تاثیر مقادیر متفاوت پروتئین آبکافت روی آنزیم‌های گوارشی آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhinchus mykiss*)

علی طاهری[1*]، عبدالمحمد عابدیان‌کناری[2]، رویین حلاج[3]، مهران حبیبی‌رضایی[4]، علی معتمدزادگان[5]، امین اوجی‌فرد[6]

چکیده

در این مطالعه به بررسی تاثیر پروتئین آبکافت روی آنزیم‌های پروتئولیتیک آلوین‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) پرداخته شد. ٦ جیره با سطوح متفاوت پروتئین (۱۰٪، ۲۵٪ و ۵۰٪ جایگزینی با پروتئین پودر ماهی جیره) آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) و ضایعات کشتارگاه مرغ مورد استفاده قرار گرفت. آلوین‌ها به تعداد ۱۲±۸۲٤ عدد پس از شروع به تغذیه فعال برای ۳۰ روز مورد تغذیه جیره‌های مذکور در تانک‌های ٤٠ لیتری قرار گرفتند. آنزیم‌های پپسین، تریپسین، آمینوپپتیداز ان، لوسین آلانین پپتیداز و آلکالین فسفاتاز مورد سنجش اسپکتروفتومتری قرار گرفت. بر اساس نتایج سنجش و آزمایشات انجام شده روی اندازه‌گیری مقادیر آنزیم‌های نوارمسواکی، بلوغ آنتروسیت‌های روده‌ای را در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۰٪ هر دو منبع پروتئین آبکافت (ضایعات کشتارگاهی طیور و پروتئین ماهی ساردین) و ۲۵٪ پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی سریع‌تر نشان دادند ($p<$ ۰/۰۵). نتایج نشان داد که پروتئین آبکافت برای تحریک بلوغ سریع‌تر انتروسیت‌های روده دارای یک حد بهینه است و استفاده بیش از حد از پروتئین آبکافت تاثیر منفی بر این فاکتور دارد. بر این اساس سطح بهینه جایگزینی با پودر ماهی جیره ۲۵٪ پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی و ۱۰٪ پروتئین آبکافت ضایعات کشتارگاه طیور خواهد بود.

واژگان کلیدی: *ساردین پهلو طلایی (Sardinella gibossa)، قزل‌آلای رنگین‌کمان، ضایعات کشتارگاهی طیور، پروتئین آبکافت، آنزیم*

تاریخ دریافت: ۹۰/٤/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۲۹

مقدمه

گونه‌های ماهیان پرورشی برخلاف دیگر موجودات اهلی پرورشی نیاز پروتئینی بالایی دارند و جیره‌های صنعتی فرموله شده برای تغذیه ماهی حاوی ۲۵ تا ۵۰٪ پروتئین خام هستند. بنابراین استفاده کارآمد از منابع پروتئینی برای ماهیان بسیار با اهمیت تر از موجودات خشکی‌زی است. یکی از اهداف نهایی تغذیه پروتئین در ماهیان، فرمولاسیون غذایی با کیفیت بالا و مقرون به صرفه است. رشد و بقای ماهی شدیداً تحت تاثیر پروتئین مورد تغذیه ماهی و در ارتباط تنگاتنگ با رشد روده، هضم و ظرفیت جذب می‌باشد (۱۸). یکی از راه‌های بهبود رشد ماهیان جایگزینی درصدی از پودر ماهی جیره با پودر پروتئین آبکافت شده ماهیان می‌باشد. پروتئین آبکافت پروتئینی است که تحت اثر عواملی چون گرما، اسید و قلیا و یا آنزیم‌ها قرار گرفته و به قطعات کوچک پپتیدی یا اسیدهای آمینه آزاد شکسته شده است. این پروتئین حلالیت، قدرت امولسیفایری، قدرت تشکیل کف، هضم‌پذیری و بالانس اسید آمینه بهتری نسبت به منبع اولیه تولید خود دارد. استفاده از پودر پروتئین آبکافت ماهی در جایگزینی بخشی از پودر ماهی تحقیقات نسبتاً گسترده‌ای را به خود اختصاص داده است. مشخص شده است که لوله گوارش و روند هضم تحت تاثیر تغییرات رشدی اساسی در طول هفته های اولیه زندگی ماهی است (۲۷). رشد و توسعه موفق سیستم هضم برای رشد و بقای لارو ماهی ضروری است زیرا یک سیستم هضمی کارآمد ماهی را برای صید، بلع، هضم و جذب بهتر غذا قادر می‌سازد (١٦). اگر چه لارو ماهی از نظر مورفولوژیکی قادر به جذب غذا در تغذیه اولیه می‌باشد اما سیستم هضمی قبل از اینکه کاملاً کار آمد شود نیاز به یک سری از تغییرات رشدی دارد(۹).

[1*]- استادیار گروه شیلات دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، چابهار، ایران
taheri@cmu.ac.ir
۲- دانشیار گروه شیلات دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، نور، مازندران، ایران
۳- استادیار دانشگاه صنعتی امیر کبیر، دانشکده مهندسی شیمی، تهران، ایران
٤- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه تهران، دانشکده علوم پایه، آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین، تهران، ایران
۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران
٦-استادیار دانشگاه خلیج فارس بوشهر، دانشکده منابع طبیعی، واحد برازجان، بوشهر، ایران

