

آنتوژنی فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک (پسین، تریپسین و کیمو تریپسین) ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) از زمان تخم‌گذاری تا روز ۵۰ پس از تخم‌گذاری

ندا قاسمی^۱، فرزانه نوری^{۲*}، احمد ایمانی^۱، رسول شهروز^۳

*f.noori@urmia.ac.ir

- ۱- گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران
- ۲- گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش، پژوهشکده آرتمیا و آبی پروری، دانشگاه ارومیه، ایران
- ۳- گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

مطالعه حاضر به آنتوژنی فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک (پسین، تریپسین و کیمو تریپسین) ماهی ازون برون می‌پردازد. نمونه‌هایی از لارو ماهی ازون برون بصورت تصادفی از زمان تخم‌گذاری تا ۵۰ روزگی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های پسین، تریپسین و کیموتریپسین تهیه شد. در لاروهای یک روزه ماهی ازون برون فعالیت پسینی سنجش شد و فعالیت این آنزیم از روز هشتم پس از تفریخ بویژه همزمان با انتقال از تغذیه درونی به بیرونی یک افزایش ناگهانی داشت ($p < 0.05$). میزان فعالیت تریپسین یک روز پس از تخم‌گذاری $0.04 \text{ U.mg protein}^{-1}$ بوده و در روز هشتم پس از تخم‌گذاری به حداکثر رسید ($p < 0.05$) و از روز دهم تا پنجاهم پس از تفریخ فعالیت کاهشی داشت. در کل روند فعالیت تریپسین کاهشی بود ($p < 0.05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در یک روز پس از تخم‌گذاری تعیین گردید ($0.03 \text{ U.mg protein}^{-1}$, $p < 0.05$). بعد از آن روند کاهشی داشت. به این معنا که در روزهای ۱۵ و ۳۱ پس از تخم‌گذاری کمی افزایش یافت و مجدد به روند کاهشی خود تا روز پنجاهم ادامه داد ($p < 0.05$). همبستگی پیرسون نشان داد که ارتباط میان میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین مثبت بود، اما این همبستگی میان آنزیم‌های فوق و پسین منفی بود ($p < 0.05$). این یافته نمایانگر افزایش غالبیت پروتئاز اسیدی در گوارش پروتئین نسبت به انواع قلیایی طی بلوغ دستگاه گوارش ماهی ازون برون می‌باشد. نتیجه آن که توسعه معده در گونه‌های ماهی دارای معده فعال به مفهوم شروع هضم اسیدی، پیشی گرفتن گوارش خارج سلولی و کارآمدتر شدن استفاده از منابع پروتئین موجود در رژیم/جیره‌های غذایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: دستگاه گوارش، لارو ازون برون، آنزیم‌های پروتئولیتیک، ماهیان خاویاری، *Acipenser stellatus*

*نویسنده مسئول

مقدمه

در دریای خزر ۱۰۰ گونه و زیرگونه مختلف از ماهیان شناسایی شده است. با این وجود بیشترین توجه و دقت همیشه به تاسماهیان معطوف بوده است. از خانواده تاسماهیان دو جنس *Huso* با یک گونه به نام فیل ماهی (بلوگا) و جنس *Acipenser* با ۵ گونه (۴ گونه دریایی و یک گونه رودخانه‌ای) در این بوم‌سازگان آبی وجود دارند (شریعتی، ۱۳۷۸). ماهیان خاویاری بدلیل ارزش اقتصادی و غذایی خاویار آنها یکی از مهمترین گروه ماهیان محسوب می‌شوند. کاهش میزان صید از منابع آبی موجب افزایش تلاش جهت توسعه صنعت پرورش ماهیان خاویاری در سرتاسر جهان و بویژه ایران شده است و انتظار می‌رود توجه مسئولان و سرمایه‌گذاران بخش خصوصی بیش از پیش به صنعت تکثیر و پرورش مصنوعی این آبزیان ارزشمند معطوف گردد (نصری چاری و همکاران، ۱۳۷۲). البته، توسعه صنعت آبی‌پروری و پرورش گونه‌های مختلف ماهی و سخت پوستان بی‌شک در گرو دستیابی به فناوری‌های تولید غذای مناسب حاصل شده است (Sorgeloos and Leger, 1992).

آگاهی در مورد تمایز دستگاه گوارش و غده‌های ضمیمه در طول مراحل تکاملی لاروی برای پی بردن به مکانیسم گوارش و فیزیولوژی جذب مواد غذایی و همزمان‌سازی مراحل فیزیولوژیکی تکامل با شیوه‌های تغذیه ای و پروتکل‌های پرورشی امری ضروری می‌باشد (Furne et al., 2001). بنابراین یکی از مشخصه‌های اصلی پایان مرحله لاروی، تکمیل و کارآمد شدن دستگاه گوارش می‌باشد. در نتیجه از مراحل تکاملی ماهیان سبب فائق آمدن بر برخی مشکلات تفریخ گاه‌های ماهیان و جایگزینی غذای زنده با جیره های مصنوعی می شود (Cahu et al., 1998). البته آنتوژنی دستگاه گوارش لارو ماهیان در طول ۲۵ سال گذشته مورد مطالعه قرار گرفته و بررسی‌های انجام شده بیشتر در ارتباط با آزاد ماهیان و ماهیان دریایی بوده است. اکثر مطالعات انجام شده روی آنتوژنی و تغییرات مورفواناتومیکی و بافت شناسی دستگاه گوارشی لارو ماهیان با تجهیزات میکروسکوپی و سنجش فعالیت آنزیم‌های گوناگون گوارشی_ترش‌شی از لوزالمعده،

معده و روده بوسیله خاصیت بیوشیمیایی متمرکز شده‌اند. البته به تازگی با استفاده از فنون زیست شناسی-مولکولی به بررسی داخلی اجزاء دستگاه گوارشی، بیان ژن‌ها در تکامل لارو ماهیان و کارایی دستگاه گوارش در طول مرحله آنتوژنی اولیه پرداخته شده است (Holt, 2011). بدین ترتیب، مطالعه دستگاه گوارش لارو ماهیان به دلیل حساسیت بالا نسبت به تغذیه و فراهم آوردن انرژی مورد نیاز برای نگهداری، شنا، رشد و به منظور حفظ بقاء و انتقال به مرحله جوانی باید با دقت بیشتری صورت پذیرد (Holt, 2011).

