

استفاده از آنزیم تریپسین در جیره غذایی فیل ماهی (*Huso huso*) و اثرات آن بر رشد، ترکیب بدن، برخی فاکتورهای بیوشیمیایی خون و فعالیت تریپسین روده

- **علی خسروانی زاده:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
- **محمد سوداگر*:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
- **حسن صالحی:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: 14155-6116
- **علیرضا عالیشاهی:** گروه فرآوری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
- **سیدمهدی جعفری:** گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487

تاریخ پذیرش: بهمن 1395

تاریخ دریافت: آبان 1395

چکیده

مکمل‌های آنزیمی پروتئازی می‌توانند اثرات فاکتورهای ضد تغذیه‌ای را از بین برده و سبب بهبود رشد ماهیان شوند. هدف از این پژوهش، به‌کارگیری آنزیم تریپسین خوکی در جیره غذایی و بررسی اثرات آن بر فاکتورهای رشد، ترکیب بدن، برخی از پارامترهای بیوشیمیایی خون و فعالیت تریپسین روده فیل ماهی (*Huso huso*) بوده است. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تیمار و سه تکرار انجام شد و آنزیم تریپسین در 3 سطح صفر، 0/01 و 0/02 درصد به جیره غذایی اضافه شد. ماهیان به مدت 45 روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند و فاکتورهای رشد شامل: درصد افزایش وزن (WGP)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، شاخص وضعیت (CF)، کارایی پروتئین (PER) و شاخص کبدی (HSI) مورد بررسی قرار گرفت. از فاکتورهای بیوشیمیایی خون میزان گلوکز، BUN، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین اندازه‌گیری و بررسی شد. تیمارهای مختلف در شاخص وضعیت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p>0/05$). اما درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین در سطوح آنزیمی 0/01 و 0/02 درصد با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/05$). شاخص کبدی و فعالیت تریپسین روده در سطح 0/02 درصد با گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند ($p<0/05$). ترکیب بدن و فاکتورهای بیوشیمیایی خون، در سطوح مختلف آنزیمی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$).

کلمات کلیدی: تریپسین، فیل‌ماهی (*Huso huso*)، شاخص‌های رشد، فاکتورهای بیوشیمیایی خون

مقدمه

لازم برای پرورش ماهیان و سخت‌پوستان را تشکیل می‌دهد، پس غذاهای مصنوعی باید با توجه به اصول علمی فرموله شوند (افشارمازندران، ۱۳۸۱). پروتئین مهم‌ترین و با ارزش‌ترین بخش جیره غذایی آبزیان به‌شمار می‌رود (سالکیوسفی، ۱۳۷۹). کمبود پروتئین سبب کاهش میزان رشد و بازدهی غذایی، بی‌اشتهایی، کاهش تعادل ازت و غلظت پروتئین سرم خون، کم‌خونی، تجمع چربی در جگر و کاهش ساخت هورمون‌ها و آنزیم‌ها در بدن ماهی می‌شود. منابع پروتئینی علاوه بر این که بخش مهمی از جیره غذایی را به خود اختصاص می‌دهند، گران‌ترین بخش جیره نیز محسوب می‌گردند (افشارمازندران، ۱۳۸۱).

هضم غذا در بدن حیوانات توسط آنزیم‌ها انجام می‌شود این مواد که ماهیت پروتئینی دارند توسط خود حیوانات یا میکروارگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش آن‌ها تولید می‌شوند. در بدن حیوانات همه آنزیم‌ها وجود ندارند و یا مقدار آن‌ها

رشد سریع جمعیت و نیاز روز افزون به منابع غذایی و به‌خصوص پروتئین از سوپی و کاهش ذخایر آبزیان به‌دلایل مختلف از جمله: آلودگی آب‌ها، تخریب محیط زیست، صید بی‌رویه و غیره در قرن حاضر، بیش از پیش سبب رونق آبی پروری در جوامع بشری گردیده، که در این میان پرورش ماهی سهم عمده‌ای را به خود اختصاص داده است. عمده هدف ماهی پروری را می‌توان تولید ماهی در کوتاه‌ترین زمان با صرف کمترین نهاده دانست. هدفی که جز با افزایش حداکثری سرعت و بازده رشد به‌صورت هم‌زمان تحقق نمی‌پذیرد (Ross و Ross، 2008؛ Subasinghe، 2005).

تهیه غذا از مهم‌ترین موارد در پرورش آبزیان به‌شمار می‌آید، هزینه غذا به‌طور معمول ۳۰ تا ۶۰ درصد کل هزینه‌های



گروه آزمایش	جیره مورد استفاده برای تغذیه
گروه یک یا گروه شاهد	جیره پایه
گروه سه	جیره پایه به همراه مکمل 0/01%
گروه چهار	جیره پایه به همراه مکمل 0/02% تریپسین خاکی

غذادهی روزانه دو بار (9 صبح و 6 عصر) و به میزان 3 درصد از وزن بدن انجام شد. هر 15 روز یکبار ماهیان با ترازو با دقت 0/01 گرم برای سنجش رشد توزین و با دقت یک میلی متر طول کل آن‌ها اندازه‌گیری شد و میزان غذا مطابق با افزایش وزن تنظیم گردید. با استفاده از داده‌های حاصل از زیست‌سنجی‌ها و نیز میزان پروتئین موجود در غذا و اندازه‌گیری پروتئین لاشه، شاخص‌های درصد افزایش وزن بدن، ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، نرخ بازده پروتئین و شاخص کبدی تعیین شدند (Tacon, 1990).

