بررسی فعالیت آنزیم‌های هضمی، آمیلاز وآلکالین فسفاتاز، در لارو ماهی سفید تغذیه شده از ناپلی آرتمیا

فاطمه حسن تبار*[۱]، حسین اورجی[۱]، ابوالقاسم اسماعیلی[۱]، سیده صدیقه بابایی[۲]

۱ـ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم دامی و شیلات، ساری، ایران

۲ـ دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

مسئول مکاتبات: f.hassantabar@yahoo.com

چکیده

هدف از این آزمایش تعیین نرخ رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم‌های هضمی (آمیلاز وآلکالین فسفاتاز) لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلی آرتمیا می‌باشد. آزمایش در مخازن شیشه‌ای ۱۱۵ لیتری حاوی ۷۰۰۰قطعه لارو ماهی سفید با میانگین وزن اولیه ۵/۳ میلی گرم (۲روز بعد از هچ) انجام شد. جهت سنجش آنزیمی نمونه‌برداری از لاروها بصورت تصادفی در روزهای ۲، ۳، ۵، ٦ ،۸ ،۱۰ ،۱۵ ،۲۱ ،۲۵ و ۳۰ انجام گرفت. نتایج نشان دادند که ذخیره‌سازی لارو در تراکم بالا کارایی رشد را کاهش می‌دهد اما تأثیر قابل ملاحظه ایی بر روی نرخ بازماندگی لارو نداشت. در تحقیق حاضر از روز ۲۳-۳۰ افزایش واضحی در فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده شد بطوری که بیشترین فعالیت آمیلاز در روز ۳۰ بعد از هچ مشاهده شد. محتوای بالای گلیکوژن و کربوهیدرات در غذای زنده ممکن است سنتز و ترشح آمیلاز را تحریک کند. یک پیک فعالیت زود هنگام در فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روز ۸ بعد ار تفریخ مشاهده شد که نشان دهنده روند بلوغ روده در لارو ماهی سفید می‌باشد.

کلمات کلیدی: لارو ماهی سفید، آنزیم هضمی، آمیلاز، آلکالین فسفاتاز

مقدمه

ماهی سفید از نظر رژیم غذائی جزو ماهیان همه‌چیزخوار بوده ولی برخلاف سایر ماهیان همه چیزخوار به دلیل کوتاه بودن طول روده دارای طیف غذایی محدودی می‌باشد. این ماهی به عنوان غذای آغازین از انواع پلانکتون‌های گیاهی و جانوری و لارو حشرات استفاده نموده ولی پس از رسیدن به وزن بالاتر و در مراحل پس از مهاجرت به دریا عمدتاً از صدف‌های دو کفه‌ای تغذیه می‌نماید. دستگاه گوارش در ماهی سفید شامل دهان، حفره دهانی، حلق، دندان حلقی، مری، روده قدامی و خلفی و مخرج بوده و فاقد معده حقیقی می‌باشد [۱]. غذاهای زنده‌ای مانند روتیفر و آرتمیا در آبزی پروری بسیاری از گونه های آبزیان اهمیت ویژه‌ای را بخصوص در مراحل اولیه تغذیه‌ای دارا می‌باشند. در این میان، آرتمیا بخش بسیار مهمی از جیره غذایی بسیاری از گونه‌های ماهیان دریایی، سخت‌پوستان (انواع میگوها)، ماهیان خاویاری، برخی از گونه‌های آب شیرین، ماهیان آکواریومی و حتی نرمتنان را تشکیل می‌دهد (۲۰). آرتمیا فرانسیسکانا به دلیل اندازه کوچک در زمان تفریخ ناپلی، تغذیه غیرانتخابی و کیفیت بالای غدایی می‌تواند به عنوان غذای آغازین، توسط بسیاری از گونه‌های ماهیان به خصوص در مراحل اولیه زندگی مورد استفاده قرار گیرد [۲۵].