همانند اکثر گونه‌های ماهیان، دستگاه گوارش لارو ماهیان خاویاری نیز در مرحله تخم‌گذاری تکامل یافته نیست و باید قبل از شروع تغذیه خارجی، دستخوش تغییراتی به منظور کسب آمادگی جهت هضم و جذب غذا گردد (Buddington, 1991). لاروها پس از تخم‌گذاری از نظر تغذیه ای وابسته به کیسه زرده هستند و با اتمام آن، باید برای تامین انرژی و رشد، تغذیه خارجی را شروع کنند (Gisbert et al., 1998). لوله گوارش ماهیان خاویاری، هنگام شروع تغذیه خارجی نسبتاً تکامل یافته است و مشابه ماهیان جوان و بالغ می باشد (Dettlaff et al., 1995; Gawlicka et al., 2012). برخلاف ماهیان استخوانی، ماهیان خاویاری تکوین هولوبلاستیک دارند و در آنها کیسه زرده مستقیماً در تشکیل سیستم گوارش ماهی شرکت می‌کند (Gawlicka et al., 1995). در مطالعه آنتوژنی دستگاه گوارش ماهی قره برون، مشخص شد که لوله گوارش ماهیان در ابتدا دارای ساختار ساده و مملوء از زرده بود. معده، در روز هفتم پس از تخم‌گشائی، شامل دو بخش غده ای و غیر غده ای، شکل گرفت (خیاط زاده و همکاران، ۱۳۸۸). در فیل‌ماهی سه روز پس از تفریخ در دیواره لوله گوارش شیاری مورب در قسمت پشتی- خلفی کیسه زرده ایجاد شده و لوله گوارش به دو ناحیه معده و روده میانی تقسیم گردید و همزمان دریچه‌های اسپیرال تمایز یافتند (جرجانی و همکاران، ۱۳۹۱). در بررسی دستگاه گوارش لارو فیل‌ماهی مشخص شد که در زمان شروع تغذیه خارجی دارای غدد معدی فعال بود و برخلاف فعالیت پپسین، آنزیم‌های تریپسین و

لاروها عمدتاً توسط آنزیم های پروتئاز قلیایی از جمله تریپسین انجام می شود (Hjelmeland and Jorgensen 1985). در طول تغذیه درونی فعالیت آنزیم پروتئاز لوزالمعده اگر چه پایین است، ولی در برخی گونه های ماهیان آب شیرین مشاهده شده است (Chong et al., 2002).

بنابر ضرورت بررسی مربوط به چگونگی تغییر فعالیت آنزیم های گوارشی طی مراحل اولیه زندگی، مطالعه حال حاضر به بررسی روند تکاملی دستگاه گوارش از نظر فعالیت های آنزیمی در مراحل اولیه رشد ماهی ازون برون (لارو و بچه ماهی) پرداخته است. از این طریق زمان تغییر ساختارهای گوارشی از تغذیه داخلی به تغذیه خارجی مشخص می گردد و می توان از آن به عنوان معیاری جهت ارزیابی مدیریت تغذیه ای کارگاه های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری سود جست.

مواد و روش کار

نمونه برداری از لاروها و بچه ماهیان

لاروها از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی (رشت) تهیه شدند. نمونه برداری جهت سنجش فعالیت آنزیم های گوارشی (پسین، تریپسین و کیموتریپسین) بصورت کاملاً تصادفی و در روز های ۱، ۴، ۸، ۱۰، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۹، ۳۱، ۳۴، ۳۷، ۴۰، ۴۳، ۴۷ و ۵۰ پس از تخم گشایی انجام شد. ماهیان با استفاده غلظت بالای پودر گل میخک کشته و به کمک ازت مایع منجمد (Snap freeze) شدند. در نهایت برای نگهداری بلند مدت به فریز ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند. در هر مرحله تقریباً ۱۵-۱۰ قطعه لارو بصورت تصادفی به کمک ساچوک صید شد.