$100 \times \text{طول}^3 / \text{وزن تر} = \text{CF}$ (ضریب چاقی)
 $100 \times \frac{W_2}{W_1} = \text{BWI}$ (درصد افزایش وزن بدن)
 $100 \times \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{\text{دوره پرورش به روز}} = \text{SGR}$ (نرخ رشد ویژه)

افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = FCR (ضریب تبدیل غذایی)
 پروتئین مصرفی (گرم) / وزن تولید شده (گرم) = PER (نرخ بازده پروتئین)

$100 \times \text{وزن بدن} / \text{وزن کبد} = \text{HSI}$ (شاخص کبدی)
 در روابط بالا W_1 وزن اولیه و W_2 وزن نهایی ماهی بر حسب گرم می‌باشند.

تجزیه تقریبی ترکیبات لاشه ماهیان جهت اندازه‌گیری میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر براساس دستورالعمل AOAC (2005) انجام شد. برای اندازه‌گیری رطوبت جیره از آن 105 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت استفاده شد، برای سنجش پروتئین خام از روش کج‌دال در سه مرحله هضم، تقطیر و تیتراسیون و ضرب کردن میزان ازت به دست آمده از هر گرم ماده خشک در عدد 6/25، استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان چربی خام از سوکسله و حلال اتر و برای سنجش میزان خاکستر از سوزاندن نمونه‌ها در کوره الکتریکی در دمای 550 درجه سانتی‌گراد استفاده گردید (AOAC, 2005).

در انتهای دوره پرورش از هر واحد آزمایشی (هر تکرار) سه ماهی (از هر تیمار آزمایشی 9 ماهی) پس از بی‌هوشی خونگیری شدند. از هر ماهی 1/5 سی‌سی خون از محل شریان دمی، در انتهای باله مخرجی توسط سرنگ استریل گرفته و به تیوب‌های 2 میلی‌لیتری منتقل شد. سرم خون به کمک دستگاه سانتریفیوژ (3000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه) جدا و به تیوب‌های استریل انتقال یافت و سپس تا زمان استفاده در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. فاکتورهای بیوشیمیایی خون شامل: گلوکز، نیترژن اوره‌ای خون (BUN) پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین سرم با استفاده از کیت‌های کلینیکی تجاری (پارس آزمون، ایران) سنجیده شد.

3 عدد ماهی از هر تکرار با استفاده از روش آسان‌کنشی قطع نخاع شده و سریعاً در مجاورت یخ، به منظور به حداقل

برای هضم همه مواد غذایی کافی نیست، بنابراین بخش‌هایی از مواد غذایی هضم و جذب نشده دفع می‌شوند (Vielma و همکاران، 2000). از آنجاکه هزینه خوراک بالاترین سهم را در صنعت پرورش دام، طیور و آبزیان داراست، استفاده از آنزیم‌های سنتتیک می‌تواند موجبات کاهش هزینه تولید را فراهم کند و با تجزیه مواد ضد مغذی موجود در خوراک، استفاده بهینه خوراک مصرفی، سلامت تولید و کاهش آلودگی محیط‌زیست را به همراه داشته باشد (Vielma و همکاران، 2000). استفاده از مکمل‌های آنزیمی، بیش‌تر با هدف بهبود استفاده از مواد مغذی، حفظ عملکرد جیره‌هایی که کیفیت پایینی دارند، کاهش هزینه‌های فرمولاسیون، وسعت بخشیدن به دامنه مواد اولیه جیره، فائق آمدن بر عوامل ناسازگار و ضد تغذیه‌ای مواد اولیه، کاهش دفع مواد مغذی در آب و بازده اقتصادی بهتر صورت می‌گیرد (Singh و همکاران، 2011). افزایش نرخ رشد و کارایی پروتئین در ماهیان آزاد (*Salmo salar*) تغذیه شده با جیره حاوی آنزیم‌های پانکراسی (Carter و همکاران، 1994)، افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی در ماهیان کپور (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با جیره حاوی مکمل آنزیمی تریپسین گاوی (Dabrowska و همکاران، 1979) و افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی در ماهی روهو (*Labeo rohita*) (Kumari و همکاران، 2013) تغذیه شده با جیره حاوی تریپسین گزارش شده است.