آنالیز فعالیت آنزیم‌های هضمی یک روش ساده و قابل اعتماد است که می‌تواند به عنوان اندیکاتور فعالیت هضمی و شرایط تغذیه ای لارو به کار رود (۲۰). در مطالعات مشخص شده است که سنجش آنزیم‌های تریپسین, آلکالین فسفاتاز، آمینو پپتیداز ـ ان و لوسین ـ آلانین پپتیداز نشان از رشد و توسعه سریع‌تر پانکراس و روده در ماهیان تغذیه شده با سطوح متوسط پروتئین آبکافت دارد به گونه ای که افزایش میزان آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز ـ ان نسبت به لوسین آلانین پپتیداز در این ماهیان سریع‌تر است (۱ و ۱۷). در خصوص تاثیر پروتئین های آبکافت بر روی آنزیم‌های پروتئاز هضمی ماهیان نیز گزارش‌هایی موجود است. در مطالعه ای روی لارو باس دریایی دیده شد که استفاده از ۱۹٪ پروتئین هیدرولیز شده آنزیم‌های تریپسین، آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز– ان توسعه سریع‌تر پانکراس و روده را در این گروه نسبت به گروه شاهد و تیمارهای حاوی مقادیر بالاتر پروتئین هیدرولیز شده نشان داد (۸). مطالعه تاثیر پروتئین هیدرولیز شده در تغذیه اختاپوس (*Octopus maya*) نیز نشان داد جیره حاوی ۱۵٪ پروتئین هیدرولیز شده فعالیت غدد مترشحه پروتئاز و تریپسین را بیشتر تحریک نموده است و این تیمار از رشد و محتوای انرژی بالایی برخوردار است. این محققین نتیجه گرفتند که این جیره هزینه انرژی را در ارتباط با هضم کاهش می‌دهد و بیوماس تولیدی آنها بیش از تیمارهای دیگر پروتئین هیدرولیز بوده است (۱۷). همچنین مشخص شده است که پروتئین آبکافت ماهی و میگو باعث تحریک و آزاد سازی کوله سیستوکینین (CCK) می‌گردد که آثار متفاوتی در دستگاه گوارش چون افزایش فعالیت تحرک روده و تحریک ترشح پانکراس دارد (۱۰). مطالعه تاثیر پروتئین آبکافت بر ماهی باس اروپایی نشان از توسعه سریع‌تر انتروسیت‌های روده با سنجش آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز ـ ان نسبت به آنزیم‌های سیتوسولیک در تیمار با بهترین رشد و مقاومت به باکتری داشت (۱۷). بر اساس مطالعات فوق در ماهیانی که سطح بهینه پروتئین آبکافت را دریافت نمودند اختلاف معنی داری در ترشح آنزیم‌های پروتئازی مثل تریپسین دیده می‌شود و سنجش آنزیم‌های نوار مسواکی مثل آلکالین فسفاتاز و آمینوپپتیداز ـ ان و آنزیم‌های سیتوسولیک مثل لوسین– آلانین پپتیداز نشان از توسعه سریع‌تر انتروسیت‌های روده و رشد و بلوغ روده در این تیمارها دارد.

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از گونه‌های مهم و اقتصادی کشور می‌باشد که در سال های اخیر مورد توجه پژوهشگران علوم شیلاتی بوده است. از آنجا که این ماهی می‌تواند بلافاصله پس از جذب کیسه زرده به تغذیه فعال از جیره مصنوعی بپردازد لذا مطالعه بر روی بهینه سازی جیره غذایی این ماهی به منظور بهبود رشد آلوین‌های این گونه ارزشمند ضروری به نظر می رسد. بر این اساس در تحقیق حاضر به مطالعه تاثیر پروتئین آبکافت ماهی روی آنزیم‌های گوارشی آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته شده است.

مواد و روش کار

ماهی، شرایط پرورش و نمونه برداری

۲۵۰۰۰ تخم چشم زده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مرکز تفریخ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در فیروزکوه خریداری شد و به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. تخم‌ها درون سبدهای پایه‌دار پلاستیکی در ۲۱ تانک فایبر گلاس که با پلاستیک مشکی پوشانده شده بود در یک لایه قرار گرفت. آب کلرزدایی شده شهری با دمای $^{\circ}$C ۱±۱۰ مورد استفاده قرار گرفت. آب دورن تانک‌ها به میزان ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه مورد هوادهی قرار گرفت و آلوین‌ها بعد از ۱۰ روز تفریخ شدند. آلوین‌ها به تعداد ۱۲±۸۲٤ عدد در هر تکرار تقسیم‌بندی شدند. آلوین‌ها هر

سه روز بعد از تفریخ تا پایان دوره نمونه‌گیری شد و طول و وزن آنها مورد سنجش قرار گرفت. آلوین‌های مرده هر روز جمع شد و میزان غذادهی بر اساس میانگین وزن و بقا هر سه روز محاسبه گردید. دما، اکسیژن محلول، آمونیای کل و pH هر ۲ روز یک بار اندازه‌گیری شد تا از میزان مجاز توصیه شده برای قزل‌آلای رنگین‌کمان تجاوز ننماید (۲٤). بر این اساس دمای ۲ /۲ ± ۱۳ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۳ ± ۹/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر،pH ۰/۲ ± ۸/۱ قلیائیت کل ۲٦۳ واحد کربنات کلسیم، سختی ۲۷٦ واحد و دوره نوری ۸:۱٦ روشنایی: تاریکی، استفاده شد و تغذیه به صورت دستی انجام گرفت تا رفتار تغذیه‌ای دیده شود.

ترکیبات و جیره‌های غذایی

٦ جیره غذایی حاوی سطوح پروتئینی یکسان (٤۹٪ پروتئین خام) با سطوح متفاوت پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاه مرغ مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). این سطوح عبارت بود از ۱۰٪، ۲۵٪ و ۵۰٪ جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین پهلو طلایی با پودر ماهی. یک جیره مشابه و بدون پروتئین آبکافت جهت مقایسه به کار رفت. غذا در آزمایشگاه تغذیه آبزیان تولید شد. بدین منظور مواد اولیه آسیاب و مخلوط شد و توسط یک چرخ گوشت نیمه صنعتی (هوتخش، ایران) به شکل پلت درآمد و در دمای$^{\circ}$C ٦۰ برای ٤ ساعت خشک و در $^{\circ}$C ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. این محصول مجدداً الک شد تا مناسب اندازه دهان آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان باشد. یک طرح آزمایشات کاملا تصادفی شامل ۷ جیره و سه تکرار از هر جیره مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آنزیم

