairs, General Directorate of Agricultural Research, Seminar on Reproductive Biology and Culture Techniques of Commercial Fish Species, Ankara, pp: 57–66.
- Süzer, C., K. Firat and Ş. Saka. 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. larvae. *Aquaculture Research*, 37: 1565–1571.
- Süzer, C., S. Aktülün, D. Çoban, H.O. Kamacı, Ş. Saka, K. Firat and A. Albaz. 2007a. Digestive Enzyme Activities in Sharpnose Seabream (*Diplodus puntazzo*) Larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 148 (A): 470–477.
- Süzer, C., K. Firat, Ş. Saka, and A. Karacaoğlan. 2007b. Effects of Early Weaning on Growth and Digestive Enzyme Activity in Larvae of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgah*, 59 (2): 81–90.
- Tseng, H.C., J.H. Grendell and S.S. Rothman. 1982. Food, deodenal extracts, and enzyme secretion by the pancreas. *Am. J. Physiol.*, 243: G304–312.
- Versaw, W.K., S.L. Cuppett, D.D. Winters and L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.*, 54: 1557–1558.
- Walford, J. and T.J. Lam. 1993. Development of the digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109: 187–205.
- Worthington, T.M. 1982. Enzymes and related biochemicals. *Biochemical Products Division. Worthington Diagnostic System Freehold, NJ*.
- Zambonino Infante, J.L., and C.L. Cahu. 1994a. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A: 209–212.
- Zambonino Infante, J.L., and C.L. Cahu. 1994b. 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., C.L. Cahu, A. Peres, P. Quazuguel, and M.M. Le Gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture*, 139: 129–138.
- Zambonino Infante, J.L. and C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 130(C): 477–487.