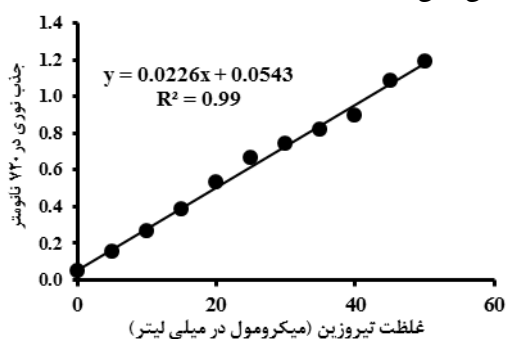
بررسی فعالیت آنزیم های گوارشی

جهت تهیه عصاره آنزیمی، نمونه ها به آزمایشگاه بیوشیمی گروه آبی پروری پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه منتقل شده و به نسبت وزنی ۱:۵ در محلول اسید کلریدریک ۱ میلی مولار، توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT1300A) به مدت ۱/۵ دقیقه همگن

کیموتریپسین پس از جذب زرده کاهش یافت، که نشان از اهمیت این آنزیم ها در مراحل جذب زرده می باشد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز طی روزهای هفتم تا چهاردهم نشان از تکامل روده در زمان آغاز تغذیه خارجی لارو فیل ماهی می باشد (Asgari et al., 2013). روند شکل گیری، تکامل و عملکرد دستگاه گوارش لارو ماهی خاویاری سفید (Acipenser transmontanus) با شروع تغذیه خارجی پیشرفت قابل ملاحظه ای داشت. همچنین با شروع تغذیه فعال افزایش ظرفیت گوارشی رخ داد. دو روز پس از تغذیه خارجی در غشاء نوار مسواکی روده فعالیت آلکالین فسفاتاز، آمینوترانسفراز M، دی پیپتیدیل پپتیداز IV و فعالیت گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز افزایش یافت، که نشان دهنده اهمیت این بخش از روده برای هضم پروتئین و جذب مواد غذایی است. پیشرفت عملکرد قسمت پیلوریک روده در روز چهارم اتفاق افتاد که با افزایش فعالیت غشاء نوار مسواکی و آنزیم های سیتوپلاسمی مانند استیل کولین استراز، دی پپتیداز II، β -گالاکتو پپتیداز همزمان بود. فعالیت ضعیف اگزوپپتیدازها و آلکالین فسفاتاز در روده قدامی نشان داد که این بخش از روده ممکن است نسبت به قسمت پیلوریک روده ماریچ در جذب مواد مغذی اهمیت کمتری داشته باشد. تفاوت کمی و کیفی مشاهده شده در فعالیت آنزیمی بخش های مختلف روده، حاکی از درجه بالایی از تخصص یافتگی هر بخش برای گوارش و جذب مواد مغذی بود (Gawlicka et al., 1995).

تغییر اساسی در تکامل ساختار گوارشی در طول مرحله اول زندگی ماهیان به وسیله تکمیل ترشح آنزیم های گوارشی مختلف و سطوح فعالیت شان اتفاق می افتد و تمایز سیستم هضمی (کانال ابتدایی و اندام های وابسته) در طول دوره تغذیه درونی رخ می دهد. مطالعات زیادی در خصوص بررسی تکامل دستگاه گوارش و آنزیم های هضمی لارو ماهیان دریایی منتشر شده است (Ribeiro et al., 1999; Gisbert et al., 2004). ولی مطالعات محدودی در رابطه با فعالیت آنزیم های گوارشی در لارو ماهیان آب شیرین وجود دارد. اکثر ماهیان استخوانی در طول مراحل لاروی فاقد معده هستند و گوارش غذا در

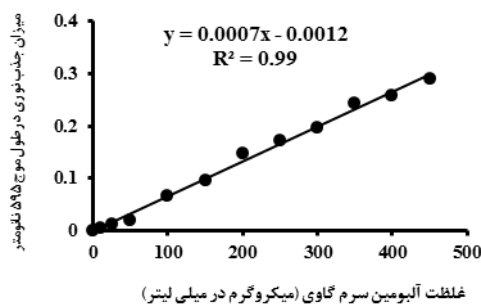
به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و با یک میلی لیتر NaOH ۰/۵ مولار و ۰/۳ میلی لیتر معرف Folin-Ciocalteu مخلوط و در نهایت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۲ میزان جذب نوری در طول موج ۷۲۰ نانومتر قرائت و با منحنی استاندارد تیروزین (شکل ۲) مقایسه شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پپسین به صورت میکرومول تیروزین/ساعت/ میلی گرم پروتئین بیان شد.



شکل ۲: منحنی استاندارد تیروزین. محور X: غلظت تیروزین (μmole.ml⁻¹), محور Y: جذب نوری
Figure 2: Tyrosin standard curve. X: Tyrosin (μmole.ml⁻¹) and Y: Optical Density.

فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از محلول ۱ میلی مولار benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) Erlanger *et al.*, (1961). در ابتدا میزان ۴۳/۵ میلی گرم BAPNA در یک میلی لیتر Dimethylsulphoxide (DMSO) حل شد و با محلول بافر Tris-HCl ۰/۵ مولار (pH=۷/۵) حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. در ادامه، ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱/۲۵ میلی لیتر محلول سوبسترا به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شده و سپس واکنش با اضافه نمودن ۱ میلی لیتر اسید استیک ۳۰٪ متوقف و میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت آنزیمی به کمک رابطه ذیل محاسبه شد.

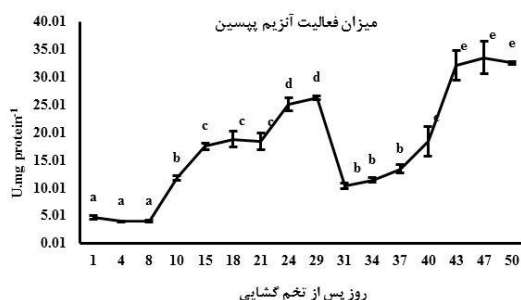
گردیدند (Rungrangsak – Torrrissen, 2007) و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (مدل Z36HK) در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول رویی، جهت سنجش پروتئین محلول و فعالیت آنزیمی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (Lemieux *et al.*, 1999). پروتئین محلول در عصاره آنزیمی به روش Bradford (1976) سنجیده شد. به طور خلاصه، از آلبومین سرم گاوی، Bovine serum Albumin (BSA) به عنوان استاندارد استفاده گردید. جهت سنجش پروتئین محلول ابتدا منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف BSA (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ μg/ml) تهیه شد (شکل ۱). میزان جذب نوری استاندارد و همچنین نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.