با توجه با اثر مثبت مکمل تریپسین بر رشد در مطالعات مختلف و اهمیت فیل‌ماهی در صنعت آبی پروری ایران در این پژوهش اثر افزودن مکمل آنزیمی تریپسین به جیره فیل‌ماهی بر قابلیت رشد ماهی و اثرات جانبی احتمالی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد 90 قطعه فیل‌ماهی با میانگین وزن $10/4 \pm 0/4$ گرم در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان تهیه و در مخازن 2000 لیتری، با 1000 لیتر آب و دبی 8 لیتر در دقیقه برای یک دوره 15 روزه سازگار و در طول این مدت با جیره غذایی متداول تغذیه شدند. آزمایش برای یک دوره 45 روزه اجرا شد. در شروع مطالعه ماهیان پس از زیست‌سنجی به صورت انفرادی، به صورت تصادفی در 3 گروه آزمایش با 3 تکرار براساس یک طرح کاملاً تصادفی توزیع شدند. درجه حرارت آب روزانه و اسیدیته و اکسیژن محلول هر هفته با شیوه‌های استاندارد ارزیابی و ثبت شدند. برای انجام این پژوهش از جیره تجاری Coppens با محتوای 50% پروتئین، 14% چربی، 0/8 درصد فیبر و 6/8 درصد خاکستر در کنار آنزیم تریپسین خاکی (EC:3.4.21.4)، محصول کمپانی سیگما الدریچ (T4799) به میزان صفر، 0/01 درصد و 0/02 درصد برای تغذیه ماهیان استفاده گردید (جدول 1). برای حل کردن آنزیم بافر سدیم فسفات با اسیدیته 7/6 استفاده شد، محلول حاوی آنزیم بر روی جیره‌ها اسپری شد (بر روی جیره شاهد بافر بدون آنزیم اسپری شد) و در نهایت جهت به حداقل رساندن آبشویی، بر روی تمام جیره‌ها مقدار ثابتی پودر ژله حل شده در آب، اسپری گردید (عادلین و همکاران، 1395).

جدول 1: جیره‌های مورد استفاده برای تغذیه تیمارهای مختلف

مرگ و میری در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. در پایان 45 روز پرورش، شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه و کارایی پروتئین در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل آنزیمی تریپسین (0/01 و 0/02 درصد) به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) از ماهیان گروه شاهد بالاتر بود. در مورد شاخص‌های فوق اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی مقادیر 0/01 و 0/02 درصد آنزیم تریپسین دیده نشد ($p > 0/05$). ضریب تبدیل غذایی (FCR) به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در گروه شاهد بالاتر از سایر گروه‌ها بود. ضریب چاقی در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری ($p > 0/05$) را نشان نداد. شاخص کبدی در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی 0/02 درصد آنزیم به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود (جدول 2).

در جدول 3 نتایج مربوط به اثر افزودن مقادیر مختلف مکمل آنزیمی تریپسین در جیره بر ترکیب بدن فیل ماهیان پرورشی آورده شده است. بیش‌ترین میزان پروتئین متعلق به ماهیان تیمار تغذیه شده با جیره حاوی 0/02 درصد آنزیم بود، که به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) بالاتر از تیمار شاهد بود. مقادیر رطوبت و چربی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد. میزان خاکستر در تیمار 0/02 درصد به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) بیش‌تر از سایر تیمارها بود.

جدول 4 میزان فاکتورهای بیوشیمیایی خون شامل: گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN)، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد، بر اساس نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آنزیم مکمل تریپسین مشاهده نشد ($p > 0/05$).

نتایج حاصل از سنجش آنزیم تریپسین روده فیل ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر صفر، 0/01 و 0/02 درصد افزودنی تریپسین در شکل 1 آمده است. میزان فعالیت آنزیم تریپسین در روده ماهیان تیمار 0/02 درصد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گروه‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

جدول 2: شاخص‌های رشد و کبدی فیل ماهیان پرورشی در تیمارهای مختلف

تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	درصد افزایش وزن	SGR (درصد در روز)	FCR	PER	CF	HSI	درصد بقا
شاهد	10/4±0/2 ^a	26/1±2/8 ^a	150/9±31/9 ^a	2/0±0/28 ^a	2/18±0/4 ^b	0/95±0/2 ^a	0/33±0/03 ^a	3/2±0/15 ^a	100
0/01	10/5±0/4 ^a	30/2±2/3 ^b	287/6±26/3 ^b	2/3±0/20 ^b	1/70±0/2 ^a	1/19±0/1 ^b	0/34±0/04 ^a	3/4±0/09 ^a	100
0/02	10/3±0/3 ^a	31/1±3/3 ^b	302/2±39/0 ^b	2/4±0/28 ^b	1/63±0/3 ^a	1/26±0/2 ^b	0/34±0/02 ^a	3/7±0/21 ^b	100

میانگین (± انحراف معیار)

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست ($p < 0/05$).

