مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلفا آمیلاز، تریپسین و لیپاز در روده ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) در دو محیط وحشی و پرورشی

- **حسینعلی شیبک***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **مصطفی غفاری**: گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **احمد قرایی**: گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **ساحل پاکزادتوچایی**: گروه مدیریت اکوسیستم‌های طبیعی، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، صندوق‌پستی: ۵۳۸-۹۸۶۱۵
- **علیرضا افشاری**: اداره کل شیلات سیستان، زابل، صندوق‌پستی: ۱۶۹۹۸-۹۸۶۱۶

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

فعالیت آنزیم‌های گوارشی در محیط پرورشی نسبت به محیط وحشی دارای تفاوت‌هایی می‌باشد که این امر به‌دلیل تغییر در مواد غذایی قابل دسترس است. هدف از این تحقیق بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، تریپسین ولیپاز در قسمت‌های قدامی، میانی و خلفی روده ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) در دو محیط وحشی و پرورشی می‌باشد. بدین منظور تعداد ۲۵ قطعه ماهی، شامل ۱۲ قطعه وحشی (در ٤ گروه وزنی با متوسط اوزان ٦/۳±۱٤۱/٦، ۲/٦۳±۲۰۹/۵، ۹/٦±۲٦۳/۱ و ۲٦/۹±۳۲٦/۱۵ گرم) و ۱۳ قطعه پرورشی (با متوسط وزن ۵/٦±۵۵/۱ گرم) استفاده گردید. نتایج نشان داد که در هر دو گروه ماهیان وحشی و پرورشی، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز نسبت به دیگر آنزیم‌های مورد بررسی بیش‌تر می‌باشد. بالاترین میزان فعالیت این آنزیم در بخش میانی روده مشاهده شد و میزان فعالیت آن بین بخش‌های مختلف روده نیز دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<0/05$). فعالیت آنزیم‌های تریپسین و لیپاز نیز بیش‌ترین مقدار خود را در بخش قدامی روده نشان داد و بین فعالیت این آنزیم‌ها در بخش قدامی و میانی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$) اما بین بخش قدامی و میانی با بخش خلفی اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p<0/05$). نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های لیپاز و تریپسین نشان داد که میزان این آنزیم‌ها در هر دو گروه ماهیان از بخش قدامی به خلفی روده کاهش می‌یابد. مقایسه فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، تریپسین و لیپاز و میانگین‌های وزنی در ماهیان وحشی نیز مشخص کرد که با افزایش وزن میزان فعالیت آنزیم‌ها افزایش می‌یابد.

کلمات کلیدی: ماهی سفیدک سیستان، آلفا آمیلاز، تریپسین، لیپاز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Sheibak.1360@yahoo.com

