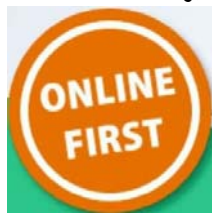


## آنتوزنی تغییرات آنزیم‌های گوارشی ماهی شاه کولی (*Alburnus chalcoides*)

مسرور ذاکری نسب<sup>۱</sup>، شهلا جمیلی<sup>۲\*</sup>، سید محمدرضا فاطمی<sup>۱</sup>، علی ماشینچیان مرادی<sup>۱</sup>، احسان رضانی فرد<sup>۱</sup>، علیرضا ولی پور<sup>۳</sup>، وجیهه خلیلی<sup>۴</sup>، شهلا امری<sup>۴</sup>، رضا خمیرانی<sup>۵</sup> و محمود رامین<sup>۲</sup>



<sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، گروه بیولوژی دریا

<sup>۲</sup> ایران، تهران، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، سازمان تحقیقات، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

<sup>۳</sup> ایران، بندر انزلی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی بندر انزلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبی‌پروری

آبهای داخلی

<sup>۴</sup> ایران، تهران، آزمایشگاه پزشکی مهر زعفرانیه

<sup>۵</sup> ایران، رشت، مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۰

### چکیده

ماهی شاه کولی (*Alburnus chalcoides*) از ماهیان استخوانی دریای خزر است. نمونه‌برداری از این ماهی به صورت تصادفی در روزهای ۱ تا ۵ و روزهای ۷، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ بعد از تفریح، پیش بلوغ و ماهی بالغ انجام شد. آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه در این ماهی شامل آنزیم‌های پانکراسی (تریپسین، کموتریپسین، لیپاز، آمیلاز) و آنزیم‌های روده‌ای شامل (فسفاتاز قلیایی و N-آمینوپپتیداز) می‌باشد. در طی رشد ماهی آنزیم تریپسین، کموتریپسین و N-آمینوپپتیداز دارای روند افزایشی بوده که ناشی از نوع رژیم غذایی حاوی پروتئین بالا می‌باشد. آنزیم فسفاتاز نیز تا یک‌ماهگی روند افزایشی داشته و سپس تحت تأثیر pH محیط ثابت شده است. آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز دارای پیک کاهشی افزایشی بوده که نشان می‌دهد رژیم غذایی ماهی کمتر دارای ترکیبات قندی و چربی بوده است. اختلاف معنی‌داری برای تمام آنزیم‌ها ( $P \leq 0.05$ ) بوده که شروع اختلاف معنی‌داری برای تریپسین و کموتریپسین از روز سوم، آنزیم لیپاز روز دوم، آنزیم آمیلاز روز هفتم و فسفاتاز قلیایی و N-آمینوپپتیداز از روز پنجم بوده است. تمام آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه در این ماهی نیز در روز شروع تغذیه فعال دارای پیک افزایشی بوده است.

واژه‌های کلیدی: ماهی شاه کولی، آنزیم‌های گوارشی، مراحل رشد، دریای خزر

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۹۱۳۰۹۴۵۵، پست الکترونیکی: shahlajamili45@yahoo.com

### مقدمه

باشد. همچنین فرآیند گوارش در ماهیان در ارتباط با الگوهای تکاملی ریخت‌شناسی سیستم گوارشی است و به جیره‌های غذایی و تغییر احتیاجات غذایی وابسته است. از مباحث مهم در مورد تغذیه توجه به ویژگی‌های فیزیولوژیک است که از سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترشحات آن در زمان شروع تغذیه فعال باید مطلع بود که

ماهی شاه کولی بانام علمی (*Alburnus chalcoides* Gueldenstaedt, 1772) متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است که اهمیت ویژه‌ای از لحاظ بیولوژی، اکولوژی و اقتصادی دارد (۴). مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهیان می‌تواند برخی از جنبه‌های فیزیولوژی تغذیه را روشن کند و در رفع مشکلات تغذیه‌ای مؤثر

رشد ماهی می‌تواند بسیاری از مشکلات تغذیه‌ای در گوارش ماهی را حل نماید.

### مواد و روشها

نمونه‌برداری از این ماهی به صورت تصادفی در روزهای ۱ تا ۵ و روزهای ۷، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ بعد از تفریح و مراحل پیش بلوغ و بلوغ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت انجام شد. تخم‌کشی از ماهیان بالغ مرکز انجام شد و سپس تخم‌ها در همزن مکانیکی ریخته شده و بعد از ۸ ساعت به داخل مخزن ویس و سپس بعد از دو روز که لاروها از تخم خارج شدند به داخل مخزن تراف ریخته شدند. سپس بعد از گذشت ۳ تا ۴ روز که لاروها توانایی شنای عمودی به سطح آب را پیدا کردند، نمونه‌های مورد مطالعه تا یک‌ماهگی داخل قفسهای چوبی داخل استخر بوده و بعد از یک‌ماهگی وارد استخر شدند. نمونه‌برداری بعد از خوردن غذا و سپس بعد از تخلیه روده انجام شده است و زمان نمونه‌برداری مرتبط با غذایی که نمونه مصرف می‌کرده، یکسان بوده است.