بعد از نمونه‌برداری ماهی‌ها با تریکائین متان سولفونات (MS-222, Sigma) ۰/۱ ٪ بیهوش و در آب مقطر جهت جداکردن مواد خارجی شسته شدند. سپس درون قوطی‌های پلاستیکی با نیتروژن مایع منجمد و تا زمان آزمایش در ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری گردیدند. در زمان آزمایش با استفاده از ذره بین کل محتویات شکمی بر روی سطح یخ خارج شد و سپس با آب مقطر شستشو گردید. یک قسمت بافت امعا و احشا در ۹ قسمت بافر مخصوص (تریس- اسید ۱۰۰ میلی مولار، اتیلن دی آمین ترا آمینو استیک اسید ۰/۱ مولار،تریتون ۱۰۰-ایکس ۰/۱ ٪، PH ۷/۸) به مدت ۳۰ ثانیه بر روی سطح یخ هموژن شد و سپس در سانتریفوژ یخچالدار در g ×۲۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ ($^{\circ}$C ٤) و سوپرناتانت حاصله در ویال های اپندورف تقسیم گردید و در $^{\circ}$C ۸۰- تا زمان سنجش آنزیم‌های پپسین و تریپسین نگه داری شد. برای استخراج آنزیم‌های روده‌ای از بافرمورد استفاده توسط Storelli و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد (مانیتول ۵۰ میلی مولار،تریس ۲ میلی مولار به نسبت ۱:۲۰) (۲۳). بر اساس روش Cahu و همکاران (۱۹۹۹) نمونه ابتدا در این بافر به نسبت ۱:۳۰ (حجمی: وزنی) برای ۳۰ ثانیه هموژن شد و در ۲۲۰۰۰ دور برای ۵ دقیقه در دمای $^{\circ}$C ٤ سانتریفوژ شد. یک میلی لیتر از سوپرناتانت جهت سنجش آنزیم سیتوسولیک لوسین ـ آلانین پپتیداز برداشته و در $^{\circ}$C ۸۰- نگهداری شد. سپس کلرید کلسیم ۰/۱ مولار به هموژنات اضافه و ۱۰ دقیقه در g×۹۰۰۰ سانتریفوژ شد و سوپر ناتانت حاصله جهت سنجش آنزیم‌های نوارمسواکی در$^{\circ}$C ۲۰- نگه داری گردید (۸).

اندازه گیری آنزیم پپسین

بر اساس روش تغییر یافته Worthington (۱۹۹۳) ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی با ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترای هموگلوبینی (۲٪ وزنی:حجمی در اسید کلریدریک ۰/۰٦٪) مخلوط و درون حمام آبی$^{\circ}$C ۳۷ انکوبه شد. پس از ده دقیقه واکنش با افزودن محلول ۵٪ تری کلرو استیک اسید متوقف گردید. در لوله شاهد، محلول آنزیمی پس از افزودن تری کلرو استیک اسید اضافه شد. نمونه‌ها در g×٤۰۰۰ برای ٦ دقیقه سانتریفوژ و جذب در ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. یک

واحد فعالیت پپسین به عنوان یک میکرو مول تیروزین آزاد شده در دقیقه بر گرم پروتئین محلول طبق فرمول (۳-۱۲) گزارش شد (۲۵). فرمول (۳-۱۲)

$$\text{فعالیت نسبی آنزیم پپسین} = \frac{\text{۱۶۰۰۰X(میزان جذب شاهد - میزان جذب نمونه)}}{\text{۱۲۵۰۰X میلی گرم پروتئین درنمونه}}$$

اندازه‌گیری آنزیم تریپسین

از Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilide به عنوان سوبسترا استفاده شد. ۴۳/۵ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکساید حل گردید و با بافر کلرید کلسیم (تریس اسید ۰/۰۵ مولار، کلرید کلسیم دو آبه ۰/۰۲ مولار، pH ۷/۵) به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ۲۵ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده با ۱/۲۵ میلی لیتر محلول سوبسترای تازه تهیه شده مخلوط و ۱۰ دقیقه در $37^{\circ}C$ انکوبه شد. سپس توسط ۰/۵ میلی لیتر اسید استیک ۳۰ درصد واکنش متوقف گردید. جذب مخلوط حاصله در ۴۱۰ نانو متر بر اساس فعالیت تریپسین آمیداز طبق فرمول (۳-۱۳)گزارش شد(۱۳). فرمول (۳-۱۳)

$$\text{فعالیت نسبی آنزیم تریپسین} = \frac{\text{میزان جذب در ۴۱۰ نانومترX۱۰۰۰X حجم محلول مورد سنجش}}{\text{۸۸۰۰X میلی گرم پروتئین در محلول مورد سنجش}}$$

اندازه‌گیری آنزیم لوسین- آلانین پپتیداز

جهت سنجش، ۳/۱۲۵ میکرومول L-Leucyl-L-Alanine در ۰/۵ میلی لیتر بافر تریس- اسید ۵۰ میلی مولار حل گردید و ۱ میلی لیتر بافر LAOR (۲ میلی گرم ال- آمینو اسید اکسیداز، ۲ میلی گرم هورس رادیش پراکسیداز، ۱۰ میلی گرم اُ- دی آنیزیدین در بافر تریس- اسید، ۸ pH) به آن اضافه و در حمام آبی $37^{\circ}C$ قرار داده شد. ۲۵ میکرولیتر از محلول استخراج شده آنزیمی به آن اضافه شده و بعد از زمان ۲۰ دقیقه با افزودن ۰/۷۴ میلی لیتر اسید سولفوریک ۵۰٪ واکنش متوقف گردید. میزان جذب در ۵۳۰ نانومتر سنجیده شد و طبق منحنی استاندارد محاسبه گردید (۲۱).

اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز

از بافر کربنات سدیم (۰/۲ مولار در PH ۹/۸) حاوی کلرید منیزیم ۰/۱ مولار استفاده شد. ۵ قسمت از این محلول را با یک قسمت محلول معرف Para-nitrophenylphosphate ۰/۱ مولار مخلوط کرده و ۵ دقیقه در حمام آبی $37^{\circ}C$ قرار گرفت. ۰/۵ میلی لیتر از این مخلوط با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی مخلوط و ۱۵ دقیقه در $37^{\circ}C$ انکوبه شد. پس از این زمان ۵ میلی لیتر محلول ۱ گرم در لیترهیدروکسید سدیم اضافه گردید تا واکنش متوقف شود. در محلول شاهد نمونه آنزیمی پس از افزودن هیدروکسید سدیم اضافه گردید. میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد و طبق فرمول (۳-۱۴) بر اساس فعالیت نیترو فنول محاسبه گردید (۳). فرمول (۳-۱۴)

$$\text{فعالیت نسبی آنزیم آلکالین فسفاتاز} = \frac{\text{میزان رقتXحجم کووتXتغییر جذب در ۴۰۵ نانومتر}}{\text{۱۸/۸X۰/۰۲میلی گرم پروتئین در محلول مورد سنجش}}$$

اندازه گیری آنزیم آمینو پپتیداز- ان

از معرف L-Leucine P-Nitroanilide (محلول در ۰/۱ میلی مولار دی متیل سولفوکساید) به عنوان سوبسترا استفاده شد. ۲ میلی لیتر محلول ۱ میلی مولار این معرف با ۱ میلی لیتر بافر ۲۰۰ میلی مولار فسفات سدیم در pH ۷ و دمای $25^{\circ}C$ در آب دیونیزه مخلوط گردید و حجم آن با آب دیونیزه به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. ۹۰۰ میکرولیتر از این مخلوط در دمای $25^{\circ}C$ با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط و تغییر جذب برای ۵ دقیقه در ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان یک میکروگرم نیتروآنیلید آزاد شده در دقیقه در میلی لیتر هموژنات آنزیم‌های نوار مسواکی بر اساس منحنی استاندارد گزارش شد (۱۹).

اندازه گیری میزان پروتئین محلول

پروتئین محلول نمونه های آنزیمی با روش Bradford (۱۹۷۶) سنجیده شد (۵). بر این اساس ۱۰۰ میلی گرم کوماسی برلیانت بلو G-۲۵۰ در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ محلول شد و ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ اضافه شد و

به حجم یک لیتر رسانده شد و قبل از مصرف سه بار توسط کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ فیلتر شد. ۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول آنزیمی مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. جذب در ۵۹۵ نانومتر قرائت و بر اساس استاندارد سرم جنین گوساله میزان پروتئین محلول سنجش شد.

نتایج

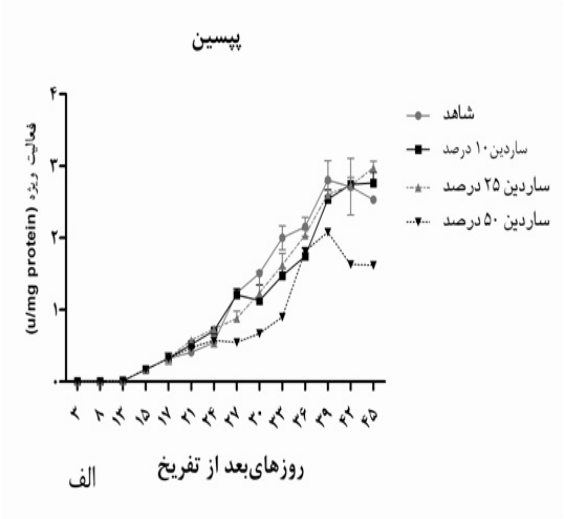
آنزیم‌های هضمی پروتئولیتیک

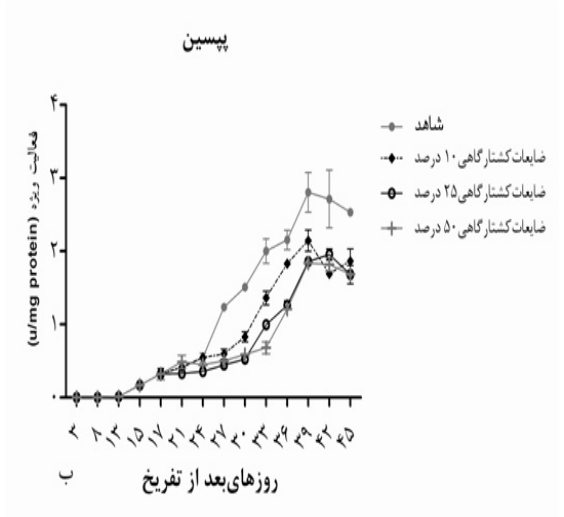
پپسین

فعالیت ویژه آنزیم پپسین آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در طول دوره پرورش در نمودار(۳-۵) آورده شده است. با توجه به نمودار الف مشاهده می‌گردد که با افزایش روزهای آزمایش میزان فعالیت ویژه این آنزیم نیز افزایش یافته است. تا روز ۳۹ بعد از تفریخ این فعالیت شدید است و پس از آن در تیمارهای شاهد و ساردین ۵۰٪ کاهش دیده می‌شود و تیمار ۲۵٪ همچنان افزایش دارد و تیمار ساردین ۱۰٪ به یک تعادل رسیده است. شاهد با تیمارهای مختلف از روز ۲۷ پس از تفریخ اختلاف معنی داری نشان می‌دهد ($p<۰/۰۰۱$) و این اختلاف در بین تیمارهای مختلف هم دیده می‌شود. در گروه ضایعات کشتارگاه طیور نیز نتایج کاملا مشابه ای از روز ۲۷ به بعد در مقایسه با شاهد مشاهده گردید ($p<۰/۰۰۱$). این اختلافات بین تیمارهای ضایعات کشتارگاهی طیور ۱۰٪ و ۲۵٪ و همچنین ۱۰٪ و ۵۰٪ از روز ۳۰ به بعد دیده شد ($p<۰/۰۰۱$) اما بین تیمارهای ۲۵ و ۵۰٪ فقط در روز ۳۳ این اختلاف معنی دار بود ($p<۰/۰۰۱$). در این گروه بیشترین فعالیت مربوط به تیمار شاهد بود و پس از آن تیمار ۱۰٪ بالاترین فعالیت ویژه را داشت.