مقدمه

مطالعه آنزیم‌های گوارشی از مهم‌ترین روش‌های درک مکانیسم هضم مواد غذایی و نیز نحوه سازش یافتن یک موجود زنده با تغییرات غذایی محیط می‌باشد (Sunde و همکاران، ۲۰۰۴). به‌عبارت دیگر ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه‌های پرورشی می‌تواند در تعیین جیره غذایی مفید باشد (Lan و Pan، ۱۹۹۳). توانایی ماهیان جهت هضم و جذب مواد غذایی به حضور و کیفیت آنزیم‌های گوارشی بستگی دارد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز با توجه به نوع رژیم غذایی (از پلانکتون‌خواری تا شکارچی و بنتوزخواری) تغییر می‌کند (Kuzmina، ۱۹۹۶). علاوه بر این، عوامل متعددی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تاثیرگذار هستند که ازجمله می‌توان به سن، نوع تغذیه، ترکیب غذا، فصل و دمای سازگاری گونه اشاره نمود (Clements و Raubenheimer، ۲۰۰۶؛ Deguara و همکاران، ۲۰۰۳). کپورماهیان بزرگ‌ترین خانواده ماهیان آب شیرین می‌باشند و ماهیان این خانواده دارای رژیم‌های غذایی مختلفی هم‌چون گیاه‌خواری، گوشت‌خواری، پوده‌خواری و همه‌چیزخواری هستند. این تنوع رژیم غذایی سبب تغییراتی در دستگاه گوارش آن‌ها شده است. هم‌چنین فقدان معده مشخص در ماهیان این خانواده باعث گردیده است که بخش عمده هضم و جذب مواد غذایی در روده آن‌ها صورت پذیرد این امر با توجه به تنوع عادات غذایی سبب تغییراتی در ساختار روده آن‌ها شده است (ستاری، ۱۳۸۵). ماهیان گیاه‌خوار معمولاً دارای روده بزرگ‌تری نسبت به ماهیان گوشت‌خوار می‌باشند و هم‌چنین این ماهیان دارای پروفیل آنزیمی سازش یافته با غالبیت کربوهیدرازها هستند. در مقابل، ماهیان گوشت‌خوار روده کوتاه با سطوح بالایی از آنزیم‌های پروتئازی را دارا می‌باشند و در روده آن‌ها آمیلازها و لیپازها فعالیت به مراتب کم‌تری دارند (Hidalgo و همکاران، ۱۹۹۹؛ Chakrabarti و همکاران، ۱۹۹۵). ماهی سفیدک سیستان متعلق به خانواده کپورماهیان می‌باشد (Nelson، ۱۹۷۶). متاسفانه خشکسالی‌های طولانی و تقاضای بالای بازارهای محلی منجر به فشار بر ذخایر و حتی احتمال ایجاد خطر انقراض این گونه شده است (Gharei و همکاران، ۲۰۱۰)، لذا با توجه به موفقیت تکثیر مصنوعی این ماهی نیاز است تا تحقیقات لازم جهت تعیین جیره غذایی مناسب به‌منظور امکان به وزن رسانی و پرورش این گونه در محیط‌های مصنوعی صورت پذیرد. در مطالعه حاضر تلاش شده است تا با بررسی فعالیت‌های آنزیم‌های گوارشی روده این ماهی بتوان نسبت به تعیین نیازهای غذایی آن اقدام نمود.