**سنجش آنزیم‌ها و تهیه عصاره آنزیمی:** (تهیه عصاره آنزیمی برای آنزیم‌های پانکراسی): ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت با ۵ میلی‌لیتر محلول حاوی Tris-HCl (۱۰۰ میلی مولار)، Triton X-100 (۰/۱ درصد) و EDTA (۰/۱) میلی مولار با  $\text{pH} = 7/8$  به مدت ۱ دقیقه در ۴ دقیقه سانتی‌گراد با دور ۳۰۰۰g سانتی‌فیوژ شده و محلول بالایی (سوپرناتانت) برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی جدا شد (۱۱). اسپکتروفتومتر در این مطالعه Unic-UV-2100 Spectrophotometer می‌باشد.

**آنزیم‌های پانکراسی:** سنجش فعالیت آنزیم تریپسین: در این روش از BAPNA (Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilide) به‌عنوان سوبسترا برای اندازه‌گیری فعالیت تریپسین استفاده شد. در  $\text{pH} = 7/5$  برای انجام کار ۳۰

توجه به نقش آنها در مورد تغذیه می‌تواند در کاهش مرگ‌ومیر مؤثر باشد (۲۳). در این ماهی به علت فقدان ساختار معده حقیقی و ترشح نشدن پپسین، گوارش و هضم غذا بیشتر متکی به آنزیم‌های پانکراسی و روده‌ای است (۱). شروع تغذیه فعال در لارو ماهیان با غذای زنده از قبیل جلبک‌ها، روتیفر و ناپلی آرتمیا صورت می‌گیرد. اگرچه غذای زنده به علت ارزش غذایی بالا می‌تواند تأثیر بسزایی روی رشد، بقا و سلامتی لارو داشته باشد، اما به علت هزینه بالای تولید و تجهیزات آزمایشگاهی مطالعات بسیار زیادی برای تولید micro diets (غذای خشک)، در تغذیه لارو ماهیان به هنگام شروع تغذیه فعال، در حال انجام است. از آنجایی‌که بیشترین ماده مغذی تشکیل‌دهنده این ارگانایسم‌ها پروتئین است، بنابراین قابلیت هضم پروتئین برای لاروها در مراحل اولیه رشد و تکوین لارو از اهمیت بسیاری برخوردار است (۹). از مراحل مهم پرورش ماهیان، مرحله تفریح تا جذب کامل کیسه زرده در لارو می‌باشد که شروع تغذیه فعال نیز در این خصوص دارای اهمیت است (۱۲). ذخیره کیسه زرده و حتی جذب در ماهیان مختلف متفاوت است بنابراین زمان شروع غذادهی نیز باتوجه به این مسئله می‌تواند متفاوت باشد (۲۵). بررسی آنزیم‌های گوارشی یک مسئله مهم در مورد مکانیسم عمل گوارش است و این‌ها نقش مهمی را در هضم مواد غذایی بر عهده‌دارند و شناخت و آگاهی در مورد سطح فعالیتشان در فهم قدرت هضمی و دخالتشان در این مسیر دارای اهمیت است. همچنین بررسی این فعالیت می‌تواند در تهیه و انتخاب نوع مواد غذایی مناسب برای جانور تأثیر داشته باشد که این مسئله در گونه‌های پرورشی حائز اهمیت است (۱۹). هدف از این مطالعه، بررسی آنزیم‌های گوارشی در ماهی شاه کولی بوده است. آنزیم‌های گوارشی نقش مهمی در رشد ماهی داشته و این آنزیم‌ها متأثر از غذای ماهی، شروع تغذیه فعال و خصوصیات فیزیولوژیکی در گونه ماهی می‌باشد. بررسی سطح آنزیم‌ها و بررسی میزان افزایش یا کاهش آنها در طی

تحت تأثیر آنزیم هیدرولیز شده و در محیط قلیایی نیترو آنیلید که زرد رنگ است ایجاد می‌شود (۱۰). بلانک حاوی محتویات نمونه است با این تفاوت که عصاره آنزیمی در آخرین مرحله به آن اضافه می‌شود. فعالیت این آنزیم به روش زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{میزان فعالیت آنزیم (u/mg-protein)} = \frac{\text{حجم محلول کووت (ml)} \times 1000 \times \text{جذب نوری در } 410 \text{ نانومتر}}{\text{مقدار پروتئین (mg)} \times \text{زمان انکوبه (دقیقه)} \times 8800}$$

سنجش فعالیت آنزیم لیباز: برای سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم لیباز از سوبسترای p-nitrophenyl myristate به همراه متوکسی اتانول (۰/۲۵ میلی مولار)، sodium cholate (۵ میلی مولار) و Tris-HCL (۰/۲۵ مولار) با pH= ۹ به صورت سوبسترا- بافر مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای انجام کار، ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترا- بافر اضافه شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه انکوبه شده و سپس به منظور توقف واکنش ۰/۷ میلی‌لیتر از محلول acetone/n-heptane به آن اضافه شده و کاملاً مخلوط گشته و به مدت ۲ دقیقه در دور (7000 g) سانتریفیوژ می‌شود. مایع بالایی (حلال آلی) خارج می‌شود و جذب نوری مایع زیرین (آبی) در طول موج ۴۰۵ خوانده می‌شود. برای تهیه بلانک مانند نمونه عمل کرده باین تفاوت که عصاره آنزیمی بعد از افزودن Acetone/n-heptane به لوله افزوده می‌شود (۱۶). فرمول محاسبه آنزیم به شرح زیر است:

$$\text{میزان فعالیت آنزیم (u/mg-protein)} = \frac{\text{حجم محلول کووت (ml)} \times 1000 \times \text{جذب نوری در } 405}{\text{مقدار پروتئین (mg)} \times \text{زمان انکوبه } \times 16500}$$