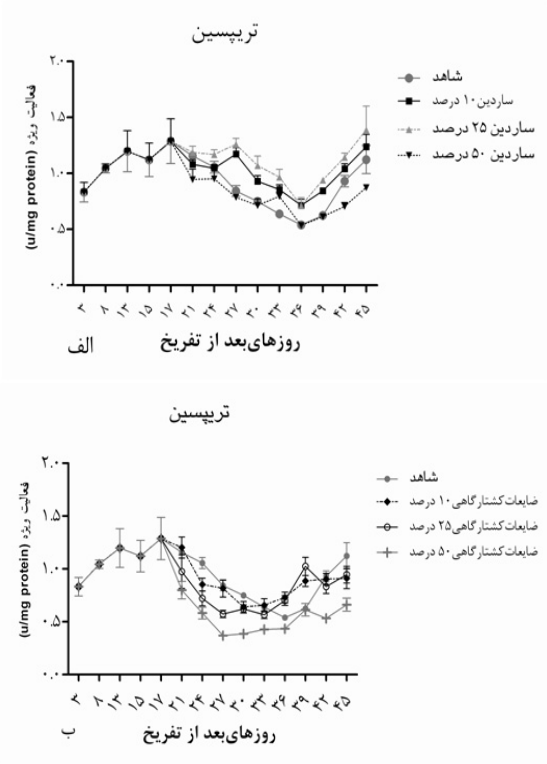
تریپسین

فعالیت ویژه تریپسین در نمودار (۳-۶) نشان داده شده است. مطالعه فعالیت ویژه تریپسین در گروه ساردین تایید می‌کند که تیمارهای ۱۰٪ و ۲۵٪ با شاهد از روز ۲۷ بعد از تغذیه اختلاف معنی داری داشتند ($p<۰/۰۰۱$) اما این اختلاف در تیمار ۵۰٪ فقط در روز پایانی دیده شد. جیره ساردین ۲۵٪ اختلاف معنی‌داری با جیره ساردین ۱۰٪ نشان نداد. تیمار ۵۰٪ با ۱۰٪ در روزهای ۲۷ و ۴۲ و ۴۵ اختلاف داشتند ($p<۰/۰۰۱$). تیمار ۲۵٪ و ۵۰٪ از روز ۲۱ با هم اختلاف داشتند ($p<۰/۰۰۱$). در این گروه تغذیه ای بیشترین فعالیت ویژه آنزیم تریپسین در تیمار ۲۵٪ دیده شد و کمترین در تیمار ساردین ۵۰٪ بود.





نمودار۳-۵- فعالیت ویژه آنزیم پپسین در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی (الف) و ضایعات کشتارگاهی طیور (ب)



نمودار۳-۶ فعالیت ویژه آنزیم تریپسین در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی (الف) و ضایعات کشتارگاهی طیور (ب)

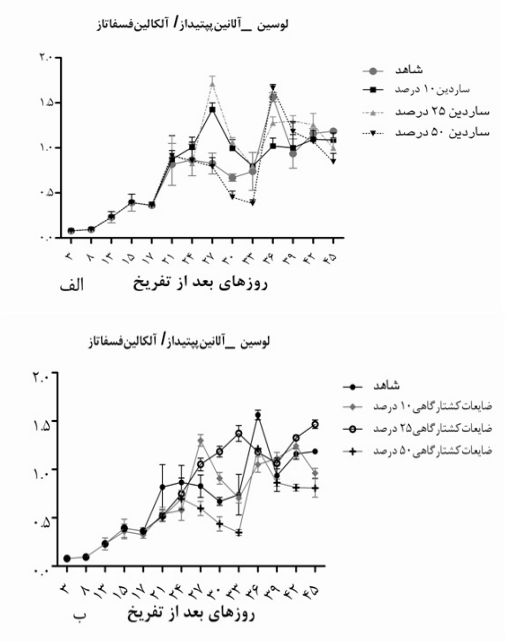
در مطالعه گروه ضایعات کشتارگاهی طیور نیز تیمار شاهد با تیمار ۱۰٪ در روز ۳۹، با تیمار ۲۵٪ در روزهای ۲٤، ۲۷ و ۳۹ (p<۰/۰۱)، با تیمار ۵۰٪ در روزهای ۲۱ تا ۳۰ و همچنین ٤۲ و ٤۵ اختلاف معنی دار داشت (p<۰/۰۰۱). تیمارهای ۱۰٪ و ۲۵٪ فاقد اختلاف معنی دار بودند. تیمار ۵۰٪ با ۱۰٪ از روز ۲۱ و با تیمار ۲۵٪ از روز ۳٦ به بعد اختلافات معنی دار نشان دادند (p<۰/۰۵). در این گروه تغذیه ای نیز گروه شاهد و ۱۰٪ بیشترین فعالیت را داشتند و کمترین در گروه ۵۰٪ دیده شد.