شکل ۱: منحنی استاندارد BSA. محور X: غلظت پروتئین BSA (μg ml⁻¹), محور Y: جذب نوری
Figure 1: BSA standard curve. X: BSA protein (μg ml⁻¹) and Y: Optical Density.

فعالیت آنزیم پپسین با استفاده از روش Rungrangsak and Utne (1981) سنجش شد. به طور خلاصه، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲۰۰ میکرولیتر کازئین ۱ درصد (در HCl ۶۰ میلی مولار) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. واکنش با اضافه کردن یک میلی لیتر Trichloroacetic acid (TCA) پنج درصد متوقف شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در ادامه محلول حاصل

$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم (U. mg protein}^{-1}\text{)} = \frac{\text{میلی لیتر مخلوط واکنش} \times 1000 \times \text{میزان جذب نوری در طول موج 410 nm}}{\text{میلی گرم پروتئین در مخلوط واکنش} \times 8800}$$



شکل ۳: روند تغییرات فعالیت آنزیم پپسین ماهی ازون برون در روزهای مختلف نمونه برداری تا ۵۰ روز پس از تخم گشایی. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

Figure 3: The changes in pepsin enzyme activity in *A. stellatus* during different days of experiment until 50 days post hatch. Values with different superscript letter indicate significant difference ($p > 0.05$).

در ۱ روز پس از تخم گشایی میزان فعالیت آنزیم تریپسین $0.4 \text{ U. mg protein}^{-1}$ بود و میزان فعالیت آن تا ۸ روز پس از تخم گشایی روندی افزایشی داشت و به حداکثر میزان فعالیت خود رسید. پس از آن از ۱۰ روز پس از تخم گشایی تا ۵۰ روزگی فعالیت کاهشی داشت. البته در ۳۱ روز پس از تخم گشایی و ۴۷ روز پس از تخم گشایی میزان فعالیت آن تا حدی افزایش نشان داد، ولی مجددا کاهش یافت. در کل روند فعالیت تریپسین یک فرایند کاهشی بود ($p < 0.05$, شکل ۴).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در همان ابتدا یعنی روز نخست پس از تخم گشایی، $1 \text{ U. mg protein}^{-1}$ بود. بعد از آن از یک روند کاهشی همراه با نوسان برخوردار بود، به این معنا که در ۱۵ روز پس از تخم گشایی و همچنین ۳۱ روز پس از تخم گشایی میزان فعالیت آن کمی افزایش یافت و مجدد به روند کاهشی خود تا ۵۰ روز پس از تخم گشایی ادامه داد ($p < 0.05$, شکل ۵).

در بررسی همبستگی میزان فعالیت مختلف گوارشی طی مدت زمان نمونه برداری مشخص گردید که فعالیت آنزیم

میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین با استفاده از محلول 0.1 M میلی مولار $\text{Succinyl-(Ala)}_2\text{-Pro-Phe-p-Tris-}$ Nitroanilide (SAPNA) در محلول بافر 0.1 M HCl (عنوان سوستر) سنجش شد (Erlanger *et al.*, 1961). مخلوط واکنش آنزیمی شامل 0.59 M میلی لیتر محلول سوستر و 10 M میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که در دمای 37°C درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه انکوباسیون شد و بلافاصله میزان جذب نوری در طول موج 410 nm نانومتر قرائت و میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین با استفاده از رابطه مذکور جهت محاسبه میزان آنزیم تریپسین، محاسبه شد.

داده‌های حاصل از سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو ماهیان با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفت. البته پیش از انجام آنالیزها، نرمال بودن داده ها و یکنواختی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولموگروف-اسمیروف و لون بررسی شد. همچنین از آزمون میانگین توکی برای بررسی تفاوت‌های معنی‌دار میان روزهای نمونه برداری استفاده شد. تمام آنالیزها در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت پذیرفت و سطح خطای نوع اول در آزمون ها 0.05 انتخاب شد. نتایج حاصل به صورت $\text{Mean} \pm \text{SE}$ ارائه شدند. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۰)، استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی در روزهای مختلف نمونه برداری تفاوت معنی داری با یکدیگر داشتند. آنزیم پپسین تا ۸ روز پس از تخم گشایی (dph) تغییر فعالیتی نداشت. بعد از آن فعالیت این آنزیم تا ۲۹ روز پس از تخم گشایی از روند افزایشی برخوردار بود و در ۳۱ روز پس از تخم گشایی کاهش و مجدد افزایش داشت. بیشترین فعالیت این آنزیم در روزهای ۴۳ - ۴۷ و ۵۰ روز پس از تخم گشایی بود ($p < 0.05$, شکل ۳).

