

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00457

匙吻鲟仔稚鱼消化酶发育的研究

吉红^{1,2} 孙海涛³ 田晶晶¹ 邱立疆¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学安康水产试验示范站, 安康 725000;
3. 青岛农业大学理学与信息科学学院, 青岛 266109)

摘要: 对出膜后 0—53d 匙吻鲟的酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、 α -淀粉酶、脂肪酶以及磷酸酶的活性变化进行了测定。匙吻鲟出膜后饲养于室内水泥培育池中, 从第 3 天开始投喂枝角类, 之后于第 40 天将试验鱼转移至池塘。试验材料为受精卵及出膜后第 3、第 6、第 12、第 20、第 30、第 40、第 44、第 47、第 53 天仔稚鱼样品。研究发现主要消化酶在出膜时或卵黄期即可检测出活力。碱性蛋白酶和酸性蛋白酶分别在出膜后 3d(3DAH)和刚出膜时(0DAH)检测出活力。碱性蛋白酶活力在 44DAH 达到最大值 $[(1.96 \pm 0.09) \text{ U/fish}]$, 47DAH 出现下降, 但在 53DAH 开始上升, 比活力在 53DAH 达到最大值 $[(8.84 \pm 0.59) \text{ U/mg protein}]$ 。酸性蛋白酶在 44DAH 达到最大值 $[(0.52 \pm 0.05) \text{ U/fish}]$, 比活力在 6DAH 出现第一个峰值 $[(2.08 \pm 0.09) \text{ U/mg protein}]$, 并在 30DAH 出现最小值 $[(0.83 \pm 0.06) \text{ U/mg protein}]$ 。试验期间碱性蛋白酶活力高于酸性蛋白酶。在 12DAH—40DAH 期间 α -淀粉酶活力相对稳定, 并在 47DAH 达到最大值 $[(0.42 \pm 0.03) \text{ U/fish}]$, 比活力在 12DAH 出现一个峰值 $[(1.18 \pm 0.12) \text{ U/mg protein}]$, 并于 47DAH 出现最大值 $[(1.94 \pm 0.16) \text{ U/mg protein}]$ 。发育早期脂肪酶活力较高, 活力和比活力分别在 30DAH $[(0.20 \pm 0.02) \text{ U/fish}]$ 和 6DAH $[(2.28 \pm 0.22) \text{ U/mg protein}]$ 出现最大值。碱性磷酸酶活力变化趋势与比活力变化趋势相似, 但是最大值分别出现在 44DAH $[(0.08 \pm 0.00) \text{ U/fish}]$ 和 30DAH $[(1.96 \pm 0.15) \text{ U/mg protein}]$ 。酸性磷酸酶活力在 3DAH 出现一个峰值 $[(0.01 \pm 0.00) \text{ U/fish}]$, 之后显著升高, 并在 44DAH 达到最大值 $[(0.05 \pm 0.00) \text{ U/fish}]$, 其比活分别在 30DAH $[(1.19 \pm 0.10) \text{ U/mg protein}]$ 和 44DAH $[(1.10 \pm 0.08) \text{ U/mg protein}]$ 出现两个峰值。结果表明, 蛋白酶、 α -淀粉酶和磷酸酶随个体发育活力增加, 碱性蛋白酶在个体发育早期对蛋白质的消化具有重要作用。养殖环境发生改变时, 酸性蛋白酶、 α -淀粉酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力在生长减慢时增加, 生长加快时降低, 而脂肪酶活力则维持稳定。

关键词: 匙吻鲟; 早期发育; 蛋白酶; α -淀粉酶; 脂肪酶; 磷酸酶

中图分类号: Q176 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0457-09

传统的鱼类苗种培育一般用浮游动物作为幼鱼的主要食物来源, 但随着苗种需求量和浮游动物培育成本的增加, 依赖活饵进行苗种培育成为制约鱼类养殖业发展的瓶颈^[1]。解决这一问题的有效途径是利用人工配合饲料替代浮游动物, 而人工饲料的使用也存在许多限制性因素, 其中一个重要因素是幼鱼对饲料的利用能力较弱, 这又取决于幼鱼对食物的吸收、消化和同化作用^[2]。因此了解幼鱼发育过程中上述作用的变化成为当前幼鱼营养研究的热点^[3]。由于幼鱼消化率的测定比较困难, 对幼鱼消化潜力的评估主要是进行基础消化酶的定量和分析

各消化酶在发育阶段的多样性变化。目前, 个体发育早期不同消化酶的表达已被作为幼鱼发育和成活率的指标^[4]以及人工饲料初始投喂的参考时间。仔稚鱼消化酶发育的研究在海水鱼类已有大量的报道, 例如斑带副鲈(*Paralabrax maculatofasciatus*)^[1]、塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[2]、似石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[5]、细点牙鲷(*Dentex dentex*)^[6]、大比目鱼(*Paralichthys californicus*)^[7]等, 而对淡水鱼类消化酶发育的研究较少, 仅见于长嘴硬鳞鱼(*Atractosteus tristoechus*)^[3]、喀拉鲃(*Catla catla*)^[8]、瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)^[9]等种类。

收稿日期: 2011-03-07; 修订日期: 2012-01-02

基金项目: 西北农林科技大学安康水产试验示范站建设项目(Z222020704); 陕西省科技厅农业攻关项目(2006K01-G1-2)资助

通讯作者: 吉红(1967—), 男, 河南灵宝人; 教授, 博士; 主要从事水生动物营养与饲料学研究。E-mail: jihong0405@hotmail.com