هضم، فرآیند کلیدی در متابولیسم جانور است که نشان می-دهد وجود مواد مغذی برای عملکردهای بیولوژیکی بدن مورد نیاز است [۱۲]. رشد و توسعه موفق سیستم گوارشی برای رشد و بقای لارو ماهی ضروری است زیرا یک سیستم گوارشی کارآمد، ماهی را قادر به صید، بلع، هضم و جذب

غذا می‌سازد. در این راستا یکی از جنبه های مهم مطالعات فیزیولوژی هضم، اطلاع از کارایی گوارش بر اساس نوع و عملکرد آنزیم‌های گوارشی (الگوهای انتوژنی آنزیم‌های گوارشی)، به منظور تعیین زمان آغاز تغذیه خارجی (weaning) و تعیین ظرفیت لارو در هضم و جذب انواع مختلف مواد مغذی شامل غذای زنده و یا ریزجیره‌ها می-باشد [۷ و ۱۲]. بطور کلی اطلاع از نحوه تکامل سیستم آنزیمی می‌تواند در تشخیص عوامل محدود کننده رشد در پرورش لارو، کاهش تلفات در زمان تغذیه فعال و طراحی جیره غذایی متناسب با سیستم آنزیمی مؤثر باشد و علاوه بر آن، به عنوان شاخصی قابل اطمینان از فعالیت‌های گوارشی و شرایط تغذیه‌ای لارو ماهیان می‌باشد [۵ و ۱۲]. بسیاری از محققین معتقدند که فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت تاثیر سن و یا مراحل تکاملی است. دانستن زمان ترشح آنزیم‌های اصلی در روده گونه‌های قابل پرورش، برای آگاهی از زمان شروع تغذیه با غذای خشک جهت رشد سریع و بهتر لارو ضروری می‌باشد [۲۲].

فسفاتاز قلیایی آنزیمی است که بطور معمول در بسیاری از مطالعات سیستم گوارشی در لارو ماهیان مورد مطالعه قرار می گیرد. فسفاتاز قلیایی تکامل غشای نوار مسواکی روده را نشان می دهد. این آنزیم‌ها در هیدرولیز و سنتز استرهای اسید فسفریک و انتقال گروه‌های فسفات از اسیدفسفریک به سایر ترکیبات در pH قلیایی نقش دارد و آن را تسریع می-نماید و نقش مهمی را در فرآیند معدنی‌سازی اسکلت حیوانات آبزی و رشد و نمو موجودات زنده ایفا می‌کنند. بطور کلی مطالعات کمی در ارتباط با عملکرد بیولوژیکی فسفاتاز قلیایی روده‌ای انجام شده است [۲٤ و ۱۷]. در تحقیق حاضر از روز ۲۳-۳۰ افزایش واضحی در فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده شد بطوریکه بیشترین فعالیت آمیلاز در روز ۳۰ بعد از هچ مشاهده شد. محتوای بالای گلیکوژن و کربوهیدرات در غذای زنده ممکن است سنتز و ترشح آمیلاز را تحریک کند.

مواد و روش کار

پرورش ونمونه برداری: در این تحقیق جهت پرورش لارو از آکواریوم‌های با حجم تقریبی ۱۱۵ لیتر(با حجم آبگیری ۷۵ لیتر) استفاده شد. لاروها با روش حجمی شمارش گردیده و بصورت کاملاً تصادفی در ٦ تانک با تراکم ۷۰۰۰ عدد در هر تانک (٦۰ لارو در هر لیتر) منتقل می شوند. هر روز صبح قبل از غذادهی تمام آکواریوم‌ها جهت خروج غذاهای خورده نشده، مدفوع و لاروهای مرده به خوبی سیفون می‌شدند و ماهیان مرده نیز شمارش می شدند. بعد از سیفون کردن، تمام آکواریوم‌ها با آب تازه آبگیری می‌شدند (تقریبا ۷۵٪). لاروها تحت رژیم نوری ۱٦ ساعت روشنایی (16L+8D) پرورش یافتند. تغذیه لاروها با ناپلی آرتمیا(*Artemia franciscana*) هر ٤ ساعت یکبار از ۷ صبح تا ۷ غروب و در سطح اشباع صورت گرفت.

