آنتوژنی تغییرات آنزیم‌های گوارشی ماهی شاه کولی (*Alburnus chalcoides*)

مسرور ذاکری نسب[۱]، شهلا جمیلی[۲*]، سید محمدرضا فاطمی[۱]، علی ماشینچیان مرادی[۱]، احسان رمضانی فرد[۱]، علیرضا ولی پور[۳]، وجیهه خلیلی[۴]، شهلا امری[۴]، رضا خمیرانی[۵] و محمود رامین[۲]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، گروه بیولوژی دریا

[۲] ایران، تهران، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، سازمان تحقیقات، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

[۳] ایران، بندر انزلی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی بندر انزلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی‌پروری آبهای داخلی

[۴] ایران، تهران، آزمایشگاه پزشکی مهر زعفرانیه

[۵] 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 به‌صورت تصادفی در روزهای ۱ تا ۵ و روزهای ۷، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۵ و ۹۰ بعد از تفریخ، پیش بلوغ و ماهی بالغ انجام شد. آنزیم‌های گوارشی موردمطالعه دراین 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 ثابت‌شده 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 ($P\leq ۰/۰۵$) 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 موردمطالعه 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

ماهی شاه کولی بانام علمی(*Alburnus chalcoides* Gueldenstaedt, 1772) متعلق به خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) است که اهمیت ویژه‌ای ازلحاظ 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 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

توجه به نقش آنها در مورد تغذیه می‌تواند در کاهش مرگ‌ومیر مؤثر باشد (۲۳). دراین 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. ازآنجایی‌که بیشترین ماده مغذی تشکیل‌دهنده این ارگانیسم‌ها 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 تفریخ تا جذب کامل کیسه زرده در لارو می‌باشد که شروع تغذیه فعال نیز دراین 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 دراین 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 ازاین 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 رشد ماهی می‌تواند بسیاری از مشکلات تغذیه‌ای در گوارش ماهی را حل نماید.

مواد و روشها

نمونه‌برداری از این ماهی به‌صورت تصادفی در روزهای ۱ تا ۵ و روزهای ۷، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۵و ۹۰ بعد از تفریخ 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 موردمطالعه 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 انجام‌شده 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 pH = ۷/۸ به مدت ۱ دقیقه در ۴ دقیقه سانتی‌گراد با دور ۳۰۰۰۰g سانتریوفیوژ شده و محلول بالایی (سوپرناتانت) برای سنجش آنزیم‌های پانکراسی جدا شد (۱۱). اسپکتروفتومتر دراین 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 pH=۷/۵ برای انجام کار ۳۰

میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترای تازه، مخلوط شده و۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر اسید استیک به‌منظور توقف واکنش به آن اضافه گردید. جذب نوری مخلوط حاصل، در طول‌موج 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: دراین سنجش از سوبسترای SAAPNAnitroanilide-HCL)N-Succinyl-AlaAla-Pro-phe-ρ) استفاده شد. برای تهیه محلول سوبسترا– بافر ۰/۷۹گرم Tris و ۰/۳۴گرم کلرید کلسیم به حجم کمتر از ۱۰۰ میلی‌متر تنظیم می‌شود وتقریباً ۰/۰۰۶ گرم از SAAPNA به این بافر اضافه‌شده و حجم نهایی به ۱۰۰ تنظیم شد وpH این محلول با pH متر کنترل بشود و به ۸/۵ برسد. ۸۵۵ میکرولیتر از محلول سوبسترا را در یک لوله‌آزمایش تمیز اضافه شد. ۱۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه شد (دما=۲۵ درجه سانتی‌گراد). بعد از ۱۰ دقیقه انکوبه کردن در۳۷ درجه جذب نوری آن در طول‌موج ۴۱۰ نانومتر قرائت می‌شود (۱۰) برای محاسبه از همان فرمول تریپسین استفاده می‌شود.

$$\text{میزان فعالیت آنزیم (u/mg-protein)} = \frac{\text{حجم محلول کووت(ml)}\times 1000 \times \text{جذب نوری در ۴۱۰ نانومتر}}{\text{مقدار پروتئین (mg)}\times \text{زمان انکوبه (دقیقه)}\times ۸۸۰۰}$$

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. دراین سنجش از روش برن فیلد (۱۹۵۱) از مواد و معرفهای زیر استفاده می‌شود.

معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید، بافر Tris، نشاسته ۱درصد، محلول استوک مالتوز: بااستفاده از محلول استوک 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:

$$\text{میزان فعالیت آنزیم (u/mg-protein)} = \frac{\text{حجم محلول کووت(ml)}\times 1000 \times \text{جذب نوری در۴۰۵}}{\text{مقدار پروتئین (mg)}\times \text{زمان انکوبه}\times ۱۶۵۰۰}$$

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز: برای سنجش فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز ازسوبسترای p-nitrophenyl myristate به همراه متوکسی اتانول (۰/۲۵ میلی مولار)، sodium cholate (۵ میلی‌مولار) وTris-HCL (۰/۲۵مولار) با pH= ۹ به‌صورت سوبسترا– بافر مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای انجام کار، ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترا– بافر اضافه‌شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه انکوبه شده و سپس به‌منظور توقف واکنش ۰/۷ میلی‌لیتر از محلول-acetone/n heptane به آن اضافه‌شده و کاملاً مخلوط گشته و به مدت ۲ دقیقه در دور (۷۰۰۰ g) سانتریوفیوژ می‌شود. مایع بالایی(حلال آلی) خارج می‌شود و جذب نوری مایع زیرین (آبی) در طول‌موج ۴۰۵ خوانده می‌شود. برای تهیه بلانک مانند نمونه عمل کرده بااین تفاوت که عصاره آنزیمی بعد از افزودن Acetone/n-heptane به لوله افزوده می‌شود (۱۶). فرمول محاسبه آنزیم به شرح زیر است:

مالتوز یک سری رقت به‌صورت (serial Dilution) شامل رقتهای۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و۲/۴ 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 طول‌موجnm ۵۴۰ قرائت می‌شود. بااستفاده از جذبهای نوری بدست آمده در رقتهای متفاوت منحنی استاندارد رسم می‌شود که در محور X غلظت مالتوز

و در محور Y جذب نوری بدست آمده قراردارد. فرمول محاسبه آنزیم به شرح زیر است:

$$\text{میزان فعالیت آنزیم (u/mg-protein)} = \frac{\text{فاکتور رقت} \times \text{مقدار مالتوز آزاد شده (میکرو مول)}}{\text{مقدار پروتئین (mg)} \times \text{زمان انکوبه}}$$

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 ۷= pH استفاده می‌شود. دراین سنجش از کیت زیست‌شیمی استفاده شد (۳۰). روش اندازه‌گیری به‌صورت Endpoint می‌باشد. براساس این مکانیسم آنزیم در مجاورت یک محلول سوبسترا به نام p-Nitrophenylphosphate و بافرDiethanolamine (DEA) می‌تواند سوبسترا را هیدرولیز کند و محصول زرد رنگ به نام p- Nitrophenol را ایجاد و تولید کند که جذب نوری در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. دراین واکنش یون منیزیم به آنزیم کمک می‌کند. روش کار برای این آنزیم به شرح زیر است: ۲۵۰ میکرولیتر بلانک و ۲۵۰ میکرولیتر سرم به‌عنوان سوبسترا 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 طول‌موج 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 سوبسترا استفاده می‌شود. ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۹۸۰lμ از سوبسترا اضافه می‌شود. اثر آنزیم بر سوبسترا با تولید nitroaniline و افزایش جذب نوری در طول‌موج ۴۰۵nm همراه است. تغییرات جذب نوری درطی ۵ دقیقه (هر۳۰ ثانیه) در برابر بلانک قرائت می‌شود و فعالیت آنزیم باتوجه به مقدار پروتئین برحسب u/mg-protein بیان می‌گردد (۲۲).