مالتوز یک سری رقت به صورت (serial Dilution) شامل رقت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۴ میکرومول در میلی‌لیتر تهیه می‌شود. به تمام لوله‌های حاوی این رقت‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید اضافه می‌شود. رنگ محلول با افزایش میزان مالتوز نسبت مستقیم دارد که جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ nm قرائت می‌شود. با استفاده از جذب‌های نوری بدست آمده در رقت‌های متفاوت منحنی استاندارد رسم می‌شود که در محور X غلظت مالتوز

میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترای تازه، مخلوط شده و ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک به منظور توقف واکنش به آن اضافه گردید. جذب نوری مخلوط حاصل، در طول موج ۴۱۰ قرائت شد. سوبسترا

ضریب خاموشی پارا- نیتروانیلین = ۸۸۰۰، حجم کووت = ۰/۶ میلی‌لیتر و در تمام سنجش‌ها زمان انکوبه = ۱۰ دقیقه می‌باشد.

سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین: در این سنجش از سوبسترای SAAPNAnitroanilide-HCL)N-Succinyl-(AlaAla-Pro-phe-p) استفاده شد. برای تهیه محلول سوبسترا- بافر ۰/۷۹ گرم Tris و ۰/۳۴ گرم کلرید کلسیم به حجم کمتر از ۱۰۰ میلی‌متر تنظیم می‌شود و تقریباً ۰/۰۰۶ گرم از SAAPNA به این بافر اضافه شده و حجم نهایی به ۱۰۰ تنظیم شد و pH این محلول با pH متر کنترل بشود و به ۸/۵ برسد. ۸۵۵ میکرولیتر از محلول سوبسترا را در یک لوله آزمایش تمیز اضافه شد. ۱۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه شد (دما=۲۵ درجه سانتی‌گراد). بعد از ۱۰ دقیقه انکوبه کردن در ۳۷ درجه جذب نوری آن در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت می‌شود (۱۰) برای محاسبه از همان فرمول تریپسین استفاده می‌شود.

سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز: نشاسته سوبسترای اصلی این آنزیم است که تحت تأثیر آن تولید دی‌ساکارید مالتوز را می‌کند و براساس کلریمتری در مجاورت DNS (دی نیترو سالیسیلیک اسید) شدت رنگ سنجیده می‌شود. در این سنجش از روش برن فیلد (۱۹۵۱) از مواد و معرف‌های زیر استفاده می‌شود.

معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید، بافر Tris، نشاسته ادرصد، محلول استوک مالتوز: با استفاده از محلول استوک

و در محور Y جذب نوری بدست آمده قرار دارد. فرمول

فاکتور رقت  $\times$  مقدار مالتوز آزاد شده (میکرو مول)

مقدار پروتئین (mg)  $\times$  زمان انکوبه

$$u/mg\text{-protein} = \frac{\text{میزان فعالیت آنزیم}}{\text{مقدار پروتئین}}$$

فعالیت آنزیم باتوجه به مقدار پروتئین برحسب u/mg-protein بیان می‌گردد (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از (Anova-one-awey) آنالیز واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. همچنین برای بررسی سطح معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین: این آنزیم پانکراسی به‌طور کلی یک‌روند افزایشی داشته و اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) از روز سوم شروع شده است. احتمالاً این مسئله به رژیم غذایی ماهی برمی‌گردد که یک رژیم غذایی پرپروتئین بوده است. این آنزیم تقریباً از روز ۵۰ ثابت شده است (نمودار-۱).

فعالیت اختصاصی آنزیم آلفا- آمیلاز: فعالیت آمیلاز دارای یک پیک افزایشی- کاهشی بوده و اختلاف معناداری ( $P \leq 0.05$ ) این آنزیم از روز هفتم شروع می‌شود. در این مدت‌زمان از روز ۱ تا حدوداً روز دهم لارو از ذخیره کیسه زرده خود استفاده کرده که دارای کربوهیدرات زیاد می‌باشد. این آنزیم تقریباً از روز ۵۰ به بعد ثابت می‌شود (نمودار-۲).

فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز: این آنزیم دارای یک پیک کاهشی- افزایشی به سمت کاهشی می‌باشد که از روز دهم به بعد کاملاً کاهش یافته است. احتمالاً این مسئله به دلیل جذب کامل کیسه زرده در این روز می‌باشد. اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) در این آنزیم از روز دوم مشخص شده است. این آنزیم تقریباً از روز ۴۰ ثابت شده است (نمودار-۳).