جدول 3: ترکیب بیوشیمیایی لاشه ماهیان در تیمارهای مختلف (بر اساس درصد)

تیمارها	رطوبت	پروتئین خام	لیپید خام	خاکستر
شاهد	76/71±0/82	14/81±0/19 ^a	4/57±0/37	3/48±0/03 ^a
0/01	76/43±0/97	15/30±0/20 ^{ab}	4/37±0/46	3/52±0/09 ^a
0/02	75/72±0/76	15/48±0/34 ^b	4/31±0/26	3/75±0/10 ^b

رساندن فعالیت‌های آنزیمی کالبدگشایی گردید. روده ماهیان به-دقت خارج، تخلیه و با دقت یک میلی‌گرم توزین شدند. به کمک هموژنایزر یک محلول هموژن از بافت‌های مذکور در 9 میلی-لیتر بافر (100 mM Tris-HCl buffer with 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.8) تهیه شد. محلول‌های حاصل با سرعت 5000 دور در دقیقه به‌مدت 30 دقیقه در 4 درجه سانتی-گراد سانتیفریوژ شده و از فاز رویی نمونه‌ها جهت سنجش میزان آنزیم تریپسین استفاده گردید (Furne، 2008). فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از روش Erlanger و همکاران (1961) و سوپسترا BAPNA (N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-HCL) سنجش گردید، برای این منظور در ابتدا 43/5 میلی‌گرم BAPNA در یک میلی‌لیتر Dimethylsulphoxide (DMSO) حل شد و سپس با محلول بافر 0/05 Tris-HCl مولار 0/02 CaCl₂.2H₂O مولار، pH=7/5 به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه 25 ماکرولیتر عصاره آنزیمی با 1/25 سوپسترای آماده شده (BAPNA) به‌مدت 10 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گویه شده و سپس واکنش با اضافه نمودن 1 میلی‌لیتر اسیداستیک 30 درصد متوقف و میزان جذب نوری در طول 410 نانومتر خوانده شد. میزان آنزیم تریپسین از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میلی لیتر مخلوط واکنش} \times 1000 \times \text{میزان جذب نوری در طول موج 410 نانومتر} = \text{میلی گرم پروتئین در مخلوط واکنش} \div 8800$$

میزان پروتئین کل نمونه‌ها به شیوه Bradford (1976) با استفاده از سرم گاوی به‌عنوان استاندارد محاسبه شد. داده‌های به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش 22) با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه میانگین بین تیمارها، از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) در سطح معنی-داری 0/05 استفاده شد.

نتایج

در طول دوره پرورش فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در حد متعارف (دما 25/89±0/8 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن 6/4±0/2 میلی‌گرم در لیتر، اسیدیته 8/1±0/1) بودند و هیچ‌گونه



میانگین (± انحراف معیار)

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست ($p < 0/05$).

جدول 4. فاکتورهای بیوشیمیایی خون فیل ماهیان تغذیه شده با جیره های مختلف

تیمارها	گلوکز (میلی گرم/دسی لیتر)	BUN (میلی مول/لیتر)	پروتئین کل (میلی گرم/دسی لیتر)	آلبومین (میلی گرم/دسی لیتر)	گلوبولین (میلی گرم/دسی لیتر)	نسبت آلبومین به گلوبولین
شاهد	50/0±5/5 ^a	1/44±0/18 ^a	0/93±0/07 ^a	0/38±0/01 ^a	0/54±0/05 ^a	0/70±0/04 ^a
0/01	47/0±3/0 ^a	1/51±0/11 ^a	0/97±0/22 ^a	0/40±0/04 ^a	0/57±0/18 ^a	0/73±0/17 ^a
0/02	46/3±6/5 ^a	1/56±0/02 ^a	1/07±0/18 ^a	0/36±0/02 ^a	0/71±0/16 ^a	0/52±0/08 ^a

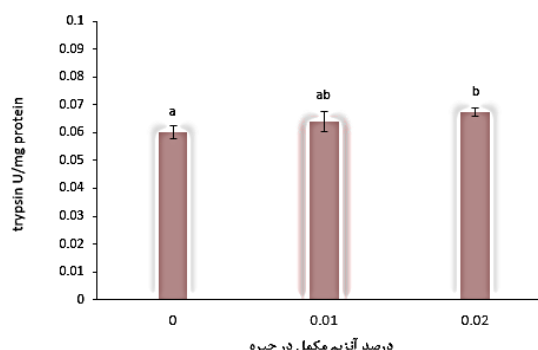
میانگین (± انحراف معیار)

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست ($p < 0/05$).

در مطالعه Dobrowska و همکاران (1979) افزودن عصاره آنزیمی روده و پانکراس کپور ماهیان بالغ به جیره لاروهای کپور معمولی سبب افزایش رشد آن ها نسبت به جیره های بدون آنزیم شد، اما این افزایش رشد کمتر از لاروهای تغذیه شده با غذای زنده بود. Carter و همکاران (1994) نیز افزایش رشد در ماهیان آزاد (*Salmo salar*) تغذیه شده با جیره حاوی پروتئاز را منتشر کردند. Klokovski و همکاران (1997) گزارش کردند استفاده از 0/05 درصد آنزیم پانکراس خوک در جیره لاروهای ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) اثر معنی داری بر رشد لاروها نداشت. به غیر از مطالعه اخیر دو مطالعه دیگر نتایج به دست آمده در این بررسی را تایید می کنند.