جدول ۱: همبستگی پیرسون فعالیت آنزیم‌های مختلف گوارشی ماهی ازون برون از زمان تخم‌گذاری تا ۵۰ روز پس از گشایی

Table 1: Pearson correlation of different digestive enzymes activity in *A. stellatus* from hatching day to 50 days post hatch

تریپسین		کیموتریپسین	
ضریب پیرسون	۰/۵۴۶**	ضریب پیرسون	۰/۲۷۴*
تریپسین	p-value (دو دامنه)	کیموتریپسین	p-value (دو دامنه)
تعداد	۶۴	تعداد	۶۴
تریپسین		کیموتریپسین	
ضریب پیرسون	۰/۴۹۸**	ضریب پیرسون	۰/۴۹۸**
تریپسین	p-value (دو دامنه)	کیموتریپسین	p-value (دو دامنه)
تعداد	۶۴	تعداد	۶۴

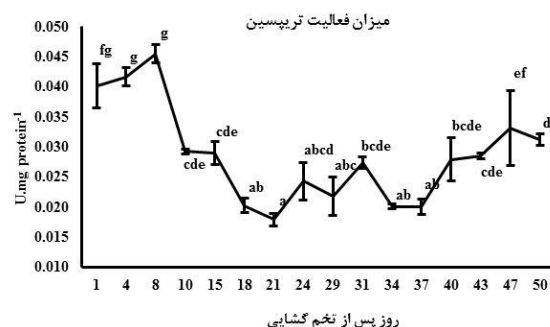
** معنی داری در سطح یک درصد، * معنی داری در سطح پنج درصد
** Significancy at 0.01 and * Significancy at 0.05

بحث

فعالیت آنزیم‌های گوارشی بخش مهمی در تحرک و شروع فرآیندهای مرتبط با رشد موجودات زنده محسوب می‌شوند (زمانی و همکاران، ۱۳۸۶؛ ایمانی و همکاران، ۱۳۸۸). بر کسی پوشیده نیست که توانایی رشد و تکامل لارو نه تنها بر کمیت و کیفیت غذای مورد استفاده وابسته است، بلکه تابع وضعیت عملکردی دستگاه گوارش آن نیز می‌باشد. چه بسا که بلوغ دستگاه گوارش از نظر عملکردی سرانجام در ظرفیت گوارشی حیوان اثر می‌گذارد (Wold *et al.*, 2007). بررسی تغییرات آنتوزنیک فعالیت آنزیم‌های گوارشی برای درک بهتر توانایی‌های تغذیه‌ای لاروهای جوان (Diaz *et al.*, 1997) و بهینه سازی پروتکل‌های تغذیه‌ای و پرورشی (Lazo *et al.*, 2011; Cahu and Zambonino-Infante, 1997) و همگام سازی وضعیت فیزیولوژی لارو از نظر ظرفیت گوارش با پروتکل تغذیه و فرآیند شروع تغذیه خارجی اهمیت بسزایی دارد (Noori *et al.*, 2012; Asgari *et al.*, 2013).

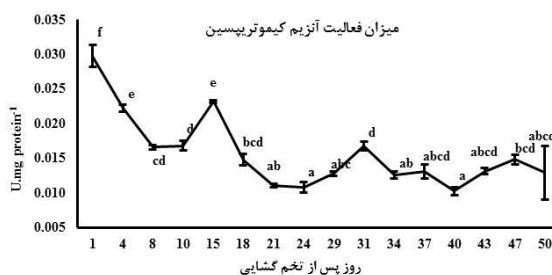
در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تریپسین و کیموتریپسین در زمان تخم‌گذاری بچه ماهی ازون برون (*A. stellatus*) قابل مشاهده بود، این یافته می‌تواند به

تریپسین با فعالیت آنزیم کیموتریپسین دارای همبستگی مثبت معنی دار (p=۰/۰۰، ۰/۵۴۶) و فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین با فعالیت آنزیم پپسین دارای همبستگی معنی دار منفی (بترتیب ۰/۲۷۴، ۰/۴۹۸) بود (جدول ۱).



شکل ۴: روند تغییرات فعالیت آنزیم تریپسین ماهی ازون برون در روزهای مختلف نمونه برداری تا ۵۰ روز پس از تخم‌گذاری. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

Figure 4: The changes in trypsin enzyme activity in *A. stellatus* during different days of experiment until 50 days post hatch. Values with different superscript letter indicate significant difference (p > 0.05).



شکل ۵: روند تغییرات فعالیت آنزیم کیموتریپسین ماهی ازون برون در روزهای مختلف نمونه برداری تا ۵۰ روز پس از تخم‌گذاری. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

Figure 5: The changes in chymotrypsin enzyme activity in *A. stellatus* during different days of experiment until 50 days post hatch. Values with different superscript letter indicate significant difference (p > 0.05).

غذادهی افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی مشاهده شد (Sarasquete et al., 1993).

قبل از جذب زرده، آنزیم تریپسین از بیشترین میزان فعالیت برخوردار است (Galaviz et al., 2011). در این مطالعه نیز از اولین روز تفریخ تا ۸ روزگی فعالیت تریپسین مشاهده شد که در ۸ روزگی بیشترین فعالیت را داشت و بعد از آن در ۱۰ روزگی همزمان با اتمام کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی از یک روند کاهشی برخوردار بود. چنین روند فعالیتی در *Huso huso* (Asgari et al., 2013) و *Acipenser persicus* (Babaei et al., 2011) نیز گزارش داده شد ولی در لارو کفشک ماهی سنگالی (*Soleo senegalensis*) (Ribeiro et al., 1999)، شاه ماهی دم زرد (*Seriola lalandi*) (Chen et al., 2006) و *Atractoscion nobilis* (Galaviz et al., 2011) و *Pagrus pagrus* (Suzer et al., 2007) نتایج متفاوتی از فعالیت آنزیم تریپسین گزارش داده شد، به شکلی که از یک روند افزایشی با شیب نسبتاً تند برخوردار بود. دستگاه گوارش گونه‌های مختلف ماهیان از نظر ریخت شناسی و عملکردی از تنوع زیادی برخوردار است. این امر به دلیل تنوع رده‌بندی آنها، عادات غذایی مختلف و همچنین اندازه و شکل بدنی خاص هر یک از گونه‌ها می‌باشد (Abdulhadi, 2005). به علاوه تنوع سلول‌های ترشحی در لوله گوارشی ممکن است مربوط به تغییرات شرایط محیطی و تغذیه‌ای باشد که به نوبه خود سبب تغییرات عملکردی دستگاه گوارش می‌گردد (Domeneghini et al., 1999). فعالیت کیموتریپسین نیز یک روند کاهشی را نشان داد و در ابتدای تفریخ در بالاترین میزان فعالیت خود بود. روند مشابهی در لارو *A. persicus* (Babaei et al., 2011) گزارش شده است. روند فعالیت این آنزیم با نتایج گزارش شده برای فیل ماهی متفاوت بود (Asgari et al., 2013). همچنین در ابتدای تفریخ در ماهی *Atractoscion nobilis* فعالیت ضعیف کیموتریپسین مشاهده شد، اما بیشینه فعالیت آن در ۱۸ روزگی گزارش شد (Galaviz et al., 2011).