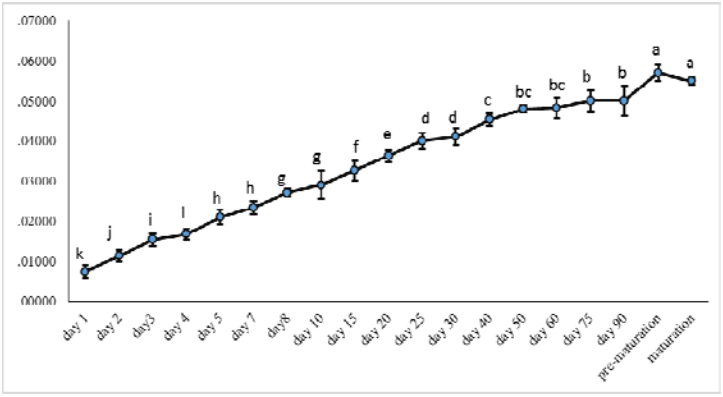
تجزیه‌وتحلیل آماری: به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (Anova-one- awey) و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. همچنین برای بررسی سطح معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

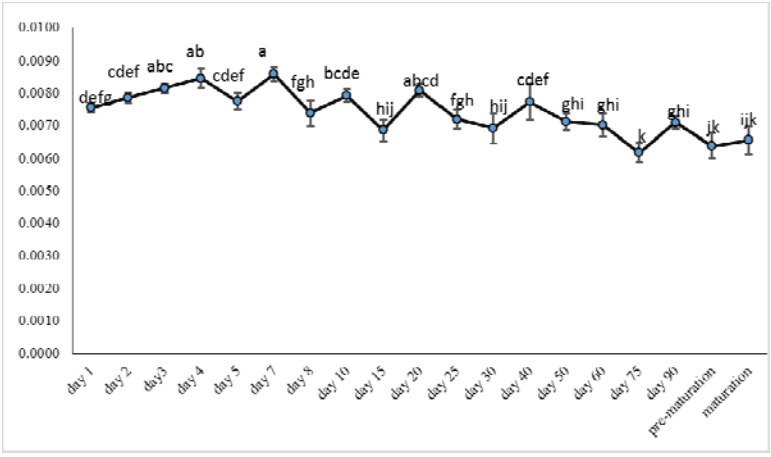
فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین: این آنزیم پانکراسی به‌طورکلی یک‌روند افزایشی داشته و اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) از روز سوم شروع شده است. احتمالاً این مسئله به رژیم غذایی ماهی برمی‌گردد که یک رژیم غذایی پرپروتئین بوده است. این آنزیم تقریباً از روز ۵۰ ثابت‌شده است (نمودار–۱).

فعالیت اختصاصی آنزیم آلفا– آمیلاز: فعالیت آمیلاز دارای یک پیک افزایشی– کاهشی بوده و اختلاف معناداری (P≤۰/۰۵) این آنزیم از روز هفتم شروع می‌شود. دراین 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).

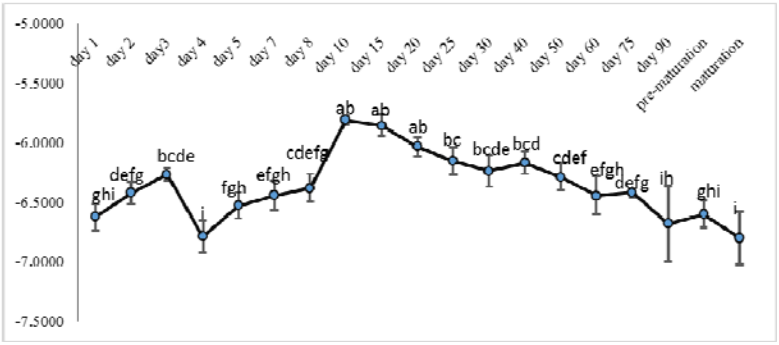
فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز: این آنزیم دارای یک پیک کاهشی– افزایشی به سمت کاهشی می‌باشد که از روز دهم به بعد کاملاً کاهش‌یافته است. احتمالاً این مسئله به دلیل جذب کامل کیسه زرده دراین روز می‌باشد. اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) در این آنزیم از روز دوم مشخص‌شده است. این آنزیم تقریباً از روز ۴۰ ثابت‌شده است (نمودار–۳).



نمودار۱ - فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین(u/mg protein)، میانگین ± انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد



نمودار ۲- فعالیت اختصاصی آنزیم آلفا- آمیلاز (u/mg protein)، میانگین ± انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد

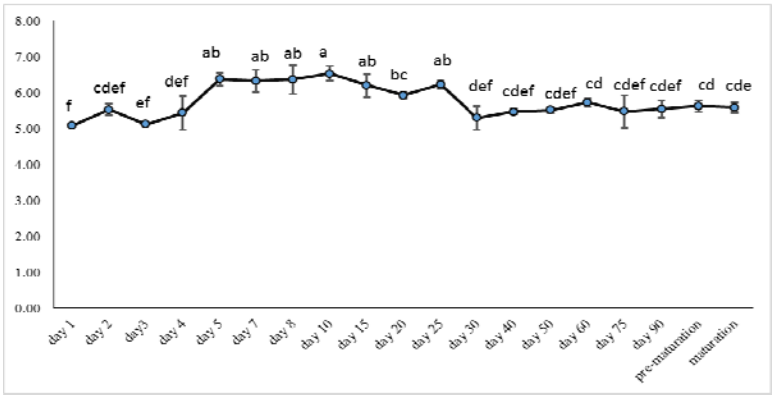


نمودار ۳- فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز (u/mg protein)، میانگین ± انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح(P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد

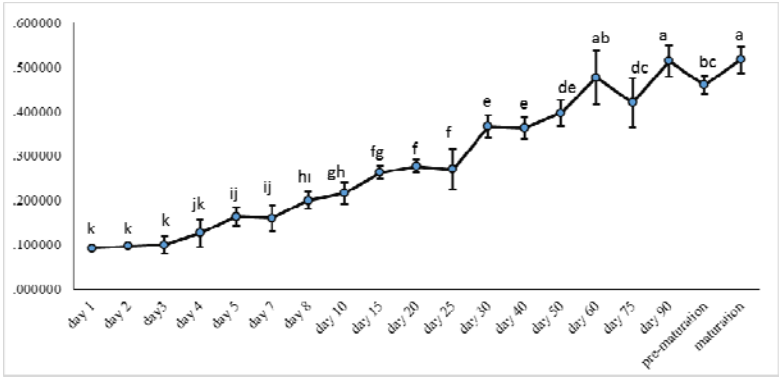
فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلیایی: فسفاتاز قلیایی که یک آنزیم روده‌ای می‌باشد در طول رشد تغییرات چندان بارزی نداشته است. اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) این آنزیم از روز پنجم می‌باشد. این آنزیم حدوداً از روز ۴۰ ثابت‌شده است (نمودار۴).

فعالیت اختصاصی آنزیم N- آمینوپپتیداز: آنزیم آمینوپپتیداز روده‌ای دارای روند افزایشی بوده و اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) این آنزیم از روز پنجم می‌باشد. این آنزیم از روز ۴۰ ثابت‌شده است (نمودار-۵).

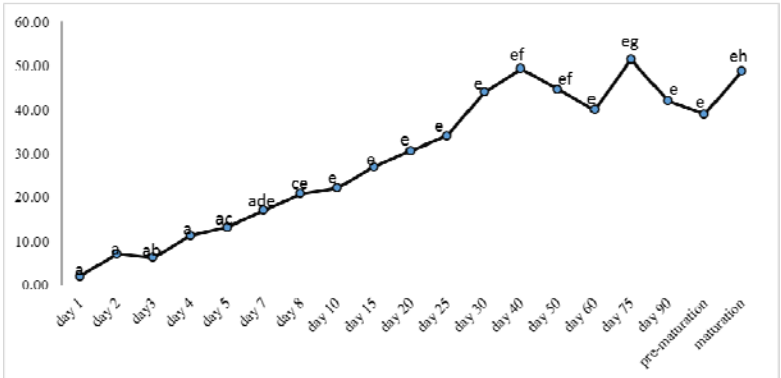
فعالیت اختصاصی آنزیم کموتریپسین: آنزیم کموترپسین از روز سوم دارای اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵)می‌باشد. این آنزیم تا روز ۴۰ روند افزایشی داشته و از آن به بعد تقریباً ثابت‌شده است.



نمودار ۴- فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلیایی (u/mg protein)، میانگین ± انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد



نمودار ۵- فعالیت اختصاصی آنزیم آمینوپپتیداز (u/mg protein)، میانگین ± انحراف استاندارد (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<۰/۰۵) را نشان می‌دهد



نمودار۶ – فعالیت اختصاصی آنزیم کموتریپسین (u/mg protein)، میانگین رتبه (n=3)، حروف غیر همسان معناداری در سطح (P<۰/۰۵)را نشان می‌دهد

بحث

مجرای گوارشی نقش مهمی در هضم و جذب مواد غذایی داشته و درنتیجه بر روی رشد جانور تأثیر دارد (۱). بنابراین فرآیند هضم در سیستم گوارش انجام‌شده و در طی انجام آن آنزیم‌های گوارشی به‌عنوان مهمترین عامل دارای اهمیت می‌باشند. هضم پروتئین یک فرآیند مهم و

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 (آنتروسیت) 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 درنهایت 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 تخم گشایی 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. درواقع 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 ازجمله ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (۵)، ماهی *Scophthalmus maximus* (۲۶)، تاسماهی سیبری یا *Acipenser baeri* (۱۴)، ماهی *Sciaenops ocellatus* (۲۰)، ماهی *Catla catla* (۲۴) و *Pseudosciaena crocea* (۲۱) نیز گزارش‌شده است. در مورد آنزیم‌های غشایی روده یا در حاشیه (نوار مسواکی روده)، ازجمله 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. باتوجه به اینکه شاه کولی از یک‌ماهگی به بعد از داخل قفس به استخر منتقل‌شده ممکن است تحت تأثیر این تغییر، این آنزیم تقریباً از این روزبه بعد روند ثابتی پیداکرده 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 گزارش‌شده 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 تفریخ نیز این افزایش دیده می‌شود. در ماهی شاه کولی آنزیم لیپاز در روز دهم (جذب کامل کیسه زرده) به‌شدت افزایش‌یافته اما از این روزبه بعد تقریباً یک‌روند کاهشی داشته است. دراین آنزیم نیز همزمان با شروع تغذیه فعال (روز پنجم) و شروع تغذیه پلت و تکمیل پانکراس (روز هشتم) یک پیک افزایشی دیده می‌شود. افزایش لیپاز 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 تفریخ (۲۹) و *Acipenser baeri* (۱۴) نیز گزارش‌شده است. همچنین افزایش این آنزیم در روز تکمیل شدن پانکراس نیز در ماهی *Solea senegalensis* در روز دهم گزارش‌شده 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

روی آمیلاز، در مطالعه‌ای برروی لاروهای Croaker دیده‌شده که استفاده از روتیفر در شروع تغذیه باعث افزایش آنزیم آمیلاز شده، درحالی‌که استفاده از کوپه پودا باعث کاهش فعالیت این آنزیم شده است (۲۷). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بر روی کپور نقره‌ای و کپور سر گنده نیز گزارش‌شده 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 درنتیجه 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 طویل‌تر شدن ریز پرزهای (Vili) روده شده و این افزایش طول، منجر به افزایش سطح روده و نهایتاً باعث افزایش جذب می‌شود (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 دراین موجودات امری انکارناپذیر است بنابراین می‌توان با مدیریت و برنامه‌ریزی صحیح دراین 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 می‌نماییم.

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 chalcoides* Guldenstadt, 1772) در رودخانه سفیدرود، مجله زیست‌شناسی دریا، سال ۱، شماره ۳، صفحات ۴۵- ۶۳.

۴- عمادی، ح.، کیابی، 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.، نعمت اللهی، 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 α and β. 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. Purfication 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 proteolitic digestive enzymes of carp fry. Aquaculture Hung. Vol: 2, PP: 27-30.

24- Rathore, R. M., Kumar S., and Chakrabarti, R., 2005. Digestive enzyme profi le of Cyprinus carpio during ontogenic 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 miiuy croaker *Miichthys miiuy* 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., Fırat 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. Worthigton 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.,[1] Jamili S.H.,[2] Fatemi S.M.R.,[1] Mashinchian Moradi A.,[1] Ramezani Fard E.,[1] Vali Pour A.R.,[3] Khalili V.,[4] Amri S. H.,[4] Khomeyrani R.[5] and Ramin M.[2]

[1] Dept. of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Iranian Fisheries Research Organization, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, I.R. of Iran

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

[4] Mehr Zaferanieh Medical Laboratory, Tehran, I.R. of Iran

[5] 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, chtotripsin, 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