匙吻鲟(*Polyodon spathula*)又称匙吻白鲟、鸭嘴鲟,是原产于美国密西西比河和密苏里河流域的一种古老的大型淡水经济鱼类。其适应性强、生长迅速,以摄食浮游动物为主。我国于20世纪80年代从美国引进匙吻鲟,并于2001年在湖北省实现其人工繁殖,目前已推广到全国十多个省市^[10]。目前,有关匙吻鲟养殖方面的研究主要集中于生物学观察^[11]、养殖及繁殖技术^[12, 13]、肉质评价^[14, 15]等,且国内外尚无匙吻鲟专用配合饲料^[15]。本研究对匙吻鲟早期发育过程中主要消化酶(蛋白酶、 α -淀粉酶、脂肪酶和磷酸酶)活力及比活力进行检测,了解匙吻鲟个体发育早期主要消化酶活性的变化,为匙吻鲟早期发育生物学和消化生理提供基础资料,并为匙吻鲟仔稚鱼配合饲料的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

匙吻鲟受精卵购自宜昌三江渔业有限公司,在西北农林科技大学安康水产试验示范站进行孵化。匙吻鲟出膜后饲养在车间水泥池内,水泥池面积8.5 m²,水深0.6 m,采用微流水养殖,培育期间保证溶解氧>5 mg/L,氨氮<0.2 mg/L,亚硝酸盐<0.01 mg/L。放养密度为400尾/m²,并从出膜第3天开始投喂枝角类,直至第40天,为培育前期。之后将稚鱼转移至池塘,池塘面积2亩,水深1.2 m,培育期间溶解氧>5 mg/L,氨氮<0.5 mg/L,亚硝酸盐<0.05 mg/L。放养密度为10尾/m²。池塘培育期间不投饵,匙吻鲟摄食天然饵料,为培育后期。整个培育过程中未对匙吻鲟进行驯化。取受精卵及出膜后第3、第6、第12、第20、第30、第40、第44、第47、第53天仔稚鱼样品,液氮保存,用于消化酶活力测定。同时,测定样本体长及体重,观察仔稚鱼生长情况。

1.2 样品前处理

出膜后30d前,全鱼匀浆后取上清用于消化酶分析;第40天后,分离稚鱼消化道,将全消化道作为样品。为保证足够的样品量,受精卵及3DAH、6DAH中10个个体合并作为一个样品,12DAH、20DAH和30DAH分别将5个、3个和1个个体合并为一个样品。40DAH、44DAH、47DAH和53DAH是将3个消化道样品合并为一个样品。

将样品和0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.0)按照

1:9(m/v)混合,用高速分散器(XHF-D, SCIENIZ®, 宁波)对样品匀浆1.5min(10000 r/min),匀浆液在4℃条件下,3000 r/min离心10min(3—18K, Sigma®, 德国),取上清液分装于1.5 mL离心管,保存于-70℃。

1.3 酶活力测定

酸性蛋白酶和碱性蛋白酶 酸性蛋白酶和碱性蛋白酶分别以0.2%血红蛋白溶液(溶于0.04 mol/L HCl, pH 2.0)和1%干酪素溶液(溶于Tris-HCl, pH 8.5)作为底物。0.1 mL酶液与1.0 mL底物溶液混合后,于37℃水浴中准确反应30min,加入2.0 mL 10%三氯醋酸以终止反应。反应液放入离心机中离心3min(3000 r/min)。取1.0 mL上清液,加入2.5 mL Na₂CO₃ (0.4 mol/L)和0.1 mL福林酚试剂,混匀后在37℃水浴中孵化至少20min,冷却后在680 nm波长下进行比色(1240, SHIMADZU®, 日本)。以酪氨酸溶液作为标准。蛋白酶活力单位定义为:在37℃条件下,单位时间内生成1 μ mol酪氨酸所需的酶量^[16]。蛋白酶比活力单位定义为:在37℃条件下,单位时间内每毫克可溶蛋白生成1 μ mol酪氨酸所需的酶量^[17, 18]。

α -淀粉酶(E.C. 3.2.1.1) α -淀粉酶以1%淀粉溶液(1 g可溶性淀粉溶于100 mL 20 mmol/L磷酸盐缓冲溶液, pH 6.9)作为底物。0.5 mL底物溶液与0.1 mL酶溶液混合后,于25℃水浴中准确反应5min,加入1.0 mL DNS显色剂,并煮沸5min。冷却后在540 nm波长下测定吸光度。以一水麦芽糖溶液作为标准。 α -淀粉酶活力单位定义为:在25℃条件下,单位时间内生成1 μ mol麦芽糖所需的酶量^[19]。 α -淀粉酶比活力单位定义为:在25℃条件下,单位时间内每毫克可溶蛋白生成1 μ mol麦芽糖所需的酶量^[20]。