نمونه‌برداری از لاروها از دومین روز تفریخ تا ۳۰ روز بعد از آن صورت پذیرفت. نمونه برداری بصورت کاملاً تصادفی و در صبح روزهای ۲، ۳، ۵، ٦ ،۸ ،۱۰ ،۱۵ ،۲۱ ،۲۵ ، ۳۰ انجام شد و بلافاصله نمونه‌ها به یخچال ۸۰- (مدل GFL 300) انتقال یافتند و تا مرحله سنجش نگهداری شدند. جهت نمونه برداری لاروها در شب غذادهی نشدند تا تاثیر آنزیم‌های خارجی ناشی از غذای زنده هضم نشده روی دستگاه گوارش لارو حداقل باشد (۱۹).

تهیه عصاره آنزیم پانکراسی: برای سنجش آنزیم آمیلاز، یک گرم بافت در ۹ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Triton X-100 ۰/۱ درصد در pH ۷/۸ توسط هموژنایزر (مدل D 500) هموژن شده و سپس سانتریفوژ شده و سوپرناتانت حاصله

تا زمان سنجش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۰].

تهیه عصاره آنزیم‌های روده‌ای: برای استخراج آنزیم آلکالین فسفاتاز از بافر سرد Manitol ۵۰ میلی مولار، بافر Tris-HCl ۲ میلی‌مولار در pH ۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی-حجمی استفاده گردید و پس از دو مرحله سانتریفوژ توسط Cacl2 ۰/۱ مولار، سوپرناتانت حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید [۹]. پروتئین محلول نمونه‌های هموژن شده لارو ماهی سفید به روش Bradford [٦] سنجیده شد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز: برای تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت تاثیر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد. بعد قرائت نوری با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ٥٤٠ نانومتر انجام شد [۲۷].

سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: ۵ قسمت از بافر بیکربنات را با یک قسمت محلول معرف Para-nitrophenylphosphate ۰/۱ مولار مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هم دمایی صورت گیرد. ۰/۵ میلی لیتر از این مخلوط را با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این زمان ۵ میلی‌لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه شد تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در ٤٠٥ نانومتر اندازه-گیری شد [۳].

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One–Way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم افزار SPSS 17 برای آنالیز داده-ها و Excel برای رسم نمودار استفاده شد.

نتایج

لاروها از ابتدا تا انتهای پرورش بازماندگی بالایی (۲/٤۲ ±۸۵٪) داشتند. نتایج مربوط به رشد و ضریب رشد ویژه در نمودار ۱ نشان داده شده است. میانگین طول وزن لاروها در ابتدای دوره به ترتیب ۰/۹۹۳٦±۰/۳ ۵ میلی گرم و طول اولیه ۰/٤۲۸ ±۸/۲ میلی‌متر بود. نتایج مربوط به رشد نشان می-دهد که رشد ماهی تا روزهای ١٤ به طور آهسته انجام شده و بعد از آن تا حدودی روند افزایشی از خود نشان دادند، بطوری که درصد افزایش وزن بدن در روز ۱۸ نسبت به روز اول ۷۲/٤۱ و ۹۸/۲۷ درصد بود ولی از روز ۱۸ تا ۳۰ ۱۹۵/۷۹و ۲۵۳/٤۵ درصد افزایش یافت (نمودار۱). نتایج مربوط به پروتئین خام، چربی خام، کربوهیدرات و خاکستر ناپلئوس آرتمیا در جدول ۱ نشان داده شده است.