در مطالعه Ghomi و همکاران (2011) استفاده از مولتی آنزیم کمین (که حاوی پروتئاز نیز می باشد) در جیره فیل ماهی افزایش رشد را نشان داد، به طوری که میزان 250 میلی گرم آنزیم در هر کیلوگرم غذا بیشترین رشد را نشان داد، همچنین بیشترین میزان شاخص رشد ویژه و پایینترین ضریب تبدیل غذایی در این غلظت گزارش شد. در مطالعه دیگری که با استفاده از آنزیم کمین روی ماهی کپور معمولی انجام شد غلظت 1000 میلی گرم بر کیلوگرم آنزیم بیشترین میزان رشد و نرخ رشد ویژه و کمترین ضریب تبدیل غذایی را نشان داد (عادلین و همکاران، 1395). استفاده از آنزیم کمین به همراه فیتاز با مقادیر 0/5، 1 و 1/5 کیلوگرم در هر تن غذا در جیره قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اثر معنی داری بر فاکتورهای رشد، بقا و ضریب تبدیل غذایی نداشت (مرتضوی تبریزی و همکاران، 1390). به غیر از مطالعه اخیر نتایج دو مطالعه دیگر مشابه نتایج پژوهش حاضر می باشد.

استفاده از آنزیم آویزایم (حاوی پروتئاز) در جیره ماهی قزل آلا رنگین کمان سبب بهبود شاخص های رشد و بقا شد (قبادی و همکاران، 1388). Zamini و همکاران (2014) گزارش کردند استفاده از مکمل آنزیمی Natuzyme (حاوی پروتئاز) به میزان 0/5 گرم در کیلوگرم در جیره ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) رشد را در مقایسه با گروه شاهد بهبود بخشید و ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد. Ogunkoya و همکاران (2006) گزارش کردند، به کارگیری مکمل آنزیمی Superzyme (حاوی پروتئاز) به میزان 1 و 2/5 گرم در کیلوگرم در جیره قزل آلا رنگین کمان بر رشد بی اثر است. استفاده از آنزیم Bio-feed (حاوی پروتئاز باکتریایی) در جیره



شکل 1: اثر درصدهای مختلف آنزیم بر فعالیت تریپسین روده فیل ماهی

(حروف متفاوت روی هر میله نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهاست ($p < 0/05$))

بحث

نتایج این بررسی نشان داد استفاده از مکمل تریپسین در جیره فیل ماهی در کنار کاهش ضریب تبدیل غذایی، رشد را بهبود می بخشد، میزان پروتئین و خاکستر لاشه را افزایش می دهد، اما بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و بقا اثر معنی داری ندارد. در پژوهش حاضر با افزایش میزان آنزیم تریپسین در جیره غذایی، رشد افزایش یافت و بهترین میزان رشد را گروه تغذیه شده با جیره حاوی 0/02 درصد تریپسین نمایش داد، همچنین این گروه بهترین ضریب تبدیل غذایی را داشت. در این تیمار شاخص کبدی نیز به طور معنی داری بالاتر از سایر گروه ها بود. در بررسی Kumari و همکاران (2013) بر روی ماهی رو هو (*Labeo rohita*) نیز نتایج مشابهی به دست آمد به طوری که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی 0/02 درصد تریپسین در مقایسه با ماهیان گروه شاهد رشد بیشتری را نشان دادند، ضریب تبدیل غذایی کمتر و شاخص کبدی بالاتری داشتند. افزودن آنزیم تریپسین به میزان 5/67 گرم در کیلوگرم در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) موجب افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی شد و بر بقا ماهیان اثر منفی نداشت (Dobrowski، 1977). نتایج این مطالعه نیز موید نتیجه به دست آمده در پژوهش حاضر می باشد.

برخلاف بررسی حاضر، اثر معنی‌داری بر رشد مشاهده نگردید (Divakaran و Velasco، 1999).