آنزیم پپسین یک آنزیم معدی است که توسط این اندام ترشح می‌شود و بررسی‌ها در ماهیان مختلف از

این مفهوم باشد که در حقیقت کنترل فرآیند تولید آنزیم‌ها توسط مکانیسم‌های ژنتیکی صورت می‌گیرد (Buddington and Diamond, 1989) و متاثر از عوامل تغذیه‌ای بیرونی نیست (Cahu and Infante, 1994; Lazo et al., 2000). طی مراحل لاروی، هضم پروتئین عمدتاً به وسیله پروتئازهای قلیایی مانند تریپسین و کیموتریپسین به همراه پروتئازهای سیتوزولی روده انجام می‌شود (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). این دو پروتئاز قلیایی (تریپسین و کیموتریپسین) در ماهیان خاویاری (Asgari et al., 2013) و ماهیان استخوانی دریایی و آب شیرین در زمان تخم‌گذاری شناسایی شدند (Darias et al., 2007; Pradhan et al., 2011; Uscanga-Martínez et al., 2013). در ماهی *Coregonus polan* در زمان شروع تغذیه فعال میزان فعالیت آنزیم پپسین بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (Dabrowski, 1982). در تاسماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) نیز از ۱۸-۱۴ روز بعد از تخم‌گذاری و همزمان با تغییر در شیوه تغذیه آبی فعالیت آنزیم‌های پپسین، آلفا آمیلاز و لیپاز افزایش یافت (Buddington, 1985). در ماهی *Diplodus sargus* نیز با شروع غذادهی در ۵ روزگی فعالیت آنزیم‌های پپسین، پروتئاز قلیایی، آلفا آمیلاز، لیپاز و فسفاتاز قلیایی دچار تغییر قابل ملاحظه‌ای شدند (Cara et al., 2003). در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) نیز در زمان شروع تغذیه خارجی فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین افزایش یافت (Lauff and Hufer, 1984). در ماهی *Scophthamus maximus* نیز با شروع غذادهی در ۳ روزگی فعالیت آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و فسفاتاز قلیایی افزایش نشان داد (Cousin et al., 1987). در تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii*) با شروع مصرف غذای خارجی فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین و لیپاز افزایش یافت (Gisbert et al., 1999). در ماهی *Solea solea* در زمان شروع تغذیه خارجی فعالیت آنزیم آمیلاز افزایش داشت (Cousin et al., 1987). در ماهی *Sparus aurata* نیز در زمان

مرحله تفریح تا زمان رهاسازی به دریا. مجله علوم و فنون دریایی، ۱۱ (۲): ۳۶-۴۵.

خیاط زاده، ج.، خوش نگاه، ث.، فاطمی، ف.، سعادت فر، ز و شاهسونی، د.، ۱۳۸۸. بررسی هیستولوژیک و هیستوشیمیایی لوله گوارش (روده و معده) ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) در بازه زمانی ۲ هفته پس از تخم‌گذاری (Hatching). مجله زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، دوره ۴، شماره ۱: ۳۱-۲۱.

زمانی، ع.، حاجی مرادلو، ع.، مدنی، ر.، فرهنگی، م.، ویلکی، ا.س.، ۱۳۸۶. اندازه‌گیری و مقایسه سطح فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی در لارو ماهی آزاد دریای خزر و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله شروع تغذیه خارجی. مجله علمی شیلات ایران، ۱۶ (۳): ۷۳-۸۰.

شریعتی، ا.، ۱۳۷۸. ماهیان دریای خزر و حوضه آبریز آن (ترجمه) کازانچف، صفحه ۳۳۰.

نصری چاری، ع.، ۱۳۷۲. بررسی مقایسه‌ای پارامترهای مرفوبیولوژیک پالباش و قره‌برون سواحا جنوبی دریای خزر در جهت نظریه استقلال قره‌برون به عنوان گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۱۳۱ صفحه.

Abdulhadi, H.A., 2005. Some Comparative Histological Studies on Alimentary Tract of Tilapia Fish (*Tilapia Spilurus*) And Sea Bream (*Mylio cuvieri*). Egyptian Journal of Aquatic Research, 31: 387-397.

Asgari, R., Rafiee, G., Eagderi, S., Noori, F., Agh, N., Poorbagher, H. and Gisbert, E., 2013. Ontogeny of the digestive enzyme activities in hatchery produced Beluga (*Huso huso*). Aquaculture, 416:33-40. DOI: 10.1111/anu.12113.