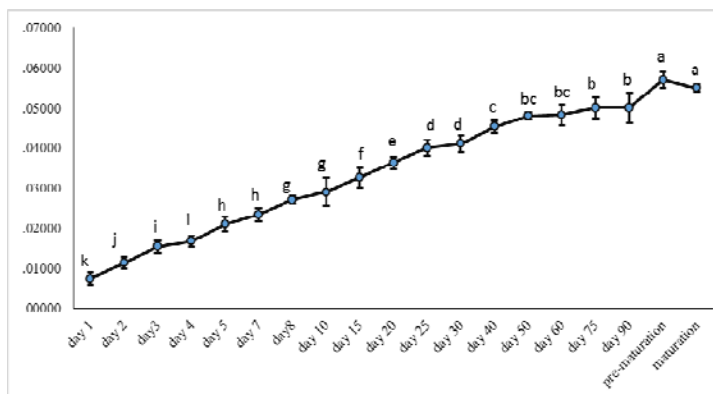
**تهیه عصاره آنزیمی و سنجش آنزیم‌های روده‌ای:** فسفاتاز قلیایی یا ALP: در استخراج آنزیم آلکالن فسفاتاز از بافر سرد مانیتول (۵۰ میلی مولار) و Tris-Hcl (2mM) با  $\text{pH} = 7$  استفاده می‌شود. در این سنجش از کیت زیست‌شیمی استفاده شد (۳۰). روش اندازه‌گیری به صورت Endpoint می‌باشد. براساس این مکانیسم آنزیم در مجاورت یک محلول سوپسترا به نام p-Nitrophenylphosphate بافر Diethanolamine (DEA) می‌تواند سوپسترا را هیدرولیز کند و محصول زرد رنگ به نام p-Nitrophenol را ایجاد و تولید کند که جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در این واکنش یون منیزیم به آنزیم کمک می‌کند. روش کار برای این آنزیم به شرح زیر است: ۲۵۰ میکرولیتر بلانک و ۲۵۰ میکرولیتر سرم به‌عنوان سوپسترا و بافر در نظر گرفته می‌شود که باید ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شود. سپس ۱۰ میکرولیتر سرم نمونه اضافه شده و بعد از مخلوط کردن ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه می‌شود و سپس ۵ میلی‌لیتر سود ۱ گرم در لیتر، بعد از مخلوط کردن جذب نوری نمونه‌ها در مقابل آب مقطر در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده می‌شود.

روش محاسبه و فرمول این آنزیم به شرح زیر است:

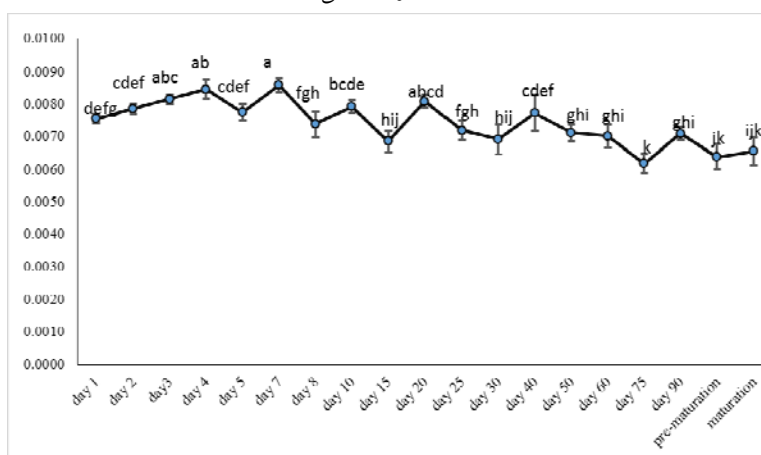
$$\Delta A = \text{Abs Sample} - \text{Abs Blank}$$

$$\text{ALP (U/L)} = \Delta A \times 1000$$

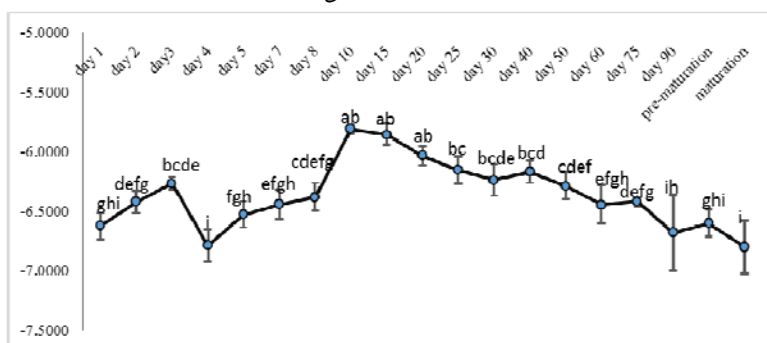
سنجش آنزیم N- آمینوپپتیداز: برای سنجش این آنزیم از محلول ۳ میلی مولار L-Leucine P-Nitroanilid به‌عنوان سوپسترا استفاده می‌شود. ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به  $980 \mu\text{m}$  از سوپسترا اضافه می‌شود. اثر آنزیم بر سوپسترا با تولید nitroaniline و افزایش جذب نوری در طول موج ۴۰۵nm همراه است. تغییرات جذب نوری در طی ۵ دقیقه (هر ۳۰ ثانیه) در برابر بلانک قرائت می‌شود و