با بررسی نتایج به‌دست آمده منابع مختلف و نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت افزودن پروتئاز به جیره غذایی عمدتاً توانسته شاخص‌های رشد را بهبود بخشد، در موارد معدودی هم که به افزایش رشد منجر نشده، احتمالاً عواملی مانند: انتخاب نوع آنزیم، شیوه فرآوری آنزیم، نحوه افزودن آنزیم به جیره، نحوه نگهداری جیره، گونه آبزی و نحوه تغذیه آن و.... را موثر دانست. در دو مطالعه‌ای که از آنزیم تریپسین به‌صورت منفرد در جیره ماهیان استفاده شد همانند این مطالعه افزایش رشد مشاهده گردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره فیل‌ماهی تأثیری بر محتوای رطوبت و چربی لاشه ماهیان نداشته، اما در تیمار 0/02 درصد میزان خاکستر و پروتئین لاشه ماهیان بیش‌تر از گروه شاهد بود. در مطالعه Lin و همکاران (2007) استفاده از مولتی آنزیم حاوی پروتئاز در ماهی تیلاپیا هیبرید اثری بر ترکیبات لاشه ماهیان نداشته، نتایجی که در مطالعات Shi و همکاران (2016) بر روی ماهی کاراس طلایی (با استفاده از آنزیم AG)، Leng و همکاران (2008) بر روی کپور معمولی (با استفاده از آنزیم AG) و Kolkovski و همکاران (1977) بر روی باس دریایی (با استفاده از آنزیم پانکراس) نیز گزارش شد. در بررسی Song و همکاران (2016) استفاده از پروتئاز باکتریایی در جیره میگوی پاسبید غربی بر میزان رطوبت، چربی و خاکستر لاشه اثری نداشته ولی میزان پروتئین لاشه را در تیمار 175 میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش داد. در مطالعه Ghomi و همکاران (2011) استفاده از آنزیم کمین، پروتئین لاشه‌ها در گروه‌های مختلف به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش و چربی را افزایش داد، همچنین خاکستر در تیمار 250 میلی‌گرم بر کیلوگرم (که بیش‌ترین رشد را داشت) بالاتر از سایر گروه‌ها بود. به‌جز مطالعه اخیر سایر مطالعات نتایج به‌دست آمده در این پژوهش را تایید می‌کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره فیل‌ماهی تأثیری بر میزان فاکتورهای بیوشیمیایی خون (گلوکز، BUN، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین) ندارد. در مطالعه عادلین و همکاران (1395) نیز میزان گلوکز، پروتئین کل، و آلبومین در ماهیان کپور تغذیه شده با جیره حاوی کمین تغییری معنی‌داری نداشت. در مطالعه حسینی‌فرد و همکاران (1392) که با استفاده از آنزیم آویزایم (حاوی پروتئاز) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت نیز میزان پروتئین کل و گلوبولین تغییری را نشان نداد، اما در مطالعه Kumari و همکاران (2013) بر روی ماهی روو (با استفاده از آنزیم تریپسین) میزان گلوکز و نسبت آلبومین به گلوبولین در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت، فاکتورهای BUN و گلوبولین نسبت به ماهیان شاهد افزایش داشت و پروتئین کل و آلبومین تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. به‌جز مطالعه اخیر سایر مطالعات نتایج به‌دست آمده در این پژوهش را تایید می‌کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آنزیم تریپسین در جیره فیل‌ماهی به‌میزان 0/02 درصد فعالیت تریپسین در روده ماهیان را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد،

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط Farhangi و Carter (2007) اثر معنی‌داری بر رشد ماهیان نداشت. استفاده از پروتئاز باکتریایی در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر معنی‌داری بر رشد نداشت (Dalsgaard و همکاران، 2012). برخلاف 3 مطالعه اخیر 2 مطالعه دیگر موید نتایج این پژوهش می‌باشند.

Chen و همکاران (2009) در تغذیه ماهی کپور سیاه (*Mylopharyngodon piceus*) از پروتئاز طبیعی استفاده کردند که دوز یک درصد سبب افزایش رشد شد، اما اثری بر شاخص کبدی نداشت. افزودن مولتی آنزیم حاوی پروتئاز طبیعی به جیره ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) میزان رشد، نرخ رشد ویژه و بازده پروتئین را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید، شاخص کبدی در تیمارهای حاوی آنزیم کاهش یافت و ضریب چاقی تفاوت معنی‌داری نداشت (Lin و همکاران، 2007). این دو مطالعه همانند مطالعه حاضر افزایش رشد در پی استفاده از آنزیم مکمل را تایید می‌کنند.

در مطالعه Shi و همکاران (2016) افزودن آنزیم Aquagrow (AG) که پروتئازی باکتریایی است به جیره ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus gibelio*) سبب افزایش رشد در ماهیان گردید. در مطالعه دیگری با افزودن همین آنزیم در غلظت 175 میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره ماهی کپور معمولی فاکتورهای رشد بهبود یافت و ضریب تبدیل غذایی کاهش یافت (Leng و همکاران، 2008). در پژوهشی دیگر اثر افزودن آنزیم AG به جیره ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) و میگو پاسبید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مورد بررسی قرار گرفت، در مورد میگوها افزودن مکمل آنزیمی به جیره‌های با سطح پایین پودر ماهی، فاکتورهای رشد را بهبود بخشید و هم‌تراز جیره‌های با سطح پودر ماهی بالا کرد. در ماهیان تیلاپیا نیز در بین جیره‌هایی که به‌صورت فشرده تهیه شده بودند جیره‌های حاوی آنزیم موجبات افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی را فراهم کردند (Li و همکاران، 2015). نتایج این مطالعات به لحاظ اثر بر رشد مشابه نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌باشد.

استفاده از آنزیم Papain (یک آنزیم پروتئاز گیاهی) در جیره ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌میزان 2 درصد در جیره بهترین عملکرد را نشان داد، سبب افزایش رشد، نرخ رشد ویژه و کارایی پروتئین شد، همچنین کاهش ضریب تبدیل غذایی را به‌همراه داشت (Sing و همکاران، 2011). در گزارشی دیگر در مورد استفاده از آنزیم Papain در جیره میگو آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*)، افزودن 0/1 درصد آنزیم به جیره سبب افزایش رشد و بقا در پست لاروها شد (Patil و Singh، 2014) که موید نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. Song و همکاران (2016) اثرات افزودن پروتئاز باکتریایی (غلظت‌های: 125، 150 و 175 میلی‌گرم در کیلوگرم) به جیره میگوی پاسبید غربی را مورد ارزیابی قرار دادند، که غلظت 175 میلی‌گرم در کیلوگرم بهترین میزان رشد، نرخ رشد ویژه، بازده پروتئین و ضریب تبدیل غذایی را داشت ولی اثر معنی‌داری در میزان بقا مشاهده نشد، این نتایج مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. در مطالعه دیگری بر روی میگو پاسبید غربی (*Litopenaeus vannamei*) اثر چهار پروتئاز تجاری (پروتئاز قارچی، مولتی آنزیم AK، پروتئاز Enzeco و Enzyme) مورد ارزیابی قرار گرفت و