نسبت آلکالین فسفاتاز به لوسین – آلانین پپتیداز

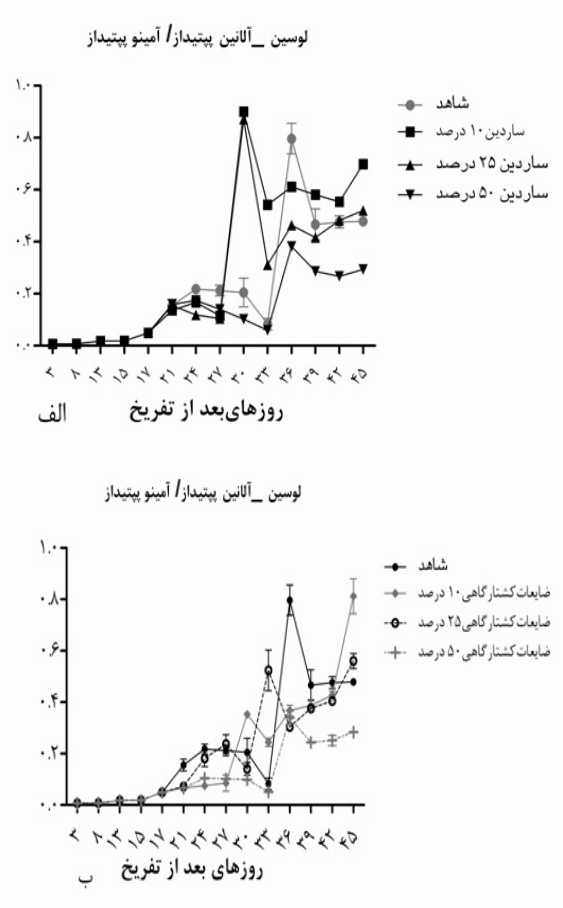
نسبت آلکالین فسفاتاز / لوسین آلانین پپتیداز در نمودار (۳-۷) آورده شده است. در گروه ساردین این نسبت در تیمارهای ۱۰٪ و ۲۵٪ در روز ۲۷ پس از تفریخ بیشترین بود که بین این ۲ گروه در این روز اختلاف معنی داری مشاهده شد (p<۰/۰۱). در تیمارهای شاهد و ساردین ۵۰٪ بیشترین نسبت این ۲ آنزیم به هم چند روز بعد و در روز ۳٦ بعد از تفریخ اتفاق افتاد که اختلاف معنی داری بین این ۲ گروه در این روز مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). در مطالعه گروه تغذیه شده با ضایعات کشتارگاه طیور نیز مشاهده شد که بیشترین نسبت در تیمار ۱۰٪ در روز ۲۷، در تیمار ۲۵٪ در روز ۳۳ و در تیمار های شاهد و ۵۰٪ در روز ۳٦ پس از تفریخ دیده شد. بین تیمار شاهد و ۵۰ درصد در روز ۳٦ اختلاف معنی دار بود (p< ۰/۰۰۱).

نسبت آنزیم آمینو پپتیداز- ان به لوسین- آلانین پپتیداز

تغیرات نسبت آمینو پپتیداز- ان به لوسین-آلانین پپتیداز در نمودار (۳-۸) آورده شده است. بیشترین نسبت تغییرات این دو آنزیم به هم در تیمار های ساردین ۱۰٪ و ۲۵٪ در روز ۳۰ بعد از تفریخ مشاهده شد (p>۰/۰۵). این نسبت در تیمارهای ساردین ۵۰٪ و شاهد در روز۳٦ دیده شد. در گروه تغذیه شده با پروتئین آبکافت ضایعات کشتارگاهی طیور بیشترین نسبت در تیمار ۱۰٪ در روز ۳۰، در تیمار ۲۵٪ در روز ۳۳ و در تیمارهای شاهد و ۵۰ ٪ در روز ۳٦ (p<۰/۰۰۱) اتفاق افتاد.



نمودار۳-۷ نسبت آنزیم آلکالین فسفاتاز به لوسین آلانین پپتیداز در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی (الف) و ضایعات کشتارگاهی طیور (ب)



نمودار۳-۸ نسبت آنزیم آمینو پپتیداز- ان به لوسین آلانین پپتیداز در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی (الف) و ضایعات کشتارگاهی طیور (ب)

بحث

بر اساس گزارش ها ترشح آنزیم می‌تواند با محرک های بینایی، شیمیایی و غدد درونریز تنظیم شود (٤). مطالعات اندکی در ارتباط با فعالیت آنزیمی آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دست است (٦). بر خلاف لارو ماهیان دیگر، قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان شروع تغذیه فعال دندانهای حلقی و فکی و غدد معده فعال دارد. زواید پیلوریک نیز شروع به تمایز نموده اند. قزل آلا آنزیم‌های هضمی نسبتاً توسعه یافته دارد که به دلیل دوره طولانی جذب زرده است و فعالیت آنزیم‌های هضمی بعد از جذب زرده به شکل معنی داری افزایش میابد (۱۲). سیستم هضمی در این دوره شبیه به بالغین است اما قزل‌آلای رنگین‌کمان توسعه آنزیم‌های هضمی خود را به شکل مورفولوژیک و عملکردی در طول ۲ ماه بعد از تفریخ کامل می‌کند (۱۵). بنابراین فعالیت آنزیم‌های نوار مسواکی در ارتباط با کاهش هضم درون سلولی می‌تواند بلوغ انتروسیت ها را مشابه دیگر ماهیان توضیح دهد (۱۱). جیره غذایی بر روی رشد و بلوغ سیستم گوارش تاثیر دارد. برای مثال وقتی قزل آلا با جیره مصنوعی تغذیه می‌شود تمایز معده و تشکیل موکوس روده ای کند می‌شود بدین معنی که تقسیمات سلولی و شکل گیری نهایی اندام های گوارشی زمان طولانی تری را طی می‌کند (۱۵).

در مطالعه حاضر اختلاف معنی دار فعالیت آنزیم پپسین در بین تیمارهای مختلف با شاهد که از روز ۲۷ شروع شده است شاید به این دلیل باشد که معده آلوین‌ها در این زمان فعالیت عملکردی کامل خود را بدست آورده باشد و بر اساس نیاز ترشحی این آنزیم بر اساس هر جیره فرموله شده این اختلاف آشکار می‌شود. بدین شکل که تیمار شاهد به دلیل دریافت بیشتر پودر ماهی در هر وعده غذایی فعالیت ترشحی آنزیم پپسین بیشتری را نشان داده و هر چه میزان پروتئین آبکافت در جیره افزایش پیدا کرده سطح فعالیت ویژه این آنزیم کم شده است.