نمودار ۱- فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین (u/mg protein)، میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<0/05) را نشان می‌دهد



نمودار ۲- فعالیت اختصاصی آنزیم آلفا- آمیلاز (u/mg protein)، میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<0/05) را نشان می‌دهد

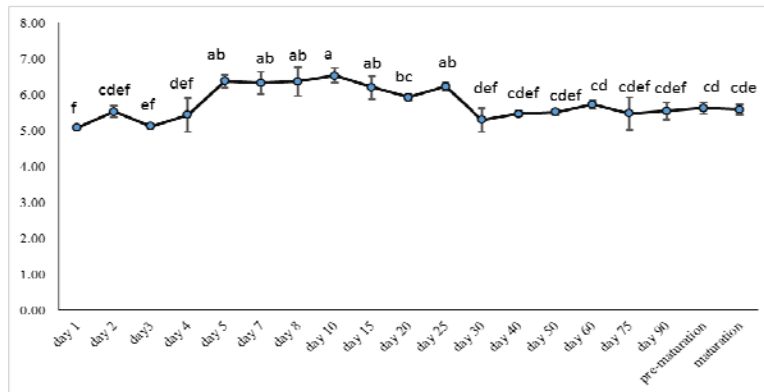


نمودار ۳- فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (u/mg protein)، میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<0/05) را نشان می‌دهد

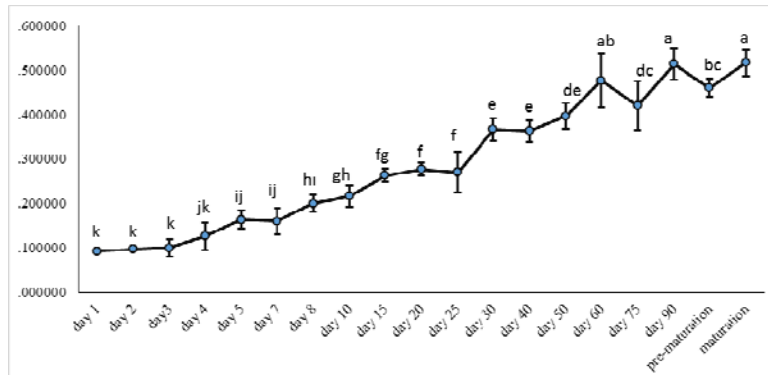
فعالیت اختصاصی آنزیم N- آمینوپپتیداز: آنزیم آمینوپپتیداز روده‌ای دارای روند افزایشی بوده و اختلاف معنی‌داری (P<0/05) این آنزیم از روز پنجم می‌باشد. این آنزیم از روز ۴۰ ثابت شده است (نمودار-۵).

فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلیایی: فسفاتاز قلیایی که یک آنزیم روده‌ای می‌باشد در طول رشد تغییرات چندان بارزی نداشته است. اختلاف معنی‌داری (P<0/05) این آنزیم از روز پنجم می‌باشد. این آنزیم حدوداً از روز ۴۰ ثابت شده است (نمودار ۴).

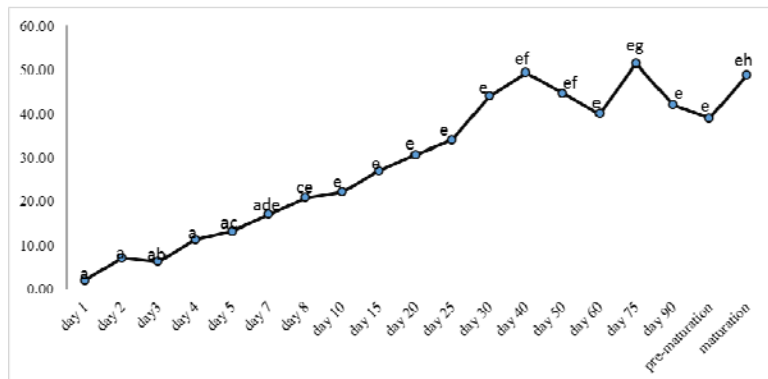
فعالیت اختصاصی آنزیم کموتریپسین: آنزیم کموتریپسین از روز سوم دارای اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد. این ثابت شده است. آنزیم تا روز ۴۰ روند افزایشی داشته و از آن به بعد تقریباً ثابت شده است.



نمودار ۴- فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلبیایی (u/mg protein)، میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح ( $P < 0.05$ ) را نشان می‌دهد



نمودار ۵- فعالیت اختصاصی آنزیم آمینوپپتیداز (u/mg protein)، میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح ( $P < 0.05$ ) را نشان می‌دهد



نمودار ۶- فعالیت اختصاصی آنزیم کموتریپسین (u/mg protein)، میانگین رتبه (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح ( $P < 0.05$ ) را نشان می‌دهد

بنابراین فرآیند هضم در سیستم گوارش انجام شده و در طی انجام آن آنزیم‌های گوارشی به‌عنوان مهمترین عامل دارای اهمیت می‌باشند. هضم پروتئین یک فرآیند مهم و

## بحث

مجرای گوارشی نقش مهمی در هضم و جذب مواد غذایی داشته و در نتیجه بر روی رشد جانور تأثیر دارد (۱).