Babaei, S.S., Kenari, A.A., Nazari, R. and Gisbert, E., 2011. Developmental Changes of Digestive Enzymes in Persian Sturgeon

جمله *Diplodus sargus* نشان داد که با رشد لارو و تکامل بیشتر دستگاه گوارش، میزان فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (Cara et al., 2003). این شکل از بروز فعالیت آنزیم پپسین در دیگر ماهیان خاویاری از جمله لارو *A. fulvescens*, *A. transmontanus*, *H. huso* و *A. gueldenstaedti* نیز مشاهده شده است (Kopylenko et al., 1984; Asgari et al., 2013). مطالعه حاضر نیز افزایش فعالیت آنزیم پپسین در ماهی ازون برون ۱۰ روز پس از تفریح و همزمان با اتمام کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی قابل مشاهده بود و روند افزایشی را در پیش گرفت. افزایش فعالیت پپسین با کاهش ناگهانی فعالیت تریپسین و کیموتریپسین بعد از اتمام کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی همبستگی منفی داشت. چنین روندی در *A. persicus* با یک حرکت آهسته پیش رونده انتقال فعالیت نسبی از پروتئازهای قلیایی (تریپسین و کیموتریپسین) به اسیدی (پپسین) در طول رشد و توسعه لارو همزمان با شروع تغذیه خارجی در ۹ روزگی مشاهده شد (Babaei et al., 2011)، که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که توسعه معده در ماهیان خاویاری و همچنین سایر گونه‌های ماهی دارای معده فعال به مفهوم شروع هضم اسیدی، تقویت گوارش خارج سلولی و کارآمدتر شدن استفاده از منابع پروتئین موجود در رژیم/جیره‌های غذایی می‌باشد.

منابع

ایمانی، ا.، یزدان پرست، ر.، فرهنگی، م.، بختیاری، م.، مجازی امیری، ب و سلجوقی، ظ.ش.، ۱۳۸۸. بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در طی دوره محرومیت غذایی و غذادهی مجدد. مجله علوم و فنون دریایی، ۸ (۳ و ۴): ۲۸.

جرجانی، س.، حاجی مرادلو، ع.، قلیچی، ا.، مخدومی، ن.م.، کاظمی، ر.، ۱۳۹۱. ساختار میکروسکوپی روده فیل ماهی (*Huso huso*). از

- (*Acipenser Persicus*) During Larval Ontogeny. *Aquaculture*, 318(1):138-144. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.04.032.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Buddington, R.K., 1985.** Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. *Journal of Fish Biology*, 26(6):715-723. DOI:10.1111/j.1095-8649.1985.tb04311.x
- Buddington, R.K. and Diamond, J.M., 1989.** Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. *Annual Review of Physiology*, 51(1):601-617. DOI:10.1146/annurev.ph.51.030189.003125
- Buddington, R.K., 1991.** Ontogenic development of sturgeons: selected physiological examples, In: Williot, P. (Ed.), *Proc. of the First Int. Symp. on the Sturgeon*. CEMAGREF, Bordeaux, pp. 53-63.
- Cahu, C.L. and Infante, J.Z., 1994.** Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(2):213-222. DOI: 10.4194/1303-2712-v11_3_22.
- Cahu, C.L. and Zambonino Infante, J.L., 1997.** Is the digestive capacity of fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International*. 5:151-160. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00699-8.
- Cahu, C., Infante, J.Z., Escaffre, A.M., Bergot, P. and Kaushik, S., 1998.** Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from Feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 169(1): 1-7. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)003160
- Cara, J.B., Moyano, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C. and Yúfera, M., 2003.** Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology*, 63(1):48-58. DOI:10.1046/j.1095-8649.2003.00120.x
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. and Clarke, S.M., 2006.** Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 260(1): 264-271. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.06.021
- Chong, A. S. C., Hashim, R., Lee, C. Y. and Ali, B. A., 2002.** Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203:321-333. DOI:10.3390/fishes2010004.
- Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F. and Gabaudan, J., 1987.** Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology*, 30(1):15-33. DOI:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05728.x.

- Dabrowski, K., 1983.** Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 7(1): 73-76. DOI:10.1007/BF00011827.
- Darias, M.J., Murray, H.M., Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M. and Martínez-Rodríguez, G., 2007.** Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. *Aquaculture*, 270(1):369-378. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.04.045.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S. and Schmalhausen, O.I., 2012.** Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Springer Science and Business Media.
- Diaz, M., Moyano, F.J., García-Carreno L.F., Alarcon, F.J. and Sarasquete, M.C., 1997.** Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5, 461-471. DOI:10.1023/A:1018340929705.
- Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G. and Mascarello, F., 1999.** Morphological and histochemical peculiarities of the gut in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *European Journal of Histochemistry*, 43(2):135-145. DOI:10.1046/j.1439-0426.2002.00384.x.
- Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95:271-278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- Furne´ M., Hidalgo M.C., Lopez A., Garcia-Gallego M., Morales A.E. and Kolkovski, S. 2001.** Digestive Enzymes in Fish Larvae and Juveniles, Implications and Applications to Formulated Diets. *Aquaculture*. 200:181-201. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00700-1.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A. and López, L.M., 2011.** Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*, 318(1):162-168. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.05.014
- Gawlicka, A., Teh, S.J., Hung, S.S.O., Hinton, D.E. and De La Noüe, J., 1995.** Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(5): 357-371.
- Gisbert, E., Rodriguez, A., Castelló-Orvay, F. and Williot, P., 1998.** A Histological Study of the Development of the Digestive Tract of Siberian Sturgeon (*Acipenser Baeri*) During Early Ontogeny. *Aquaculture*, 167(3-4):195-209. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00312-3
- Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P. and Castelló-Orvay, F., 1999.** Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 55(3):596-616. DOI:10.1111/j.1095-8649.1999.tb00702.x