脂肪酶(E.C. 3.1.1.3) 将2.0 mL 50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 9.0)与0.5 mL橄榄油混合,加入0.1 mL酶液并于37℃水浴中反应10min(精确计时),加入4.0 mL甲苯终止反应。反应液离心后(3000 g/min, 3min)取4.0 mL上清液,加入1.0 mL 0.5%醋酸铜溶液(pH 6.1),混合后离心,取上清液在710 nm波长下测定吸光度。以油酸作为标准。脂肪酶活力单位定义为:在37℃条件下,单位时间内生成1 μ mol油酸所需的酶量。脂肪酶比活力单位定义为:在37℃条件下,单位时间内每毫克可溶蛋白生成1 μ mol油酸所需的酶量^[21]。

碱性磷酸酶和酸性磷酸酶 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力分别使用南京建成生物工程研究所的

碱性磷酸酶测定试剂盒(A059)和酸性磷酸酶测定试剂盒(A060)进行测定。

1.4 可溶性蛋白含量测定

采用 Folin-酚试剂法(Lowry 法)对酶液溶液蛋白质定量^[22], 牛血清白蛋白作为标准。

1.5 数据统计

实验结果用平均值±标准差表示(means±SD), 用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(AVOVA), 显著性水平为 $P = 0.05$ 。

2 结果

试验期间匙吻鲟体长及体重增长情况(图 1A、B)。培育前期(室内水泥池培育期间, 0DAH- 40DAH), 体长及体重均以指数形式增长, 指数方程分别为 $Y=1.297e^{0.061X}$ ($R^2=0.981$) 和 $Y=0.016e^{0.164X}$ ($R^2=0.967$)。进入培育后期(池塘培育期)后, 体长及体重增长速

率均大幅下降。

6 种消化酶活力及比活力变化(图 2)。除碱性蛋白酶外, 其他酶都从受精卵(0DAH)里检测出活性。培育前期除脂肪酶外, 其他消化酶和磷酸酶活力都表现为随培育时间的延长酶活力增加的趋势。进入培育后期后, 酸性蛋白酶、 α -淀粉酶和磷酸酶的活力都出现不同程度的下降。

碱性蛋白酶活力和比活力(图 2A-a)都在 3DAH 出现第一个峰值[(0.17±0.01) U/fish, (2.27±0.10) U/mg protein], 其后都逐渐升高; 活力在 44DAH 达到最大值[(1.96±0.09) U/fish], 47DAH 出现下降, 但在 53DAH 开始上升; 比活力在转入池塘培育后变化较小, 并在 53DAH 达到最大值[(8.84±0.59) U/mg protein]。酸性蛋白酶活力(图 2B)在 3DAH 出现一个微弱的峰值[(0.11±0.02) U/fish], 6DAH 开始活力逐渐增加, 并在 44DAH 达到最大值[(0.52±0.05) U/fish],