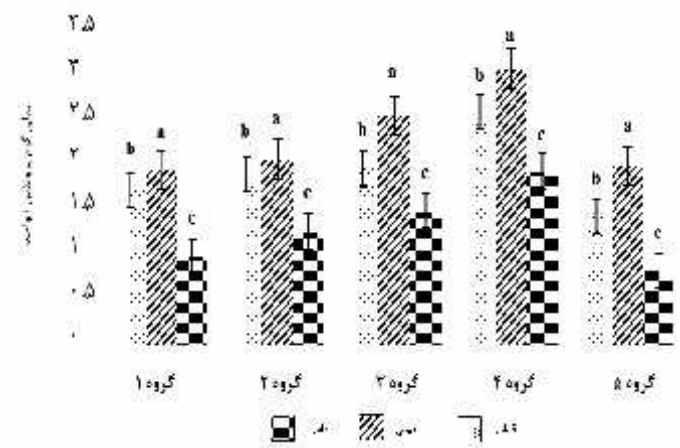
مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی فعالیت‌های آنزیمی روده ماهی سفیدک سیستان تعداد ۱۲ عدد ماهی وحشی (با متوسط وزن ۱۴۱/۶±۶/۳، ۲۰۹/۵±۲/۶۳، ۲۶۳/۱±۹/۶ و ۳۲۶/۱۵±۲۶/۹ گرم و طول استاندارد ۲۲/۴±۱/۲، ۲۴/۰۵±۰/۷۷، ۲۴/۸±۰/۴۹و ۲۷/۵±۲/۱ سانتی‌متر) در پائیز و زمستان سال ۱۳۹۲ از مخازن چاه نیمه‌های سیستان صید گردید هم‌چنین تعداد ۱۳ قطعه ماهی پرورشی (متوسط وزن ۵۵/۱±۵/۶ گرم و طول استاندارد ۱۵/۶±۱/۸ سانتی‌متر) نیز از استخر پرورش ماهی واقع در شهرستان زهک (طول جغرافیایی ۴۱ درجه و ۶۱ دقیقه شرقی و ۳۰ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی) در استان سیستان و بلوچستان صید شد. ماهیان مورد نظر به مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهی بومی زهک منتقل و به‌منظور تخلیه محتویات لوله گوارشی به‌مدت ۴۸ ساعت در مخازن حاوی آب تازه تحت هوادهی نگه‌داری (Das و Tripathi، ۱۹۹۱) و سپس به‌منظور کالبدگشایی با استفاده از عصاره گل میخک بی‌هوش شدند. ضمناً به‌منظور به‌حداقل رساندن فعالیت‌های آنزیمی، نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف روده در حداقل زمان و در مجاورت یخ صورت پذیرفت (Deguara و همکاران، ۲۰۰۳). بدین منظور روده‌های ماهیان به‌طورکامل جدا شده و پس از تقسیم به سه بخش قدامی، میانی و خلفی به‌صورت طولی برش داده شد. به‌منظور حذف محتویات باقی‌مانده، روده‌ها با آب مقطر سرد شسته شدند (Chong و همکاران، ۲۰۰۲). نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع قرار داده شد و به آزمایشگاه پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون منتقل گردید و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، انجمادزدایی و توزین گردیدند و هر یک از آن‌ها با نسبت وزنی به حجمی (w/v) ۱ به ۱۰ با بافر Triss-HCl ۰/۰۵ مولار در کنار یخ، طی سه مرحله و هر مرحله به‌مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه توسط هموژنایزر (مدل IKA ۱۰ Tbasic, ULTRATURRAX ساخت کشورآلمان) همگن گردید. سوسپانسیون حاصله با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل EPPENDORF۵۸۱۰R) با سرعت ۹۴۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از پایان سانتریفیوژ، بخش رویی حاصله جدا و در ویال‌های ۲۰۰ میکرولیتری در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت انجام ادامه بررسی‌های آنزیمی نگه‌داری شد. برای سنجش آنزیم آلفا آمیلاز از روش Bernfeld (۱۹۵۱)، آنزیم تریپسین از روش Erlanger و

همکاران (۱۹۶۱) و لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده شد. هم‌چنین پروتئین محلول در بافت روده با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد (۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. تمامی ارزیابی‌ها در ۳ تکرار انجام پذیرفت. برای مقایسه فعالیت آنزیمی در بخش‌های مختلف روده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCELL و برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف میزان فعالیت آنزیم‌ها در گروه‌های وزنی مختلف از آزمون سنجش مستقل آزمون تی (independent sample t-test) استفاده شد ($p<۰/۰۵$).

نتایج

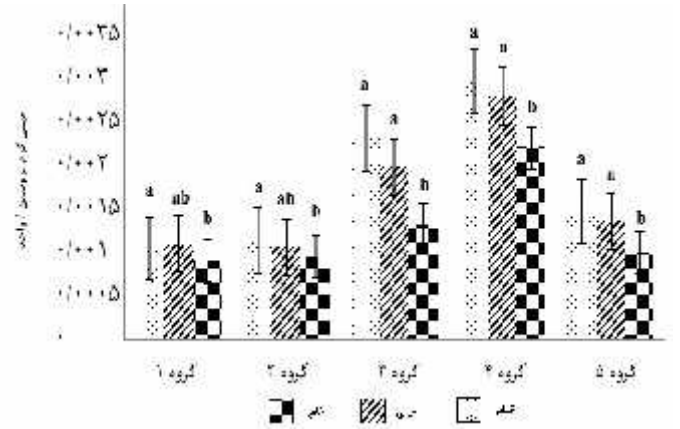
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در بین آنزیم‌های مورد بررسی (آلفا آمیلاز، تریپسین و لیپاز) در هر دو گروه ماهیان وحشی و پرورشی بیش‌ترین میزان فعالیت مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز در بخش میانی روده می‌باشد. هم‌چنین مشاهده گردید فعالیت آن در بخش‌های مختلف روده دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$) (شکل ۱).