روده)، از جمله فسفاتاز قلیایی و N-آمینوپپتیداز در شاه کولی، در روز شروع تغذیه فعال در روز پنجم و روز هشتم همزمان با شروع تغذیه پلت یک پیک افزایشی دیده شد. شروع اختلاف معنی‌دار برای این دو آنزیم نیز از روز پنجم است. در مورد فسفاتاز قلیایی می‌توان گفت که این آنزیم در شرایط قلیایی فعالیت بهتری داشته و با تغییر pH محیط ممکن است ثابت و یا غیرفعال شود. با توجه به اینکه شاه کولی از یک ماهگی به بعد از داخل قفس به استخر منتقل شده ممکن است تحت تأثیر این تغییر، این آنزیم تقریباً از این روز به بعد روند ثابتی پیدا کرده است. آنزیم N-آمینوپپتیداز به دلیل استفاده ماهی از پروتئین بالا و افزایش فعالیت روده و افزایش سرعت هضم و جذب، تا بلوغ روند افزایشی را نشان می‌دهد. پیک افزایشی در مورد این دو آنزیم همزمان با شروع تغذیه فعال در ماهیان دیگر نیز گزارش شده است. برای مثال در ماهی *Scophthalmus maximus* (۲۶)، *Sciaenops ocellatus* (۲۰) و در ماهی *Diplodus puntazzo* (۲۹) با شروع غذادهی در روز پنجم بعد از تفریح نیز این افزایش دیده می‌شود. در ماهی شاه کولی آنزیم لپاز در روز دهم (جذب کامل کیسه زرده) به شدت افزایش یافته اما از این روز به بعد تقریباً یک‌روند کاهشی داشته است. در این آنزیم نیز همزمان با شروع تغذیه فعال (روز پنجم) و شروع تغذیه پلت و تکمیل پانکراس (روز هشتم) یک پیک افزایشی دیده می‌شود. افزایش لپاز در روز شروع تغذیه فعال در تاسماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) در روز ۱۴ تا ۱۸ (۱۳)، *Diplodus sargus* با شروع غذادهی در روز ۵ بعد از تفریح (۲۹) و *Acipenser baeri* (۱۴) نیز گزارش شده است. همچنین افزایش این آنزیم در روز تکمیل شدن پانکراس نیز در ماهی *Solea senegalensis* در روز دهم گزارش شده است. در مورد آنزیم آمیلاز در روز شروع تغذیه فعال (روز ۵) کاهش دیده می‌شود که احتمال می‌رود غذایی که لارو استفاده کرده کمتر دارای ترکیبات قندی بوده است. در خصوص این مساله و تأثیر رژیم غذایی بر

پیچیده است که پروتئازها نقش اساسی را در عملیات هضمی بر عهده دارند. بیشترین هضم آنزیمی مواد غذایی در روده انجام می‌شود که این آنزیمها می‌توانند از پانکراس (هپاتوپانکراس) و یا سلولهای روده‌ای (آنتروسیست) ترشح شوند (۱۷). هپاتوپانکراس، وظایفی شبیه کبد و پانکراس را دارد (۲). تریپسین، تحت تأثیر آنزیم آنتروکیناز که از سلولهای روده ترشح می‌شود فعالیتش را آغاز می‌کند (۱۸). آنزیمهای پانکراسی ترشح خود را همزمان با شروع تغذیه فعال آغاز می‌کنند (۷). میزان ترشح این آنزیمها اکثراً با زیاد شدن سن، افزایش می‌یابد (۳۱). اپیتلیوم روده در نهایت مسئول هضم ترکیبات پپتیدی است. با افزایش سن ماهی و با بلوغ سلولهای روده، کم‌کم ترشح فعالیت آنزیمهای فسفاتاز قلیایی و N-آمینوپپتیداز افزایش می‌یابد. در ماهی شاه کولی آنزیم تریپسین دارای روند افزایشی بوده اختلاف معنی‌داری برای این ماهی از روز سوم بعد از تخم‌گذاری است. در مورد این آنزیم یک پیک افزایشی در روز پنجم که روز شروع تغذیه فعال (خارجی) می‌باشد، دیده شد. همچنین در روز هشتم همزمان با شروع تغذیه پلت (دستی) یک پیک افزایشی دیگر در نمودار دیده می‌شود. همچنین این روند افزایشی در کموتریپسین نیز کاملاً مشهود است که در روز پنجم همزمان با شروع تغذیه فعال و روز هشتم همزمان با تغذیه پلت دیده می‌شود. در واقع این پیک افزایشی در مورد این دو آنزیم به رژیم غذایی پر پروتئین شاه کولی برمی‌گردد که بیشتر از پلانکتونها مخصوصاً زئوپلانکتون تغذیه می‌کند و غذاهای پلت حاوی پروتئین را ترجیح می‌دهد. این ماهی یک ماهی پرخور است (۳). افزایش این دو آنزیم همزمان با شروع تغذیه فعال در ماهیان دیگر از جمله ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (۵)، ماهی *Scophthalmus maximus* (۲۶)، تاسماهی سبیری یا *Acipenser baeri* (۱۴)، ماهی *Sciaenops ocellatus* (۲۰)، ماهی *Catla catla* (۲۴) و *Pseudosciaena crocea* (۲۱) نیز گزارش شده است. در مورد آنزیمهای غشایی روده یا در حاشیه (نوار مساواکی

(۸). به‌علاوه تکثیر سلولهای اپیتلیالی دستگاه گوارش تحریک می‌شود (۱۵).