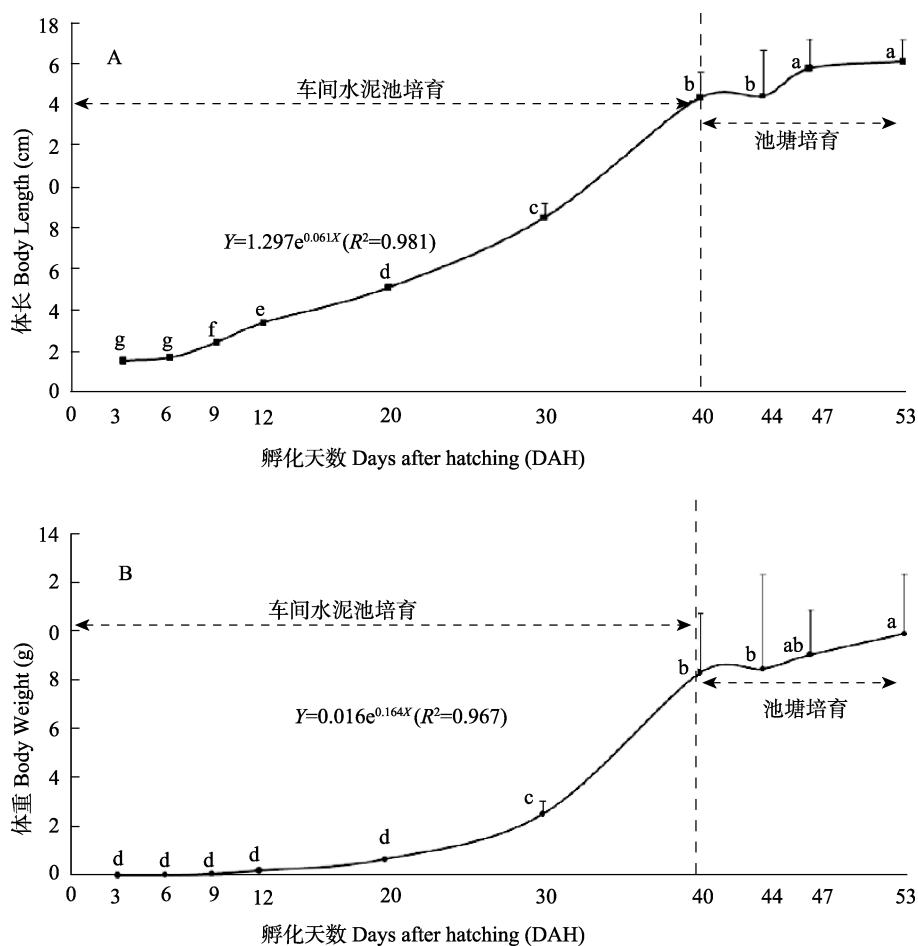
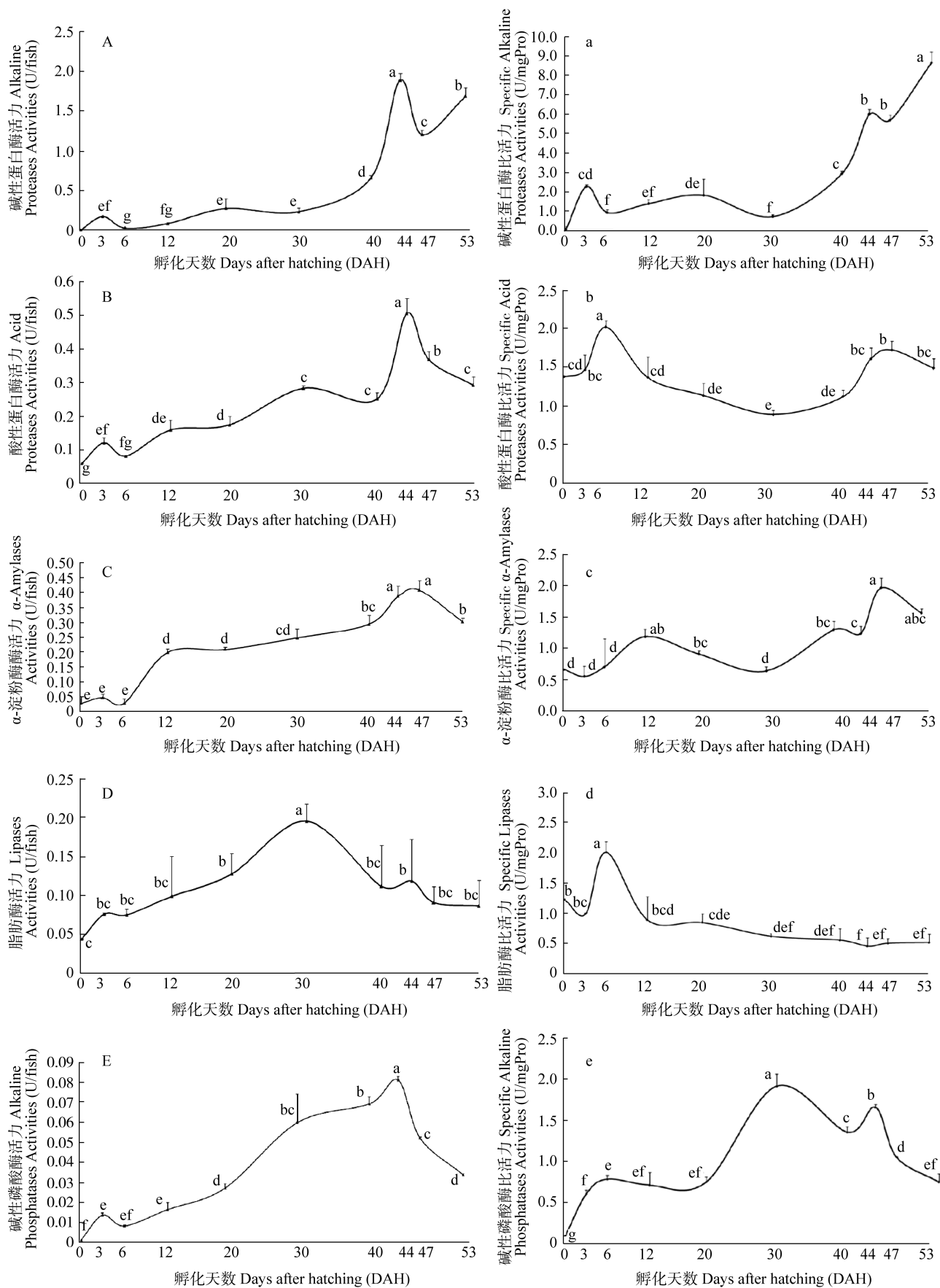


图 1 试验期间匙吻鲟幼鱼生长结果(means±SD, $n=30$; A. 体长; B. 体重)

Fig. 1 Groth of paddlefish larvae expressed as body length (A) and body weight (B) during the experiment (means±SD, $n=30$)

不同标记字母表示差异显著, 显著性水平为 $P<0.05$

Different superscripts (letters) indicate significant differences ($P<0.05$)



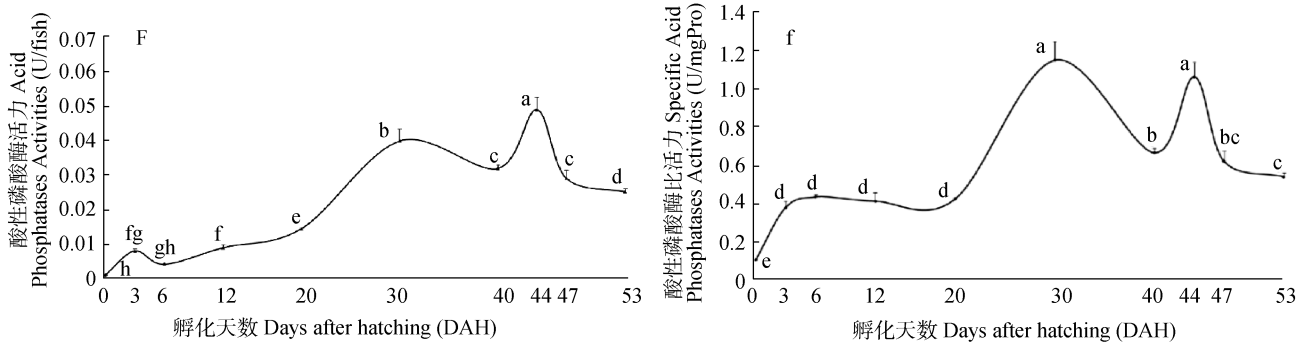


图 2 早期发育阶段匙吻鲟幼鱼消化酶活力、比活力结果(means $\pm$ SD, $n=3$, 不同标记字母表示差异显著, 显著性水平为 $P<0.05$)