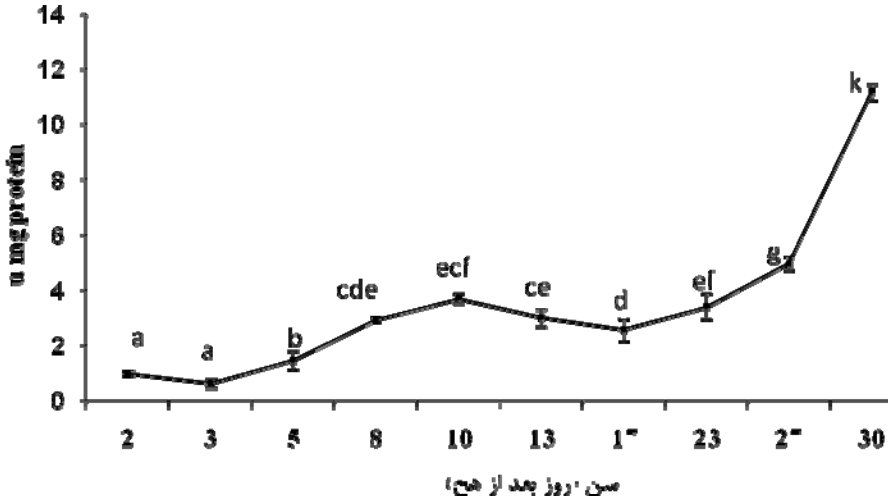
جدول ۱- آنالیز تقریبی ناپلئوس آرتمیا

پروتئین	۵۲/۲±۸/۸
چربی	۱۸/۹±۴/۵
کربوهیدرات	۱۴/۸±۴/۸
خاکستر	۹/۷±۴/۶

نمودار ۱ـ منحنی وزن لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلی آرتمیا

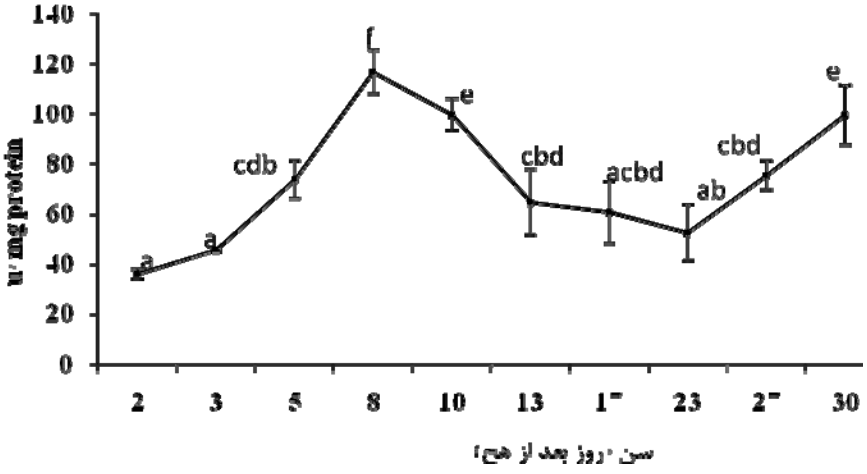
شکل ۱- لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلی آرتمیا در هفته ۱، ۲، ۳ و هفته ٤ پرورش

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز: بر طبق نمودار۲ کمترین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در روزهای ۲ و ۳ بعد از تفریخ مشاهده می‌شود (به ترتیب ۰/۰۹۱ ±۹۷٦ /۰ و ۰/۱۵۸± ۰/٦۲ u/mg protein). بعد از آن فعالیت آنزیمی تا روز۱۰ بعد از تفریخ افزایش یافت و سپس فعالیت آن تاروز ۱۷ در مقایسه با روز ۱۰ بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیمی از روز ۲۳ تا روز ۳۰ بعد از تفریخ یک روند صعودی را نشان داده است بطوری که بیشترین فعالیت در روز ۳۰ مشاهده می‌شود (۰/۲۸± ۱۱/۱۸)که اختلاف معنی‌داری با سایر روزها دارد (P<۰/۰۵).



نمودار۲ـ فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز (u /mg protein)

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: فعالیت اختصاصی آنزیم آلکالین فسفاتاز از روز ۲ تا ۳۰ در شکل ۳ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم از روز ۳ بعد از تفریخ افزایش یافته و در روز ۸ بعد از تفریخ به بیشترین میزان (u/mg protein ۱۱/۲۳± ۵۲/۵۳) می‌رسد. سپس فعالیت آنزیم کاهش یافت و در فواصل روزهای ۲۳-۱۳ اختلاف معناداری بین داده‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در روز ۲۷ بعد از تفریخ فعالیت آنزیمی مجدداً افزایش (u/mg protein ۵/۸ ± ۷۵/۳) یافت (P>۰/۰۵).