در مورد فعالیت ویژه تریپسین می‌توان گفت از آنجا که سوخت و ساز و رشد آلوین‌ها در تیمارهای ساردین ۲۵٪ و ۱۰٪ از تیمارهای شاهد و ۵۰ درصد بیشتر بوده است در نتیجه مصرف غذا و نیاز به آنزیم‌های هضمی لیز کننده آنها بیشتر بوده است. تریپسین پروتئین را از سمت کربوکسیل اسیدهای آمینه اساسی، لیزین و آرژنین، می شکند که هضم بالاتری از دیگر اسیدهای آمینه نشان می‌دهند (١٤). در گروه ضایعات کشتارگاه طیور می‌توان گفت تیمارهای شاهد و ۱۰٪ سطوح مطلوبی از پروتئین دریافت نموده اند و اختلاف

معنی داری نشان ندادند و شاید با افزایش پروتئین آبکافت ضایعات کشتارگاه طیور مکان های اختصاصی برای عملکرد این آنزیم کاهش یافته است و در نتیجه سطح فعالیت آن کم شده است. عنوان شده است که پروتئازهای قلیایی مسئول هضم پروتئین است (۲۲). تریپسین آنزیم کلیدی در هضم پروتئین ها در آلوین‌های ماهی قزل آلا است و هضم پروتئین در مراحل جوانی این ماهی بیشتر وابسته به فعالیت آنزیم‌های شبه تریپسین نسبت به آنزیم‌های شبه پپسین است. آنزیم تریپسین در مراحل ابتدایی توسعه لاروی ماهیان دیگر نیز مشاهده شده است (۲ و ۱۱). نتایج مطالعات آنزیمی نشان می‌دهد که بهترین رشد و توسعه آلوین‌ها در جیره‌های حاوی ساردین ۱۰٪ و ۲۵٪ و همچنین پروتئین آبکافت ضایعات کشتارگاهی طیور ۱۰٪ اتفاق افتاده است. جیره‌های حاوی سطح ۵۰٪ پروتئین آبکافت منجر به کاهش رشد آلوین‌ها می‌شود. در این مطالعه تمام جیره‌ها اختلاف معنی داری را با جیره شاهد در روز ۲۷ نشان دادند ($p<0/05$). در این تحقیق تغذیه فعال آلوین‌ها در روز ۱۷ بعد از تفریخ آغاز شد و اولین نمونه برداری بعد از تغذیه فعال در روز ۲۱ بود. این مطلب نشان می‌دهد که جیره‌های مختلف حاوی پروتئین آبکافت روی ترشح تریپسین از ابتدای شروع تغذیه فعال تاثیر داشته است. بعلاوه بعد از کاهش فعالیت تریپسین در روزهای میانی که ممکن است به دلیل فعالیت سایر آنزیم‌های روده ای و یا افزایش ترشح پپسین از معده است مجدداً افزایشی در میزان فعالیت آنزیم تریپسین مشاهده شد که نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف در مقایسه با ساردین ۵۰٪ متابولیسم بالاتری داشته اند. تغییر فعالیت آنزیمی برای جیره‌های حاوی پروتئین آبکافت بیشتر پیشنهاد می‌کند که سنتز آنزیم توسط محتوای پروتئین یا مشتقات موجود در جیره تنظیم می‌شود. دلیل محتمل دیگر محدودیت ظرفیت جذب مواد مغذی غشای موکوسی روده است. بعلاوه سطح بالای پروتئین آبکافت تجمع مواد مغذی (اسیدهای آمینه و پپتیدها) در روده را باعث می‌شود که مکانیسم های انتقال در روده را اشباع می نماید. این مسئله یکی از نکات منفی سطح بالای پروتئین آبکافت در جیره است و نشان می‌دهد استفاده از پروتئین آبکافت در جیره غذایی آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای یک سطح بهینه است که اگر از رنج بهینه تجاوز نماید می‌تواند بی تاثیر باشد و یا تاثیر منفی داشته باشد.

نسبت آلکالین فسفاتاز به لوسین آلانین پپتیداز در روز ۲۷ نشان می‌دهد که بلوغ انتروسیتها در تیمارهای ساردین ۱۰٪ و ۲۵٪ زودتر اتفاق افتاده است. این نسبت در تیمارهای ساردین ۵۰٪ و شاهد در روز ۳۶ بیشترین است و می‌تواند توجیهی برای وزن کمتر این ماهیان باشد. افزایش آمینوپپتیداز- ان نیز نشان می‌دهد که انتروسیتها در لارو ماهی بالغ شده اند (۲۷). نسبت آنزیم‌های نوار مسواکی آمینوپپتیداز- ان به لوسین- آلانین پپتیداز که یک آنزیم سیتوسولیک است در روز ۳۰ بعد از تفریخ در تیمارهای ساردین ۱۰٪ و ۲۵٪ افزایش داشت اما این نسبت برای تیمارهای ساردین ۵۰٪ و شاهد در روز۳۶ مشاهده شد. این رویه نشان می‌دهد که جیره‌های ساردین ۱۰٪ و ۲۵٪ بلوغ انتروسیت سریع‌تری داشتند. مطالعه روی نسبت آنزیم‌های نوارمسواکی به آنزیم‌های سیتوسولیک در آلوین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بسیار اندک است اما در گزارشی پروبیوتیک مصرفی در جیره غذایی آلوین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بلوغ اولیه روده را از روز ۲۰ پس از شروع تغذیه فعال به روز ۱۰ جابجا نمود (۲۶). همچنین مطالعه روی تاثیر پروتئین آبکافت بر آنزیم‌های پروتئولیتیک دستگاه گوارش ماهی بسیار کم است. طبق بررسی Cahu و همکاران (۱۹۹۸) بیشترین وزن نهایی و ترشح آنزیم تریپسین در تیماری که جیره حاوی ۱۹٪ پروتئین آبکافت دریافت کرده بود دیده شد (۷). همچنین روده در این تیمار رشد سریع‌تری را بر اساس نسبت بالاتر آلکالین فسفاتاز به