Fig. 2 Digestive enzyme activities in paddlefish larvae during the early developmental stages expressed in units per larvae and units per milligram soluble protein [means $\pm$ SD, $n=3$. Different superscripts (letters) indicate significant differences ($P<0.05$)]

A (a). 碱性蛋白酶; B (b). 酸性蛋白酶; C (c). α -淀粉酶; D (d). 脂肪酶; E (e). 碱性磷酸酶; F (f). 酸性磷酸酶

A (a). alkaline proteases; B (b). acid proteases; C (c). α -amylases; D (d). lipases; E (e). alkaline phosphatases; F (f). acid phosphatases

随后活力下降; 其比活力(图 2b)变化趋势与活力变化趋势不同, 6DAH 出现第 1 个峰值[(2.08 $\pm$ 0.09) U/mg protein], 并在 30DAH 出现最小值[(0.83 $\pm$ 0.06) U/mg protein], 其后缓慢增加。总体而言, 碱性蛋白酶活力和比活力要高于酸性蛋白酶, 尤其在 30DAH 以后。

α -淀粉酶活力(图 2C)在 6DAH 之前没有显著性变化, 从 12DAH 开始活力显著性升高, 并在 47DAH 达到最大值[(0.42 $\pm$ 0.03) U/fish], 53DAH 出现下降; 比活力(图 2c)在 12DAH 出现一个峰值[(1.18 $\pm$ 0.12) U/mg protein], 然后一直下降至 30DAH, 随后开始上升, 并于 47DAH 出现最大值(1.94 $\pm$ 0.16 U/mg protein), 53DAH 出现下降。

脂肪酶(图 2D-d)活力和比活力表现出和其他酶不同的变化趋势, 活力和比活力在试验期间都只有一个峰值, 且在转入池塘培育后没有显著性变化。该酶活力从孵化后开始上升, 在 30DAH 达到最大值[(0.20 $\pm$ 0.02) U/fish], 其后下降, 从 40DAH 开始维持相对稳定; 比活力在 6DAH 出现最大值[(2.28 $\pm$ 0.22) U/mg protein], 之后显著降低, 从 30DAH 开始维持相对稳定。

碱性磷酸酶活力(图 2E)孵化后开始显著升高, 在 44DAH 达到最大值[(0.08 $\pm$ 0.00) U/fish], 然后显著下降; 碱性磷酸酶比活力(图 2e)变化趋势与活力变化趋势相似, 但是最大值出现在 30DAH [(1.96 $\pm$ 0.15) U/mg protein], 随后开始显著性下降。酸性磷酸酶活力(图 2F)在 3DAH 出现一个峰值[(0.01 $\pm$ 0.00) U/fish], 之后显著升高, 并在 44DAH 达到最大值[(0.05 $\pm$ 0.00) U/fish], 然后开始下降; 其比活力(图

2f)孵化后显著性升高, 并在 30DAH [(1.19 $\pm$ 0.10) U/mg protein]和 44DAH [(1.10 $\pm$ 0.08) U/mg protein]出现两个峰值, 44DAH 后显著性下降。从图中可以看出, 碱性磷酸酶活力和比活力的总体水平要高于酸性磷酸酶。

3 讨论

从图 1A、B 可以看出, 个体发育早期匙吻鲟体长的增长速度要快于体重增长速度。这是因为早期匙吻鲟处于卵黄期, 依靠卵黄营养进行发育, 没有摄入外源营养物质, 故体重增加较慢。依据这一现象可以用来判断鱼类从内源性营养转化为外源性营养的大致时间^[3]。由此可以认为 6—9DAH 时匙吻鲟进入外源性营养时期。鱼类早期个体发育从内源性营养转变为外源性营养是一个非常关键的时期, 尤其是消化道的发育。不同于其他器官的逐次发育, 消化道在这一时期将发生急剧的变化, 由直的、管状的简单结构发育为具有功能分区的复杂结构^[23]。在本研究中, 碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、脂肪酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的活力都在 0—6DAH 期间都发生了显著性变化。从图 2 可以看出, 培育前期检测的酶活力和比活力都发生了显著性变化, 又由于这个时期全部以浮游动物为饵料, 推测消化酶活力的变化是鱼体自身消化器官发育所造成的^[24]。从室内培育转为池塘培育后, 环境和食物条件发生了变化, 体长和体重增长率在 40—44DAH 出现下降, 之后又上升。碱性蛋白酶、酸性蛋白酶, 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力以及 α -淀粉酶活力均出现先增加, 其后下降的趋势; 脂肪酶活力在环境和食