نمودار۳ـ فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلیایی (u /mg protein)

بحث

رشد: همانطور که در نمودار۱ نشان داده شد، روند رشدی آهسته‌ای در طی ۲۸ روز پرورش مشاهده شد، که این کاهش رشد احتمالا بخاطر تراکم بالا و در اثر برهمکنش اجتماعی برای غذا و فضا می‌باشد. با این وجود نرخ بازماندگی در حد بالایی قرار داشت و تلفات کمی مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر با یافته‌های Jamro`z بر روی لارو گربه ماهی اروپایی قابل مقایسه می‌باشد [۱۶]. در این مطالعه لاروهای تغذیه شده با غذای طبیعی پایین‌ترین نرخ رشد و بالاترین نرخ بازماندگی را نشان دادند. اما در مطالعه‌ای که ابوالفتحی [۲] بر روی لارو ماهی سفید انجام دادند بالاترین عملکرد رشد و نرخ بازماندگی در آن دسته از لاروهایی که با روتیفر تغذیه شدند، یافت شد.

آلکالین فسفاتاز: در تحقیق حاضر و در لارو ماهی سفید میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی از روز دوم بعد از تخم گشایی افزایش یافته و در روز هشتم بعد از تخم‌گشایی در هر دو تیمار غذایی به بیشترین مقدار خود رسید. بعد از روز هشتم فعالیت آلکالین فسفاتاز یک روند نزولی نشان داده و مجددا در هفته سوم افزایش یافت. این الگوی تغییر در ماهیانی مانند *S. senegalensis* و *D. puntazzo* نیز مشاهده شد [۲۳ و ۲۶]. Zambonino-Infante بیان کرد که نوسانات فعالیت اختصاصی آنزیم‌های هضمی به خاطر رخدادهای متابولیکی و فیزیولوژیکی متفاوت در طول تکامل لاروی معمولا مشاهده می‌شود [۲۹]. برای برخی از گونه‌ها مانند لارو ماهی *D. dentex* در روز ششم [۱۲] و در *D. sargu* در روز نهم [۸] یک حداکثر فعالیت زود هنگام گزارش گردید. بر طبق مطالعات Gisbert [۱۲] با افزایش سن فعالیت آنزیم سیتوزولیک کاهش یافته و همزمان فعالیت آنزیم‌های غشای نوار مسواکی (BBM)، افزایش می‌یابد در واقع، افزایش فعالیت آنزیم‌های براش بوردر (Ap) نشان دهنده روند نرمال تکاملی در بلوغ انتروسیت‌های روده لارو ماهی و بهبود توانایی هضمی روده در طول تکامل لاروی می باشد [۱۳].

در بررسی مورفولوژیکی بر روی لار ماهی سفید مشاهده شد که در حدود روز ۲۰ بعد از تخم گشایی، زمانی که کیسه زرده کاملا جذب شده، چین‌های روده‌ای توسعه بیشتری یافتند [۱۵]. در تحقیق حاضر، فعالیت آلکالین در لاروهای تغذیه شده با غذای زنده بعد از روز ۲۳ افزایش یافت که احتمالا نشان دهنده توسعه غشای روده و پرزهای موجود در دیواره روده می باشد. بنابراین افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی بعد از یک کاهش اولیه نشان دهنده تکامل روده لارو ماهی سفید در هضم و جذب مواد مغذی و تکامل و تمایز انتروسیت‌ها می‌باشد. بعلاوه گزارش شده است که ماهیان همه‌چیزخوار فعالیت AP کمتری نسبت به ماهیان گوشتخوار دارند [۱۴]. به طوری که در مطالعه حاضر لارو ماهی سفید فعالیت فسفاتاز قلیایی کمتری در مقایسه با برخی از گونه‌های گوشتخوار مانند لارو سول سنگالی (*Solea senegalensis*) [۲۳] نشان داد.

آلفا- آمیلاز: فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لارو ماهی سفید در روز دوم بعد از تخم‌گشایی مشاهده گردید. فعالیت اختصاصی آمیلاز بعد از شروع تغذیه خارجی افزایش یافت. بر اساس تحقیق Gisbert و همکاران [۱۲] محتوای بالای گلیکوژن و کربوهیدرات جیره در غذای زنده ممکن است سنتز و ترشح آمیلاز را تحریک و محتوای کمتر این مواد در جیره‌های غذایی خشک در طی مرحله weaning (تغییر رژیم غذایی) ممکن است فعالیت این آنزیم را کاهش دهد. در این مطالعه مقدار کربوهیدرات در ناپلئوس آرتمیا ۱۴/۸ درصد بود (جدول۱) بنابراین، می توان فعالیت بالای آمیلاز در لارو ماهی سفید بعد شروع تغذیه خارجی را به مقادیر قابل توجه کربوهیدرات‌های جیره نسبت داد. در دنتکس