### نتیجه‌گیری

باتوجه به نیاز روزافزون آبزیان به غذا و همچنین بحث پرورش آنها توجه به امر گوارش و تغذیه در این موجودات امری انکارناپذیر است بنابراین می‌توان با مدیریت و برنامه‌ریزی صحیح در این خصوص آبزیانی سالم‌تر و باکیفیت بالاتری تولید نمود. آنزیم‌های گوارشی متأثر از غذای ماهی، شروع تغذیه فعال و خصوصیات فیزیولوژیکی در گونه ماهی می‌باشد که نقش مهمی در رشد ماهی دارد. بررسی میزان افزایش یا کاهش آنزیمها در ماهی مخصوصاً در طی رشد، می‌تواند بسیاری از مشکلات تغذیه‌ای در گوارش ماهی را حل نماید.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پرسنل محترم مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی شهید انصاری رشت که ما را در انجام این مطالعه همراهی نموده‌اند صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

روی آمیلاز، در مطالعه‌ای بر روی لاروهای Croaker دیده‌شده که استفاده از روتیفر در شروع تغذیه باعث افزایش آنزیم آمیلاز شده، درحالی‌که استفاده از کوبه پودا باعث کاهش فعالیت این آنزیم شده است (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بر روی کپور نقره‌ای و کپور سر گنده نیز گزارش شده که استفاده از روتیفر باعث افزایش آنزیم آمیلاز می‌شود. مساله مهم در مورد افزایش و یا کاهش آنزیمها، مسئله رژیم غذایی ماهی است زیرا تغییرات غذا می‌تواند بر روند افت‌وخیز آنزیمها مؤثر باشند (۲۸). در ماهی شاه کولی به دلیل استفاده مقدار بالای پروتئین غذایی آنزیم‌های وابسته به آن طبیعتاً افزایش بیشتری داشته ولی روند آنزیم‌های مرتبط با قند و چربی دارای افت‌وخیز بوده است. مواد غذایی پروتئینی بر روی روده اثر کرده و در نتیجه سرعت هضم، جذب و مصرف مواد غذایی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۲۹). در واقع اتفاقی که می‌افتد این است که استفاده از این مواد غذایی باعث طول‌تر شدن ریز پرزهای (Vili) روده شده و این افزایش طول، منجر به افزایش سطح روده و نهایتاً باعث افزایش جذب می‌شود

### منابع

- ۱- اسدی، ط.، و قارزی، ا.، ۱۳۹۴. مطالعه بافت‌شناسی و هیستوشیمی لوله گوارشی ماهی زرده (*Capoeta damascina*). مجله پژوهش‌های جانوری (زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۸، شماره ۴، صفحات ۳۸۹-۳۹۸.
- ۲- پیراسته، ا.، سلیمی، ب.، و سلیمی ناغانی، ا.، ۱۳۹۷. مطالعه هیستولوژیکی و هیستوشیمیایی هپاتوپانکراس شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*). مجله پژوهش‌های جانوری (زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۱، شماره ۱، صفحات ۱-۱۰.
- ۳- رجبی نژاد، ر.، و آذری تاکامی، ق.، ۱۳۸۸. بررسی عادات غذایی ماهی شاه کولی (*Chalcalburnus*) Guldenstadt, 1772.
- ۴- عمادی، ح.، کیایی، ب.، عبدلی، ا.، و نادری، م.، ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر، انتشارات علمی آبزیان، تهران، ۲۳۷ صفحه.
- ۵- یعقوبی، م.، مجازی امیری، ب.، نعمت‌اللهی، م.، و یلقی، س.، ۱۳۹۳. بافت‌شناسی تکامل دستگاه گوارش لاروماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) دریای خزر، شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)، جلد ۶۷، شماره ۴، صفحات ۶۲۵-۶۳۹.
- 6- Bernfeld, P., 1951. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . In: Colowick, P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, PP: 149-157.
- 7- Cara, J. B., Moyano, F. J., Cardenas, S., Fernandez-Diaz, C., and Yufera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream, *Fish biology*. 63, PP: 48-58.