物发生变化时仍维持稳定。这一现象可能是匙吻鲟为了应对生长减慢的情况,使得体内酸性蛋白酶、 α -淀粉酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力增加,以提高机体对食物的消化和吸收能力;而当生长速度加快时,上述酶的活力相应地下降。相关机制尚需深入探讨。

在本研究中,碱性蛋白酶在发育早期阶段(3DAH)即检测出活力,这同许多种类的研究相似,如斑带副鲈(*Paralabrax maculatofasciatus*)^[11]、塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[2]、似石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[5]、细点牙鲷(*Dentex dentex*)^[6]等。已有研究表明:有胃鱼类发育早期,胃在形态学和功能学上没有发育成熟且不能分泌酸性物质和胃蛋白酶时,食物中蛋白质的消化由丝氨酸蛋白酶(在碱性 pH 条件下发生作用)介导完成^[23],这些碱性丝氨酸蛋白酶主要有胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等^[24]。随着发育过程中器官和组织的完善,对蛋白消化有主导作用的酶的种类也逐渐发生转变,例如由胰蛋白酶到胰凝乳蛋白酶再到胃蛋白酶,这一过程主要表现为不同酶活力的短时间变化和相对稳定状态^[5]。大多数的研究认为,胃的消化功能发育成熟后,蛋白质的消化则主要依赖于胃的酸性消化,碱性蛋白酶的作用将逐渐降低^[3]。然而,本研究发现碱性蛋白酶活力在酸性蛋白酶活力逐渐增加的过程中也逐渐升高,并且在整个试验过程中碱性蛋白酶的活力和比活力都高于酸性蛋白酶,与前人的研究结果不一致。与网箱不投饵养殖匙吻鲟碱性蛋白酶的活力和比活力相比(本研究室未发表资料),本试验的碱性蛋白酶活力和比活力低于商品规格匙吻鲟(456.4—585.4 g)的水平。这说明匙吻鲟胃的消化功能发育成熟后,碱性蛋白酶在匙吻鲟的蛋白消化过程中仍发挥着重要作用。

仔鱼胃的分化对其营养生理具有重要的影响,其功能的完善可以提高蛋白消化效率^[2, 25]。在本研究中从受精卵开始即检测出酸性蛋白酶活力,并随发育时间活力逐渐增加,相似的结果在其他种类如长嘴硬鳞鱼(*Atractosteus tristoechus*)^[3]、高首鲟(*Acipenser transmontanus*)^[26]、鸭嘴鲶(*Pseudoplatystoma corruscans*)^[27]等曾被报道。使用微粒饲料完全替代浮游动物进行苗种培育已在鳙(*Aristichthys nobilis*)、虱目鱼(*Chanos chanos*)和某些鲑科鱼类获得成功;但对大多数种类来说,在早期培育阶段完

全使用微粒饲料仍存在许多限制性因素,其中一个重要因素是胃蛋白酶的缺失^[28]。依据图 2B 结果,认为匙吻鲟胃腺发育及胃蛋白酶的出现发生在 6—12DAH。因此,可在这一时期使用微粒饲料部分替代浮游动物进行混合投喂,并逐渐增加替代量直至完全替代。考虑到这一时期酶活力较低,可使用水解蛋白作为饲料蛋白源或在饲料中使用某些酶添加剂。

α -淀粉酶活力和比活力从试验开始时就检测出来,并随着日龄增加而上升,在 47DAH 达到峰值,随后下降。这种发育模式同似石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[5]、细点牙鲷(*Dentex dentex*)^[6]、大比目鱼(*Paralichthys californicus*)^[7, 27]的报道一致。仔鱼个体发育过程 α -淀粉酶活力的变化可能与食物中碳水化合物含量有关,尤其是浮游动物中高水平糖原含量能刺激淀粉酶的合成和分泌,而配合饲料中较低水平的糖原含量会降低酶活力^[29]。本试验在培育前期,从 12—40DAH 期间 α -淀粉酶活力和比活力相对稳定,可以考虑在这一期间投喂高碳水化合物水平的饲料,以刺激 α -淀粉酶的合成和分泌,促进仔鱼对碳水化合物的利用,以达到节约蛋白的目的。

脂肪酶活力从受精卵中即可检测出,并随日龄增加而升高,在 30DAH 达到峰值,随后下降;而比活力在 6DAH 达到峰值,其后迅速下降并维持相对稳定,这一发育模式同细点牙鲷(*Dentex dentex*)^[6]的相似。Oozeki 和 Bailey^[30]认为,鱼类个体发育早期存在两种类型的脂肪酶,一种是用于卵黄的吸收,而另一种是用于外源性脂肪的消化。在本研究中早期较高的脂肪酶比活力说明其对卵黄吸收的重要性,而 12—30DAH 期间活力的快速增加也反映出仔鱼胰腺的发育,脂肪代谢系统的完善和对食物脂质利用能力的增加。

肠壁消化酶(氨肽酶,磷酸酶等)可用于指示肠上皮细胞的成熟程度。磷酸酶是一类参与营养代谢、矿化作用、肠道转运和磷酸化蛋白水解的酶类,具有两个重要的功能:其一,参与磷酸化蛋白的胞内水解,所产生的无机磷用于能量代谢(酸性磷酸酶);其二,参与营养物质从膜到细胞内的转运,即吸收过程(碱性磷酸酶)。当肠上皮细胞负载能力达到最大时,磷酸酶活力增加,同时肽链端解酶活力降低。磷酸酶还可通过对其他消化酶进行磷酸化修饰提高其酶活力,进而提高其消化能力。研究表明,磷酸酶活力快速增加时,预示着肠道发育成熟,此