معمولی (*Dentex dentex*) نیز آمیلاز در روز تخم گشایی و قبل از باز شدن دهان لارو وجود داشت [۱۲]. بعلاوه، در لارو تاسماهی ایرانی فعالیت آمیلاز در طی جذب کیسه زرده بالا بود [٤]. Kim و همکارانش بیان کردند که آمیلاز در اوایل انتوژنزیز، حتی در نبود غذا، سنتز می‌شود و کربوهیدرات‌ها فعالانه در طول اندام‌زایی کاتالیز می‌شوند [۱۸]. بنابراین حضور بالای آمیلاز همزمان با شروع تغذیه دلالت بر این موضوع دارد که احتمالا کربوهیدرات‌های موجود در جیره شکاف انرژی بین تقاضای پروتئین در زمان تغذیه داخلی و خارجی برای لارو ماهیان پر را کرده و زمانی که هضم لیپید و پروتئین افزایش می‌یابد توانایی هضم کربوهیدرات توسط ماهیان کاهش می‌یابد [۱۸].

Peres بیان کرد که کاهش فعالیت آمیلاز طی تکامل لاروی، مرتبط با میزان کربوهیدرات غذا نبوده و یک برنامه‌ریزی ژنتیکی است [۲۱]. Zambonino و Caho نیز گزارش کردند که کاهش فعالیت آمیلاز در لارو ماهی یک برنامه ریزی ژنتیکی است، تا بعد از مراحل اولیه، کربوهیدرات‌های ذخیره شده در بدن را هضم کرده و با مصرف جیره‌های غنی از کربوهیدرات، پروتئین را ذخیره کند [۲۸]. بنابراین بطور کلی می‌توان گفت افزایش آلفا آمیلاز در دوران کیسه زرده یک برنامه‌ریزی ژنتیکی و افزایش در دوران تغذیه علاوه بر برنامه‌ریزی ژنتیکی جهت هضم بهتر کربوهیدرات‌ها، ناشی از تحریک کربوهیدرات جیره نیز می‌باشد. فعالیت آنزیم آمیلاز بعد از روز دهم در لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلئوس ارتمیا کاهش یافته و سپس بین روزهای ۳۰-۲۷ افزایش واضحی در فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده شد.

از آنجایی که ناپلئوس آرتمیا همه چیزخوار می‌باشد، سطح آمیلاز بالایی برای هضم کربوهیدرات موجود در میکروآلگا دارد. بنابراین، آنزیم هایی به غیر از آمیلاز در ناپلئوس آرتمیا ممکن است برای شکارچیان آرتمیا اهمیت غیرمستقیم به عنوان آنزیم‌های هضمی خارجی داشته باشند [۱۱].

فعالیت کل آنزیم‌های هضمی در پایان آزمایش برای تمام آنزیم‌های مورد مطالعه افزایش یافته که نشان دهنده افزایش توانایی هضمی لارو در این دوره می‌باشد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های روده‌ای (فسفاتاز قلیایی) در مراحل تکامل لارو، بلوغ انتروسیت‌ها را شبیه آن چه در افراد بالغ وجود دارد، نشان می‌دهد. با توجه به فعالیت آنزیم‌های گوارشی، مورفولوژی ظاهری و رشد لارو ماهی سفید، فاصله روزهای ۸ تا ۱۰ بعد از تفریخ زمان مناسبی جهت تغذیه با جیره خشک (weaning) در این ماهی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارگاه شهید رجایی به منظور تامین لارو ماهی سفید و از جناب آقای مهندس خلیلی مسئول آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

۱. خانی، پور. ع.، ولی پور، ر. ۱۳۸٤. ماهی سفید جواهر دریای خزر. ناشر شیلات ایران، ۸۷ صفحه.

2. Abolfathi, M., A. Hajimoradloo, R. Ghorbani, and Zamani, A (2011), Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in juvenile roach, *Rutilus rutilus caspicus*. *Compar-ative Biochemistry and Physiology*, 1-8.