- 8- Caspary, W. F., 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55, PP: 299S-308S.
- 9- Chakrabarti, R., Rathore, R. M., Mittal, P., and Kumar, S., 2006. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp and bighead carp hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture*, 253, PP: 694-702.
- 10- Erlanger, B. F., Kokowski, N., and Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, PP: 271-278.
- 11- Furne, M., Hidalgo, M. C., Lopez, A., Garcia-Gallego, M., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, J., and Sanz, A., 2005. Digestive enzymes activities in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a comparative study, *Aquaculture* 250, PP: 391-398.
- 12- Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M. H., Ross, N., Opstad, I., and Torrissen, O. J., 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184, PP: 303-314.
- 13- Gisbert, E., and Doroshov, S. I., 2003. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*), *Aquatic Living Resources*. 16 (2), PP: 77-89.
- 14- Gisbert, E., Rodriguez, A., Castello, F., and Williot, P., 1998. A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. *Aquaculture*, Vol 167, PP: 195-209.
- 15- Ichikawa, H., Kuroiwa, T., Inagaki, A., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S., and Sakata, T., 1999. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 44, PP: 2119-2123.
- 16- Iijima, N., Tanaka, S., and Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*), *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*. 18, PP: 59-69.
- 17- Jobling, M., 1995. Digestion and absorption. In: Jobling, M. (Ed), *Environmental biology of fishes*, Chapter 6. Chapman & Hall, London England, PP: 175-210.
- 18- Kuzmina, V. V., Shekovtsova, N., and Bolobonina, V., 2010. Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. *Biology Bulletin*. Vol: 37, PP: 605-611.
- 19- Kuzmina, V. V., and Skvortsova, E. G., 2001. Activity of proteolytic enzymes of potential prey of predatory fish influence of natural and anthropogenic factors. *Journal of Ichthyology*, Vol: 41(3), PP: 246-254.
- 20- Lazo, J. P., Mendoza, R., Holt, G. J., Aguilera, C., and Arnold, C. R., 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*), *Aquaculture* 265, PP: 194-205.
- 21- Ma, H., Cahu, C., Zambonino, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M. M., and Mai, K., 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 245, PP: 239-248.
- 22- Prescott, J. M., and Wilkes, S. H., 1976. *Methods in Enzymology*, Vol. XLV, Part B, PP: 530-543.
- 23- Ragyanski, M., 1980. Preliminary investigation on the proteolytic digestive enzymes of carp fry. *Aquaculture Hung*. Vol: 2, PP: 27-30.
- 24- Rathore, R. M., Kumar S., and Chakrabarti, R., 2005. Digestive enzyme profile of *Cyprinus carpio* during ontogenetic development. *World Aquac*. Vol 36, PP: 37-41.
- 25- Ronnestad, I., Koven, W. M., Tandler, A., Harel, M., and Fyhn, H. J., 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 162, PP: 157-170.
- 26- Segner, H., Roesch, R., Kloas, W., and Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*, Vol: 119, PP: 471 - 486.
- 27- Shan, X. J., Huang, W., Cao, L., Xiao, Z. Z., and Dou, S. Z., 2009. Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miuy croaker *Miichthys miuy* larvae, *Journal of Fish Physiology and Biochemistry* 35, PP: 385-398.
- 28- Sunde, J., Taranger, G., and Rungruangsak-Torrissen, K., 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*. Vol: 25, PP: 335-345.

- 29- Suzer, C., Aktulun, S., coban, D., Kamaci, H. O., Saka, S., Firat K., and Alpbaz, A., 2007. Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*), *Comp. Biochem, Physiol, A.*, Vol: 148, PP: 470-477.
- 30- Worthington, C. C., 1991. *Worthington Enzyme Manual Related Biochemical*, 3 Edition. Freehold, PP: 212-215.
- 31- Zambonino Infante, J. L., and Cahu, C. L., 2001. Review. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130 (4), PP: 477-487.

## **Ontogeny of the alterations of digestive enzymes of *Alburnus chalcoides***

**Zakeri Nasab M.,<sup>1</sup> Jamili S.H.,<sup>2</sup> Fatemi S.M.R.,<sup>1</sup> Mashinchian Moradi A.,<sup>1</sup> Ramezani Fard E.,<sup>1</sup> Vali Pour A.R.,<sup>3</sup> Khalili V.,<sup>4</sup> Amri S. H.,<sup>4</sup> Khomeyrani R.<sup>5</sup> and Ramin M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Dept. of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Iranian Fisheries Research Organization, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, I.R. of Iran

<sup>4</sup> Mehr Zaferanieh Medical Laboratory, Tehran, I.R. of Iran

<sup>5</sup> Shaheed Ansari Bony Fish Reserve Propagation and Recovery Center, Rasht, I.R. of Iran

### **Abstract**

The *Alburnus chalcoides* is of the species of teleost fish of the Caspian Sea. Sampling was done randomly on days 1 to 5 and days 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 90 after hatching, pre-puberty and puberty. The digestive enzymes studied in this fish include pancreatic enzymes (trypsin, chotripsin, lipase, amylase) and intestinal enzymes (alkaline phosphatase and N-aminopeptidase). During the growth of fish, trypsin, kumotrypsin and N-aminopeptidase enzymes had an increasing trend which is caused by a high-protein diet. The phosphatase enzyme also has a rising trend up to one month of age and is then fixed under the effect of the pH of the environment. Amylase and lipase enzymes have an incremental reduction peak which shows that the fish diet has low sugar and fat compounds. Significant differences were observed for all enzymes ( $P \leq 0.05$ ) which has been the start of a significant difference for the trypsin and chomitripsin from the third day, lipase enzyme from the second day, amylase enzyme from the seventh day and the alkaline phosphatase and N-aminopeptidase from day five. All the digestive tract enzymes studied in this fish on the day of onset of active feeding has had incremental peak.

**Key words:** *Alburnus chalcoides*, digestive enzymes, Ontogeny, Caspian Sea