时幼鱼获得与成鱼相近的腔消化能力^[1-3]。在本研究中, 碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力都从 20DAH 开始显著增加; 而在整个试验过程中, 碱性磷酸酶活力和比活力都高于酸性磷酸酶, 其意义尚需深入探讨。这一现象有可能表明该期间肠道的吸收功能更为重要^[3]。

4 结论

匙吻鲟仔稚鱼主要消化酶在出膜时或卵黄期即可检测出活力。蛋白酶、 α -淀粉酶和磷酸酶随个体发育活力增加; 碱性蛋白酶在个体发育早期对蛋白质的消化具有重要作用。养殖环境发生改变时, 酸性蛋白酶、 α -淀粉酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力在生长减慢时增加, 生长加快时降低, 而脂肪酶活力则维持稳定。

参考文献:

- [1] Alvarez-González C A, Moyano-López F J, Civera-Cerecedo R, et al. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 2008, **34**: 373—384
- [2] Martínez I, Moyano F J, Fernández-Díaz C, et al. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*) [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 1999, **21**: 317—323
- [3] Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, et al. Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar *Atractosteus tristoechus* [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 2006, **32**: 147—157
- [4] Ueberschär B. Measurement of Proteolytic Enzyme Activity: Significance and Application in Larval Fish Research [M]. In: Walther B T, Fyhn H J (Eds.), *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. University of Bergen, Norway. 1993, 233—237
- [5] Lazo J P, Mendoza R, Holt G J, et al. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) [J]. *Aquaculture*, 2007, **265**: 194—205
- [6] Gisbert E, Giménez G, Fernández I, et al. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny [J]. *Aquaculture*, 2009, **287**: 381—387
- [7] Alvarez-González C A, Cervantes-Trujano M, Tovar-Ramírez D, et al. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 2006, **31**: 83—93
- [8] R M Rathore, S Kumar, R Chakrabarti. Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in Catla catla (Family: Cyprinidae) during early developmental stages [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 2005, **142**: 98—106
- [9] Li Q, Long Y, Qu B, et al. Assessment of digestive enzymes activities during larval development of *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(1): 73—78 [李芹, 龙勇, 屈波, 等. 瓦氏黄颡鱼仔稚鱼发育过程中消化酶活性变化研究. 中国水产科学, 2008, **15**(1): 73—78]
- [10] Ji H, Wang C Z. China's limited Paddlefish culture focused on meat production [J]. *Global Aquaculture Advocate*, 2009, July/August: 30—32
- [11] Liu J H, Chen C Q, Diao X M, et al. Study on post-embryo development of quantitative characters of feeding organs in paddlefish, *Polyodon spathula* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 1998, **7**(4): 288—293 [刘建虎, 陈昌齐, 刁晓明, 等. 匙吻鲟摄食器官数量性状胚后发育研究. 上海水产大学学报, 1998, **7**(4): 288—293]
- [12] Ji H, Shan S T, Cao F Y, et al. Study on rearing paddlefish *Polyodon spathula* juvenile using spawning pool of Chinese carp in Ankang area [J]. *China Fisheries*, 2009, **3**: 43—44 [吉红, 单世涛, 曹福余, 等. 安康地区利用家鱼产卵池培育匙吻鲟苗种技术研究. 中国水产, 2009, **3**: 43—44]
- [13] Mims S D, Shelton W L, Wynne F S, et al. Production of Paddlefish [M]. SRAC Publication. 1999, 437
- [14] Shen S, Zhou J C, Zhao S M, et al. The nutritional composition and evaluation of muscle of *Polyodon spathula* [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2009, **31**(3): 295—297 [沈硕, 周继成, 赵思明, 等. 匙吻鲟的营养成分及肌肉营养评价. 营养学报, 2009, **31**(3): 295—297]
- [15] Ji H, Sun H T, Shan S T. Evaluation of nutrient components and nutritive quality of muscle between pond- and cage-reared paddlefish (*Polyodon spathula*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, **35**(2): 261—267 [吉红, 孙海涛, 单世涛. 池塘与网箱养殖匙吻鲟肌肉营养成分及品质评价. 水产学报, 2011, **35**(2): 261—267]
- [16] Liu X D, Liang M Q, Zhang L M, et al. Effect of fish protein hydrolysate levels on growth performance and biological and physiological parameters in tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther, 1983) Post-larvae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 242—249 [刘旭东, 梁萌青, 张利民, 等. 饲料中添加水解鱼蛋白对半滑舌鲷稚鱼生长及生理生化指标的影响. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 242—249]
- [17] Chong A, Hashim R, Chow Y, et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) [J]. *Aquaculture*, 2002, **203**: 321—333
- [18] Liu Z Y, Wang Z, Xu S Y, et al. Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, **14**: 31—39
- [19] Han Q, Liu L G, Zhang J P, et al. The effects of temperature and pH on activities of digestive enzymes in catfish (*Silurus Asotus* Linnaeus) in Dongting Lake area [J]. *Acta Hydro-*