3. Bessey, O.A., O.H. Lowry, and M.J. Brock (1946), Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem,* 164: 321–329.

4. Babaei, S.S., A.M. Abedian Kenari, R.M. Nazari, and E.Gisbert (2011), Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318: 138-144.

5. Bolasina, S., A. Perez, and Y. Yamashita (2006), Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. *Aquaculture*, 252: 503– 515

6. 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 Biochemestry,* 72: 248–254.

7. Cahu, C.L., J.L. Zambonino Infante, A.M. Escaffre, P. Bergot, and S. Kaushik (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. Cara, J.B., F.J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Dias, and M. Yúferas (2003), Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol,* 63: 48–58.

9. Crane, R.K., G. Boge, and A. Rigal (1979), Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Biochim. Biophys. Acta*, 554: 264–267.

10. Furne, M., M. Garcia-Gallego, M.C. Hidalgo, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezain, and A. Sanz (2008), Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 149: 420–425.

11. Gawlicka, A., B. Parent, M.H. Horn, N. Ross, I. Opstad, and O.J. Torrissen (2000), Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*. Vol. 184: 303-314.

12. Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis, and A. Estévez (2009), Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex,* during early ontogeny. *Aquaculture,* 287: 381–387.

13. Guerreiro, I., M. de Vareilles, P. Pousão-Ferreira, V. Rodrigues, M. Teresa Dinis, and L . Ribeiro (2010), Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* 300: 194–205.

14. Harpaz, S., and Z. Uni (1999), Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 124:155–160

15. Jafari, M., M.S. Kamarudin, C.H. Saad, A. Arshad, S. Oryan, and M. Bahmani (2009), Develop ‌ment of morphology in hatchery-reared *Rutilus frisii kutum* larvae. *Eur J Sci Res,* 38:296–305.

16. JamrO`z, M., D. Kucharczyk, R. Kujawa, and A. Mamcarz (2008), Effect of stocking density and three various diets on growth and survival of European catfish (*Silurus glanis l.*) larvae under intensive rearing condition. *Natural Sciences*, 23(4): 850–857.

17. Jobling, M. (1995), Digestion and absorbtion. In: Jobling, M. (Ed), Environmental Biology of Fishes, Chapter 6. Chapman and Hall, London England. Pp: 175- 210.

18. Kim, B.G., S. Divakaran, C.L. Brown, and A.C. Ostrowski (2001), Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*) . *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 24: 225-241.

19. Kolkovski, S. (2001), Digestive enzymes in fish larvae and juveniles- implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181–201.

20. Lavens, P., and P. Sorgeloos (2001), Use of Brine shrimp, Artemia spp., in marine fish larviculture . *Aqacuaculture,* 200: 147-159.

21. Peres, A., C.L. Cahu, J.L. Zambonino Infante, M.M. Legall, and P. Quazuguel (1996), Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem* ,15: 237–242.

22. Rathore R.M., S. Kumar, R.. Chakrabarti (2005), Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in Catla catla (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 259(142 B): 98-106.

23. Ribeiro, L., J.L. Zambonino Infante, C. Cahu, and M.T. Dinis (2002), Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiol. Biochem*, 27: 61–69.

24. Senger, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas, and W. Hanke (1995), A tabular overview of organogenesis in larval turbot (Scophthamus maximus). ICES *Marine Science Symposiu,* 201: 35-39.

25. Sorgeloos,P., P. Dhert, and P. Candrev (2001), Use of brine shrimp, Artemia spp., in marin fish larviculture. *Aqacuaculture* 200: 147-159.

26. Suzer, C., S. Aktülün, D. Çoban, H.O. Kamacı, Ş. Saka, K.Fırat, and A. Alpbaz (2007a), Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comp. Biochem. Physiol*. A 148: 470–477.

27. Worthington, C.C. (1991), Worthigton enzyme manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold. New Jersey. pp,38-42 (amylase, Alpha).

28. Zambonino-Infante, J.L., and C.L. Cahu (2007), Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish, applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268(1–4):98–105.

29. Zambonino-Infante, J.L., E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez, and C.L. Cahu (2008), Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., D. Bureau, B.G. Kapoor, (Eds.), Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277–344.