3. سالکیوسفی، م.، 1379. تغذیه آبزیان پرورشی. انتشارات اصلانی. 318 صفحه.
4. عادلیان، م.؛ ایمانپور، م.ز.؛ تقی زاده، و. و مازندرانی، م.، 1395. استفاده از مولتی آنزیم کمین در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و اثرات آن بر شاخص های رشد و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی خون. محیط زیست جانوری. سال 8، شماره 1، صفحات 201 تا 206.
5. قبادی، ش.؛ متین فر، ع.؛ نظامی ش.ع. و سلطانی، م.، 1388. عملکرد مکمل آنزیمی اویزایم بر جایگزینی آرد ماهی با آرد سویا و تاثیر آن بر رشد و بازماندگی ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله شیلات. سال 3، شماره 2، صفحات 11 تا 22.
6. مرتضوی تیریزی، ج.؛ شیعیه، ج.؛ نوتاش، ش.؛ میرزایی، ح. و وطن خواه، ا.م.، 1390. تاثیر مقادیر مختلف مولتی آنزیم بر تغییرات آنزیم های کبدی و فاکتورهای عملکردی در ماهیان قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پروراری. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره 5، شماره 1، صفحات 1103 تا 1111.
7. مرتضوی تیریزی، س.ج.؛ نجاتی، م.؛ نوتاش، ش. و میرزایی، ح.، 1390. بررسی تاثیر سطوح مختلف مولتی آنزیم بر عملکرد و میزان بقا پروراری (*Oncorhynchus mykiss*) ماهیان قزل آلاي رنگین کمان. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره 5، شماره 1، صفحات 49 تا 55.
8. AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. Official Methods of Analysis 16th edition. AOAC, Gaithersburg, Maryland. 532 P.
9. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. Vol. 72, pp: 248-254.
10. Carter, C.G.; Houlihan, D.F.; Buchanan, B. and Mitchell, A.I., 1994. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a diet containing supplementary enzymes. Aquaculture research. Vol. 25, No. 1, pp: 37-46.
11. Chen, J.M.; Ye, J.Y.; Xu, Y.X.; Shen, B.Q.; Guo, J.L.; Pan, Q. and Wang, Y.H., 2009. Effect of adding neutral protease to diets on growth performance, digestion, and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Acta Hydrobiologica Sinica. Vol. 33, No. 4, pp: 726-731.
12. Dabrowska, H.; Grudniewski, H. and Dabrowski, K., 1979. Artificial diets for common carp: effect of the addition of enzyme extracts. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 41, No. 4, pp: 196-200.
13. Dabrowski, K. and Glogowski, J., 1977. A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. Aquaculture. Vol. 12, pp: 349-360.
14. Dalsgaard, J.; Verlhac, V.; Hjermitslev, N.; Ekmann, K.S.; Fischer, M.; Klausen, M. and Pedersen, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. Animal feed science and technology. Vol. 171, pp: 181-91.
15. Divakaran, S. and Velasco, M., 1999. Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research. Vol. 30, pp: 335-339.
16. Erlanger, B.F.; Kokowski, N. and Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archive Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, pp: 271-278.
- مشابه این نتایج در پژوهش صورت گرفته بر روی ماهی رو هو با استفاده از 0/02 درصد تریپسین به دست آمد (Kumari و همکاران، 2013). Lin و همکاران (2007) نیز گزارش کردند استفاده از مولتی آنزیم حاوی پروتئاز طبیعی در جیره تیلابیا باعث افزایش فعالیت پروتئاز روده و پانکراس می شود، اما در مطالعه Chen و همکاران (2009) بر روی کپور سیاه (با استفاده از پروتئاز طبیعی) در فعالیت پروتئاز روده تغییری گزارش نشد و فقط فعالیت پروتئازی هپاتوپانکراس در تیمار 1 درصد افزایش یافت. استفاده از پروتئاز AG در جیره های حاوی 6 و 10 درصد آرد ماهی فعالیت پروتئازهای ماهی کپور معمولی را افزایش داد (Leng و همکاران، 2008). در بررسی Li و همکاران (2015) استفاده از آنزیم AG در جیره های حاوی پودر ماهی کم، فعالیت پروتئاز پانکراس میگو پاسفید غربی را افزایش داد و به سطح جیره های با پودر ماهی زیاد رساند، اما در فعالیت پروتئاز روده تغییری مشاهده نشد. در مطالعه Song و همکاران (2016) نیز فعالیت تریپسین در هپاتوپانکراس میگو پاسفید غربی با افزایش سطح آنزیم پروتئاز باکتریایی در جیره های حاوی پودر ماهی کم، افزایش یافت، اما این افزایش کمتر از جیره حاوی پودر ماهی زیاد بود. نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد استفاده از مکمل پروتئازی در جیره آبزیان می تواند سبب افزایش فعالیت پروتئازهای آنها شود، نتایجی که در مطالعه حاضر نیز مشاهد گردید.
- به طور کلی پژوهش حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره غذایی فیل ماهی کارایی جیره را افزایش می دهد و سبب بهبود فاکتورهای رشد می شود، مطالعه حاضر استفاده از غلظت 0/02 درصد تریپسین در جیره فیل ماهی را توصیه می کند، هر چند ممکن است استفاده از مقادیر بالاتر این آنزیم و یا روش های به کارگیری دیگر دارای تاثیرات بهتری باشند اما تایید آن نیازمند پژوهش های تکمیلی خواهد بود. از سوی دیگر استفاده از تریپسین به بقای ماهیان لطمه ای وارد نکرد و اثرات جانبی در بر نداشت. انجام مطالعات بیشتر در زمینه ایمن بودن این آنزیم برای فیل ماهی در آینده می تواند صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت و پرسنل مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان به خصوص جناب مهندس میقانی ریاست مجتمع، جناب مهندس شهریار و جناب مهندس مخدومی به جهت همکاری و مساعدت در مراحل مختلف انجام این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