- biologica Sinica*, 2011, **35**(1): 22—29 [韩庆, 刘良国, 张建平, 等. 温度和 pH 对洞庭鲢鱼消化酶活性的影响. 水生生物学报, 2011, **35**(1): 22—29]
- [20] Natalia Y, Hashim R, Ali A, *et al.* Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) [J]. *Aquaculture*, 2004, **233**: 305—320
- [21] Jiang H F, Wang Y Q, Liu C G. Comparison and improvement of three determination methods for lipase activity [J]. *Chemistry and Bioengineering*, 2007, **24**(8): 72—75 [江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进. 化学与生物工程, 2007, **24**(8): 72—75]
- [22] Fu Y H, Wang J G. Improvement of the method for determining the protein quantity of Huai'er granules [J]. *Chinese Journal of Drug Application and Monitoring*, 2005, (6): 21—23 [傅应华, 王金观. 槐耳颗粒蛋白含量测定方法的改进. 中国药物应用与监测, 2005, (6): 21—23]
- [23] Govoni J J, Boehlert G W, Watanabe Y. The physiology of digestion in fish larvae [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1986, **16**: 59—77
- [24] Zambonino Infante J L, Cahu C. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 1994, **12**: 399—408
- [25] Segner H, Storch V, Reinecke M, *et al.* The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. *Marine Biology*, 1994, **119**: 471—486
- [26] Gawlicka A, The S J, Hung SSO, *et al.* Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 1995, **14**: 357—371
- [27] Lundstedt L M, Bibiano J F, Moraes G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition [J]. *Comparative Biochemistry Physiology*, 2004, **137B**: 33—339
- [28] Kolkovski S. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets [J]. *Aquaculture*, 2001, **200**: 181—201
- [29] Ma H, Cahu C, Zambonino Infante J L, *et al.* Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Aquaculture*, 2005, **245**: 239—248
- [30] Oozeki Y, Bailey K M. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma* [J]. *Marine Biology*, 1995, **122**: 177—186

DIGESTIVE ENZYME ACTIVITY DURING EARLY LARVAL DEVELOPMENT OF THE PADDLEFISH *POLYODON SPATHULA*

JI Hong^{1,2}, SUN Hai-Tao³, TIAN Jing-Jing¹ and QIU Li-Jiang¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Ankang Fisheries Experimental and Demonstration Station, Northwest A & F University, Ankang 725000, China; 3. Science and Information College, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The ontogenesis of digestive enzymes (proteases, α -amylases, lipases and phosphatases) in paddlefish *Polyodon spathula* was determined in larvae between 0-53 days after hatching (DAH). From initiation of exogenous feeding (3 DAH), larvae were fed Cladocera for 37 days in indoor cement pit, and then transferred to pond fed natural food. Fertilized eggs and larval fish samples day 3, 6, 12, 20, 30, 40, 44, 47 and 53 after hatching were taken as the test materials. The results showed that most of the digestive enzymes activities could be detected before the onset of the exogenous feeding. Alkaline protease activity was detected at 3 DAH and acid protease activity was quantifiable from eggs. Alkaline protease activity reached to the maximum level at 44 DAH [(1.96 $\pm$ 0.09) U/fish], followed by a decrease and then an increase on 47 DAH. The specific alkaline protease activity reached to the peak level at 53 DAH [(8.84 $\pm$ 0.59) U/mg protein]. Acid protease had its maximum activity at 44 DAH [(0.52 $\pm$ 0.05) U/fish], its specific activity reached the first peak on 6 DAH [(2.08 $\pm$ 0.09) U/mg protein], followed by the minimum on 30 DAH [(0.83 $\pm$ 0.06) U/mg protein]. Alkaline protease activity was consistently higher than acid protease activity. α -Amylases activity was relatively stable during incubation period in workshop (12 DAH-40 DAH) and reached to the maximum on 47 DAH [(0.42 $\pm$ 0.03) U/fish]. Two peaks were found about the specific α -amylase activity, a small one on 12 DAH [(1.18 $\pm$ 0.12) U/mg protein] and the maximum peak on 47 DAH [(1.94 $\pm$ 0.16) U/mg protein]. Both lipase activity and specific lipase activity had one peak on 30 DAH [(0.20 $\pm$ 0.02) U/fish] and 6 DAH [(2.28 $\pm$ 0.22) U/mg protein] respectively. High lipase activity implied the importance of lipid utilization. The alkaline phosphatase activity and the specific phosphatase activity showed similar trends, with the exception of the maximum period, 44 DAH [(0.08 $\pm$ 0.00) U/fish] and 30 DAH [(1.96 $\pm$ 0.15) U/mg protein] respectively. Acid phosphatase activity had one peak on 3 DAH [(0.01 $\pm$ 0.00) U/fish], followed by a significant increase and reached maximum on 44 DAH [(0.05 $\pm$ 0.00) U/fish]. Two main peaks were detected about the specific of acid phosphatase activity, one on 30 DAH [(1.19 $\pm$ 0.10) U/mg protein] and the other on 44 DAH [(1.10 $\pm$ 0.08) U/mg protein]. It suggested that protease, α -amylase and phosphatase activities increased with the ontogenesis of paddlefish, and alkaline protease was important to paddlefish larval. Acid protease, α -amylase, acid and alkaline phosphatase activities increased with growth decreasing and decreased with growth increasing when fish transferred to pond.

Key words: *Polyodon spathula*; Ontogenesis; Protease; α -amylase; Lipase; Phosphatase