- Gisbert, E., R.H. Piedrahita and Conklin, D.E. 2004.** Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232:455-470. DOI:10.1016/S0044-8486(03)00457-5.
- Hjelmeland, K. and Jorgensen, T. 1985.** Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify of maturing Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 31:726-747.
- Holt, G.J., 2011.** Larval Fish Nutrition. John Wiley and Sons. DOI:10.1002/9780470959862.
- Kopylenko, L.R., Mitskevich, L.G., Vaitman, G.A. and Mosolov, V.V., 1984.** Proteinases in the spawn of sturgeon. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya*, 20:373-377.
- Lauff, M. and Hofer, R., 1984.** Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37(4):335-346. DOI:10.1016/0044-8486(84)90298-9
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, c., Arnold, C.R., 2000.** Co-feeding microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Scianops ocellatus*). *Aquaculture* 188:339-351. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00339-2.
- Lazo, J.P., Darias, M.J. and Gisbert, E., 2011.** Ontogeny of the digestive tract. *Larval Fish Nutrition*, pp.3-46. DOI:10.1002/9780470959862.ch1.
- Lemieux, H., Blier, P. and Dutil, J.D., 1999.** Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology and Biochemistry*, 20:293-303. DOI: 10.1023/A:1007791019523.
- Noori, F., Van sttapien, G. and Sorgeloos, P., 2012.** Preliminary study on the activity of protease enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) larvae in response to different diets: effects on growth and survival. *Aquaculture Research* 43(2):198-207. DOI:10.1111/j.1365-2109.2011.02816.x
- Pradhan, P.K., Jena, J., Mitra, G., Sood, N. and Gisbert, E., 2013.** Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. *Aquaculture*, 372:62-69. DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.10.024.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. and Dinis, M.T., 1999.** Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179(1):465-473. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00180-5.
- Rungruangsak, K. and Utne, F., 1981.** Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* 22:67-79 DOI:10.1016/0044-8486(81)90134-4.
- Rungruangsak- Torrisen, K., 2007.** Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon

- (*Salmo salar* L.) fed with krill meal as an alternative protein source. *Journal of Food Biochemistry*, 31:509-540. DOI:10.1111/j.1745-4514.2007.00127.x
- Sarasquete, M.C., Polo, A. and De Canales, M.G., 1993.** A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *The Histochemical Journal*, 25(6):430-437.
- Sorgeloos, P. and Leger. P., 1992.** Improved larviculture outputs of marine fish; shrimp and prawn. *Journal of the World Aquaculture Society*. 23:251-264. DOI:10.1111/j.1749-7345.1992.tb00788.x
- Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, Ş., Firat, K. and Albaz, A. 2007.** Digestive enzyme activities in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148: 470-477. DOI:10.1016/j.cbpa.2007.06.418.
- Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Alvarez-González, C.A., Moyano, F.J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G.E., Márquez-Couturier, G., Contreras-Sánchez, W.M., Arias-Rodríguez, L. and Indy, J.R., 2011.** Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish physiology and biochemistry*, 37(3):667-680. DOI:10.1007/s10695-011-9467-2.
- Wold, P-A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L, Rainuzzo, J. and Kjórsvik, E., 2007.** Phospholipids vs. neutral lipids: Effects on digestive enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 272:502-513. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.06.034.
- Zambonino-Infante, J. and Cahu, C.L., 2001.** Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130(4):477-487. DOI:10.1016/S1532-0456(01)00274-5.

Ontogeny of proteolytic enzymes (pepsin, trypsin and chymotrypsin) of Stellate (*Acipenser stellatus*) from hatching up to day 50 post hatch

Ghasemi N.¹; Noori F.^{2*}; Imani A.¹; Shahrooz R.³

*f.noori@urmia.ac.ir

1- Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University

2-Dept. of Biology and Aquaculture, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University

3-Dept. of Comparative Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University

Abstract:

The present study focused on ontogeny of digestive enzymes activity namely Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin of *A. stellatus*. Stellate larvae, from the first day of hatch to day 50 of development, were randomly taken for enzyme assay. Specific enzyme activities of Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin were determined. The Peptic activity was detected in one-day-old larvae with a sharp raise of enzymatic activity from day 8 post hatch forth, especially during the larval transition to exogenous feedings ($p < 0.05$). The activity of Trypsin in the first day of post hatch was 0.04 U.mg protein⁻¹ and with an increasing trend, the enzyme exhibited its highest activity on day 8 post hatch ($p < 0.05$). Generally, Tryptic activity was decreasing during the larval ontogeny of *A. stellatus*. The highest activity of Chymotrypsin was also recorded on the day right after hatching ($p < 0.05$ 0.03 U.mg protein⁻¹). With some rises in the activity of the enzyme on days 15 and 31, however, in general the fish showed a decreasing trend in specific Chymotryptic activity up to day 50-post hatch. Pearson correlation revealed that specific activity of Pepsin of samples were negatively related to alkaline proteolytic enzymes activity (Trypsin and Chymotrypsin) meaning that concomitant with maturation of digestive tract of the Stellate, the gastric digestion of proteins became dominant ($p < 0.05$). In conclusion, development of stomach in those fish with functional stomach might be indicative of onset of acid Protease digestion, precedence of extracellular digestion to intracellular one and efficient use of dietary protein through post-larval life.

Keywords: Digestive tract, Stellate larvae, proteolytic enzymes, Sturgeons, *Acipenser stellatus*

*Corresponding author