لوسین آلانین پپتیداز و همینطور لوسین آمینو پپتیداز به لوسین آلانین پپتیداز نشان داد. در این رابطه Kotzamanis و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر پروتئین آبکافت را بر روی رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی لارو ماهی باس اروپایی بررسی نمودند و عنوان کردند که آنزیم‌های نوار مسواکی بلوغ زودتری از سیستم هضمی را در جیره با ۱۰٪ پروتئین آبکافت نشان داد و در این جیره سطح آنزیم سیتوسولیک کاهش سریع‌تری نشان داد (۱۷). نتایج این محققین در تایید نتایج حاصله از آزمایش حاضر است که نشان می‌دهد تیمارهای با رشد و بقای بهتر رشد روده سریع‌تری نشان می‌دهند.

در جمع‌بندی می‌توان گفت جایگزینی پروتئین آبکافت با پودر ماهی در جیره آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تا حد ۲۵٪ برای پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی و ۱۰٪ برای ضایعات کشتارگاهی طیور باعث بهبود کیفیت جیره می‌گردد و سبب متعادل شدن آن می‌شود که این بهبود تعادل در نهایت منجر به افزایش رشد و بقای آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و تحریک رشد سریع‌تر روده در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان خواهد شد.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل فراهم نمودن امکانات و هزینه های این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

1. Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, P.M.,Gaxiola, G., Sánchez, A., Maldonado, T., Rosas, C. (2007): The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on Octopus maya (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity blood metabolites and energy balance. Aquaculture. 273: 641–655.
2. Alvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S. (2008): Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass Paralabrax maculatofasciatus. 1. Biochemical analysis. Fish Physiology and Biochemistry. 34: 373–384
3. Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J. (1946): Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. The Journal of Biological Chemistry, 164: 321–329.
4. Best, E.M.H., Wells, M.J. (1984): The control of digestion in Octopus. II. The role of internal stimulus. Vie Milieu. 34: 1–7.
5. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol. 72, pp. 248–254.
6. Buddington, R.K., Krogdahl, A., Bakke-McKellep, A.M.,1997. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. Acta Physiologica Scandinavica. 161: 67-80.
7. Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Escaffre, A.M., Bergot, P., Kaushik, S. (1998): Preliminary results on sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae rearing with compound diet from first feeding. comparisson with carp (Cyprinus carpio) larvae, Aquaculture.169:1-7.
8. Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. (1999): Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass Dicentrarchus labrax larvae. Aquaculture. 171: 109–119.
9. Canino, M.F., Bailey, K.M. (995): Gut evacuation of walleye Pollock larvae in response to feeding conditions, Journal of Fish Biology. 46:389-403.
10. Cudennec B., Ravallec-Plé R., Courois E., Fouchereau-Peron M. (2008): Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells, Food Chemistry. P: 970-975.
11. Cuvier-Peres, A., Kestemont, P. (2002): Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae Perca Fluviatilis. Fish Physiology and Biochemistry. 24: 279–285.

12. Dement'eva, M.A. (1976): Anatomical-Histological Features of Digestive Tract in the Rainbow Trout at the Early Phases of Ontogenesis, Izv. GosNIORKh. 22: 876–884.
13. Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961): The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archive of Biochemistry and Biophysics. 95: 271–278.
14. Espe, M., Lied, E. (1994): Do Atlantic salmon (Salmo salar) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis?. Comparative Biochemistry and Physiology. 107:249–254.
15. Kawai, S.I., Ikeda, S. (1973): Study on digestive enzymes of fishes-III, Development of digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietry change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. Bulleton of The Japanese Society of Fisheries Science. 39: 819-823.
16. Kjorsvik, E., Pittman, K., Pavlov, D. (2004): From fertilisation to the end of metamorphosis-functional development. In: Moksness, E., Kjorsvik, E., Olsen, Y. (Eds.), Culture of Cold-Water Marine Fish. Blackwell Publishing, Carlton, Victoria. P:204–278.
17. Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C. (2007): Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 147: 205– 214.
18. Liu, Y., Feng, L., Jiang, J., Liu, Y., Zhou, X.Q. (2009): Effects of dietary protein levels on the growth performance، digestive capacity and amino acid metabolism of juvenile Jian carp (Cyprinus carpio var. Jian). Aquaculture Research. 40: 1073-1082.
19. Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J. (1973): The aminopeptidase from hog intestinal brush border. Biochimica and Biophysica Acta. 321: 282–295.
20. Néstor Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y. (2007): Changes on cortisol level and digestive enzyme activity in juveniles of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) exposed to different salinity regimes. Aquaculture. 266: 255–261.
21. Nicholson, J.A., Kim, Y.S. (1975): A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. Analytical Biochemistry. 63: 110–117.
22. Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Dinos, M.T. (2002): Digestive enzymes profile of Solea senegalensis post larvae fed Artemia and a compound diet. Fish Physiology and Biochemistry. 27:61–69.
23. Storelli, C., Villela, S., Romano, P.M., Maffia, M. Cassano, G. (1989): Brush-border amino acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. American Journal of Physiological (Regulatory Integrative. Comparative Physiology). 257: 506–510.
24. Tarazona, J.V., Muñoz, M.J. (1995): Water quality in Salmonid culture . Review in Fisheries Science. 2: 109 – 139.
25. 12. Worthington, V. (1993): Worthington Enzyme Manual. Enzymes and Related Biochemicals Worthington Chemical, New Jersey, US. P: 399
26. Waché Y., Auffray F., Gatesoupe F.J., Zambonino J., Gayet V., Labbé L., Quentel. C. (2006): Cross effects of the strain of dietary Saccharomyces cerevisiae and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, Onchorhynchus mykiss, fry. Aquaculture. 258: 470–478.
27. Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L. (2001): Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, C: Toxicol Pharmacology. 130: 477-487.