1. افشارمازندان، ن.، 1381. راهنمای عملی تغذیه و نهاده های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. انتشارات نوربخش. 216 صفحه.
2. حسینی فرد، س.م.؛ قبادی، ش.؛ خداخش، ا. و رازقی منصور، م.، 1392. تاثیر جیره های حاوی سطوح مختلف آرد سویا همراه با مکمل آنزیمی اویزایم بر شاخص های هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلاي رنگین کمان. مجله دامپزشکی ایران. دوره 9، شماره 3، صفحات 43 تا 54.

- production through aquaculture. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 67, pp: 117-124.
32. **Tacon, A.G.J., 1990.** Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Washington DC, Argent Laboratories press. 454 P.
 33. **Vielma, J.; Makinen, T.; Ekholm, P. and Koskela, J., 2000.** Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. Aquaculture. Vol. 183, pp: 349-362.
 34. **Zamini, A.A.; Kanani, H.G.; Esmaceli, A.A.; Ramezani, S. and Zoriezahra, S.J., 2014.** Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). Comparative Clinical Pathology. Vol. 23, pp: 187-192.
 17. **Farhangi, M. and Carter, C.G., 2007.** Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 1274-1282.
 18. **Furne, M.; Garcia-Gallego, M.; Hidalgo, M.C.; Morales, A.E.; Domezain, A.; Domezain, J. and Sanz, A., 2008.** Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 149, pp: 420-425.
 19. **Ghomi, M.R.; Shahriari, R.; Langroudi, H.F.; Nikoo, M. and von Elert, E., 2012.** Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. Aquaculture International. Vol. 20, pp: 249-254.
 20. **Kolkovski, S., Tandler, A. and Izquierdo, M., 1997.** Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. 148, pp: 313-322.
 21. **Kumari, R.; Gupta, S.; Singh, A.R.; Ferosekhan, S.; Kothari, D.C.; Kumar, P.A. and Jadhao, S.B., 2013.** Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-Like enzyme in fish gastrointestinal tract. Plos One. Vol. 8, No. 9, pp: 1-12.
 22. **Leng, X.; Liu, D.; Li, X. and Lu, Y., 2008.** Effects of adding Protease AG on growth and digestive protease activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. Chinese Journal of Animal Nutrition. Vol. 20, No. 3, pp: 1-7.
 23. **Li, X.; Chai, X.; Liu, D.; Chowdhury, K. and Leng, X., 2015.** Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture Nutrition. Vol. 21, No. 4, pp: 1-10.
 24. **Lin, S.; Mai, K. and Tan, B., 2007.** Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 1645-1653.
 25. **Ogunkoya, A.E.; Page, G.I.; Adewolu, M.A. and Bureau, D.P., 2006.** Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 254 pp: 466-475.
 26. **Patil, D. and Singh, H., 2013.** Effect of papain supplemented diet on growth and survival of post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. Vol. 1, No. 6, pp: 176-179.
 27. **Ross, L.G. and Ross, B., 2008.** Anaesthesia and Sedation of Aquatic Animals. 3rd ed. Oxford, Blackwell Science. 236 P.
 28. **Shi, Z.; Li, X.Q.; Chowdhury, M.K.; Chen, J.N. and Leng, X.J., 2016.** Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Aquaculture. Vol. 460, pp: 37-44.
 29. **Singh, P.; Maqsood, S.; Samoon, M.H.; Phulia, V.; Danish, M. and Singh-Chalal, R., 2011.** Exogenous supplementation of papain as growth promoter in diet of fingerlings of *Cyprinus carpio*. International Aquatic Research. Vol. 3, pp: 1-9.
 30. **Song, H.L.; Tan, B.P.; Chi, S.Y.; Liu, Y.; Chowdhury, M. and Dong, X.H., 2016.** The effects of a dietary protease-complex on performance, digestive and immune enzyme activity, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* fed high plant protein diets. Aquaculture Research. Vol. 47, No. 5, pp: 1-11.
 31. **Subasinghe, R.P., 2005.** Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic