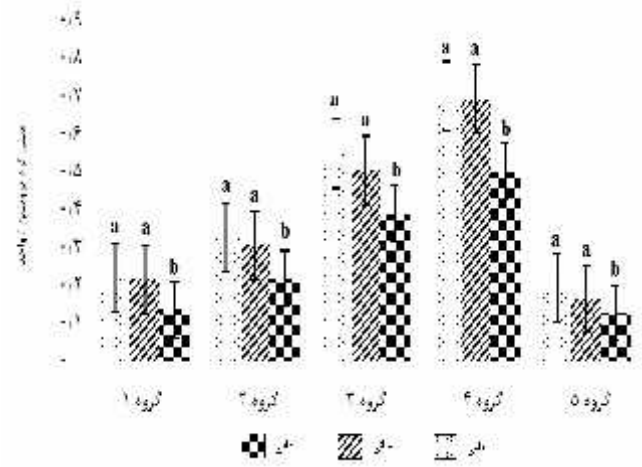
شکل ۱: تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بخش‌های مختلف روده ماهی سفیدک سیستان (گروه‌های ۱تا ۴ از ماهیان وحشی و گروه ۵ از ماهیان پرورشی می‌باشد) ($p<۰/۰۵$)

بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و لیپاز نیز در بخش قدامی روده مشاهده شد و فعالیت این آنزیم‌ها در بخش‌های قدامی و میانی دارای اختلاف معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$) اما بین بخش‌های قدامی و میانی با بخش خلفی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$)(شکل‌های ۲ و ۳).

هم‌چنین مشاهده گردید که در هر دو دسته نمونه‌های وحشی و پرورشی، با افزایش وزن ماهی، میزان فعالیت هر سه آنزیم نیز افزایش می‌یابد. ضمناً میزان فعالیت‌های آنزیمی در گونه‌های پرورشی از گونه‌های وحشی کم‌تر بود.



شکل ۲: تغییرات فعالیت آنزیم تریپسین در بخش‌های مختلف روده ماهی سفیدک سیستان (گروه‌های ۱تا ۴ از ماهیان وحشی و گروه ۵ از ماهیان پرورشی می‌باشد) ($p>۰/۰۵$)



شکل ۳: تغییرات فعالیت آنزیم لیپاز در بخش‌های مختلف روده ماهی سفیدک سیستان (گروه‌های ۱تا ۴ از ماهیان وحشی و گروه ۵ از ماهیان پرورشی می‌باشد) (p>۰/۰۵)

در تمامی شکل‌ها، بخش‌های مختلف روده (قدامی، میانی و خلفی) به‌طور جداگانه بین ۵ گروه ماهی مورد مقایسه قرار گرفته است. تفاوت بین آن‌هایی که دارای حروف یکسان نیستند معنی‌دار می‌باشد (Mn ± SD, N=3 α=۰/۰۵)

گروه‌های وزنی ۱ تا ۵ به‌ترتیب دارای اوزان متوسط ۶/۳±۱۴۱/۶، ۲/۶۳±۲۰۹/۵، ۹/۶±۲۶۳/۱ ، ۲۶/۹±۳۲۶/۱۵ و ۵/۶ ±۵۵/۱ گرم می‌باشند.

بحث

همان‌طور که گفته شد فعالیت‌های آنزیمی دستگاه گوارش بسته به رژیم غذایی تغییر می‌کند و براساس رژیم غذایی، ساختار لوله گوارش و پروفیل آنزیمی دستخوش تغییرات می‌شود (Kuzmina، ۱۹۹۶). در واقع میزان فعالیت یک آنزیم در روده به میزان سوبسترای موجود در روده بستگی دارد و مکانسیم سوبستراهای در دسترس، یک فاکتور مهم در رابطه با فعالیت‌های آنزیمی روده در ماهی نسبت به پستانداران می‌باشد (Gruzdkov و همکاران، ۱۹۸۱). ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) جزء کپورماهیان همه‌چیزخوار و فاقد معده است (رضوانی‌گیل‌کلایی، ۱۳۹۰؛ Nelson، ۱۹۷۶). لذا مانند سایر کپورماهیان فاقد معده، در این ماهی نیز روده به‌عنوان مکان اصلی هضم و جذب مواد غذایی محسوب می‌شود. مشخص شده است که میزان فعالیت آنزیمی روده به فاکتورهای مختلفی چون رفتار تغذیه‌ای، ترکیب بیوشیمیایی غذای مصرفی و رسیدگی جنسی بستگی دارد (Kuzmina، ۱۹۹۶). رفتار تغذیه‌ای ماهی، سیستم گوارشی آن را در رابطه با نوع غذا و طبقه‌بندی تاکسونومیک سازش می‌دهد (Smith، ۱۹۸۹). براساس نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در هر دو گروه ماهیان وحشی و پرورشی از فعالیت سایر آنزیم‌های مورد مطالعه (تریپسین و لیپاز) بیش‌تر بوده است. این نتیجه با نتایج به‌دست آمده توسط Chakrabarti و همکاران (۱۹۹۵) و Hidalgo و همکاران (۱۹۹۹) هم‌خوانی دارد. آن‌ها دریافتند که کپورماهیان گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار بدون معده دارای سطح بالاتر آنزیم آلفا آمیلاز می‌باشند. هم‌چنین آن‌ها دریافتند که میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بخش‌های مختلف لوله گوارش متفاوت می‌باشد (Hidalgo و همکاران، ۱۹۹۹؛ Chakrabarti و همکاران، ۱۹۹۵).

در هر دو گروه ماهیان پرورشی و وحشی، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بخش میانی روده و تریپسین و لیپاز در بخش قدامی روده مشاهده گردید. تحقیقات انجام شده بر روی سایر گونه‌ها نیز نتایج حاصل از این تحقیق را تایید می‌نماید. از جمله می‌توان به نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بر روی ماهی مریگال، تریپسین در سوف دریای نیل و ماهی پورگی، لیپاز در تیلاپیای آفریقایی و فیل‌ماهی آفریقایی اشاره نمود (Namulawa و همکاران، ۲۰۱۳؛ Odedeyi و Fagbenro، ۲۰۱۰؛ Achionye-Nzeh و همکاران، ۲۰۰۵؛ Cara و همکاران، ۲۰۰۳؛ Saraquete و همکاران، ۱۹۹۳).

منابع آنزیمی روده شامل لوزالمعده، کیسه شنا، غذاهای طبیعی مصرفی و فلور باکتریایی روده می‌باشد که در این بین لوزالمعده نقش مهمی را در تولید آنزیم‌ها ایفا می‌نماید (Jobling، ۱۹۹۵؛ Smith، ۱۹۸۹). آنزیم‌های آلفا آمیلاز، تریپسین و لیپاز از لوزالمعده منشاء می‌گیرند بنابراین در بخش قدامی روده ترشح می‌شوند و نتیجتاً بیش‌ترین میزان تاثیر

گوارشی این آنزیم‌ها در بخش‌های ابتدایی روده تمرکز می‌یابد. البته می‌توان گفت که از دیگر دلایل کاهش میزان فعالیت این آنزیم‌ها در بخش خلفی روده، کاهش میزان سوبستراهای مورد نیاز آن‌ها جهت فعالیت، شکسته‌شدن و بازجذب مجدد آنزیم‌ها (Clementsو Raubenheimer، ۲۰۰۶؛ Hofer، ۱۹۸۲) و نیز تغییر pH در طول ناحیه روده‌ای (Moriarty، ۱۹۷۳) می‌باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش وزن ماهی در نمونه‌های وحشی میزان فعالیت آنزیمی نیز افزایش می‌یابد که علت آن می‌تواند به‌دلیل افزایش اندازه روده و ضخامت لایه موکوسی باشد (Kuzmina، ۱۹۹۶). هم‌چنین مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی با توجه به اندازه ماهی دارای نوسان می‌باشد. البته این نوسان‌ها دارای ریتم افزایشی بود که این امر با نتایج سایر مطالعات انجام شده بر روی ماهی سیم سفید و تیلاپیای نیل مطابقت دارد (Klahan و همکاران، ۲۰۰۹؛ Kuzmina، ۱۹۹۶).

بیش‌تر ماهیان می‌توانند رژیم غذایی خود را با مواد غذایی در دسترس سازگار کنند (Stevens، ۱۹۸۸). از سوی دیگر شرایط زیست در محیط پرورشی و طبیعی با هم متفاوت بوده و این امر تاثیر زیادی بر روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ایفا می‌نماید. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی در نمونه‌های پرورشی از نمونه‌های وحشی کم‌تر می‌باشد. از آن‌جاکه در محیط پرورشی دسترسی به مواد غذایی مورد نیاز با محدودیت روبرو است بنابراین جاندار با نوعی تغذیه اجباری مواجه می‌باشد که نتیجتاً بر میزان فعالیت آنزیمی تاثیرگذار خواهد بود. از سوی دیگر با توجه به این‌که نمونه‌های وحشی دارای سن و اندازه بزرگ‌تر نسبت به نمونه‌های پرورشی بودند بنابراین می‌توان انتظار داشت که میزان فعالیت آنزیمی در نمونه‌های پرورشی به‌علت کوچک‌تر بودن جاندار کم‌تر باشد هم‌چنین منبع غذایی و وفور غذایی در میزان آنزیم تعیین‌کننده است (علیزاده و دادگر، ۱۳۸۱). به‌طوری که مطالعات انجام شده توسط Cara و همکاران (۲۰۰۳) بر روی ماهی سفید سیم (*Diplodus argus*)، Das و Tripathi (۱۹۹۱) بر روی کپور علفخوار و Kuzmina (۱۹۹۶) بر روی اردک ماهی بالغ این موضوع را تایید می‌نماید.

در پایان می‌توان نتیجه گرفت تغییر شرایط تغذیه‌ای سفیدک سیستان تاثیری بر الگوی فعالیت آنزیم‌های گوارشی نداشته و با توجه به نتایج به‌دست آمده از میزان فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی، تهیه جیره‌های غذایی بر پایه کربوهیدرات‌ها بتواند به‌عنوان یک جیره پایه برای تغذیه و توسعه این گونه در استخرهای پرورشی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱. **رضوانی‌گیل‌کلایی، س.، ۱۳۹۰.** بررسی و تکثیر و پرورش *شیزوتوراکس زارودنی* تا وزن یک گرمی در استخرهای خاکی. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱۹ صفحه.

۲. **ستاری، م.،** ۱۳۸۵. ماهی‌شناسی۱: تشریح و فیزیولوژی. چاپ دوم. انتشارات حق‌شناس. صفحات ۱۲۳ تا ۱۶۰.

۳. **علیزاده، م. و دادگر، ش.،** ۱۳۸۱. مدیریت تغذیه در پرورش متراکم آبزیان. شرکت سهامی شیلات ایران. ۱۹۰ صفحه.

4. **Achionye-Nzeh, C.G.; Obaroh, I. and Adeniyi, V., 2005.** Lipase activity in the liver and digestive tract of some cichlids (Cichlidae). African Journal of Applied Zoology and Environmental Biology. Vol. 7, pp: 136-139.

5. **Bernfeld, P., 1951.** Amylase α and β. In: Methods in Enzymology. (ed s. P. Colowick and N. O. Kaplan) Academic Press. New York. Vol. 26, pp: 715-723.

6. **Cara, J.B.; Moyano, F.J.; Cardenas, S.; Fernandez-Diaz, C. and Yuffera, M., 2003.** Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. Journal of Fish Biology. Vol. 63, pp: 48-58.

7. **Chakrabarti, I.; Gani, M.D.A.; Chaki, K.K.; Sur, R. and Misra, K.K., 1995.** Digestive enzyme in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. Comparative Biochemistry Physiology. Vol. 112, pp: 167-177.

8. **Chong, A.S.C.; Hashim, R.; Chow-Yang, L. and Ali, A.B., 2002.** Partial characterization and activities of proetases from the digestive tact of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aqaculture. Vol. 203, pp: 321-333.

9. **Clements, K.D. and Raubenheimer, D., 2006.** Feeding and nutritio. The physiolog y Of Fishe, 3rd ed. Eds D.H. Evans and J.B. Claiborne. pp: 44-82.

10. **Das, K.M. and Tripathi, S.D., 1991.** Studies on the digestive enzymes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture. Vol. 92, pp: 21-32.

11. **Deguara, S.; Jauncey, K. and Agius, C., 2003.** Enzyme activities and pH variation in the digestive tract of gilthead seabream. Journal of Fish Biology. Vol. 62, pp: 1033-1043.

12. **Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961.** The prepration and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, pp: 271-278.

13. **Gharei, A.; Rahdari, A. and Ghaffari, M., 2010.** *Schizothorax zarudnyi* as a potential specie for aquaculture. Farming the water for people and food Conference, 22-25 September. Thailand.

14. **Gruzdkov, A.A.; Gusev, U.M. and Ugolev, A.M., 1981.** The three compartmental enzyme of the enterocyte relating to its digestive and barrier function. In: Adv. Journal of physiology Science. Vol. 29, pp: 303-314.

15. **Hidalgo, M.C.; Urea, E. and Sanz, A., 1999.** Comparative study of digestive enzyme in fish with different nutritional habitus. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture. Vol. 170, pp: 267-283.

16. **Hofer, R., 1982.** Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous of an omnivorous cyprinid.Comparative biochemistry and physiology. Vol. 72, pp: 55-63.

17. **Jobling, M., 1995.** Digestive and abruption In: Jobling, M. (ed), Environmental Biology of Fishes. Chapter 6. Chapman and Hall, London England. pp: 175-210.

18. **Klahan, R.; Areechon, N.; Younpundh, R. and Engkagul, A., 2009.** Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*). Kasetsart J. (Nat.Sci). Vol. 43, pp: 143-153.

19. **Kuzmina, V.V., 1996.** Influence of age on some digestive enzymes activity in some freshwater teleosts. Aquaculture. Vol. 148, No. 1, pp: 25-37.

20. **Kuzmina, V.V. and Skvortsova, E.G., 2003.** Contribiotion of Dietary proteolitic enzyme to digestion of carnivorous fish. Journal of Ichthyology. Vol. 43, No. 2, pp: 175-180.

21. **Lan, C.C. and Pan, B.S., 1993.** In vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. Vol. 109, pp: 59-70.

22. **Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurmen with the folin phenol reagent. Journal of Biological chemistry. Vol. 193, pp: 265-275.

23. **Moriarty, D.J.W., 1973.** The physiology of digestion of blue green algae in the cichlid fish. *Tilapia nilotica*. Journal of Zoology. Vol. 171, pp: 25-39.

24. **Namulawa, V.T.; Kato, C.D.; Rutiaisire, J.; Britz, P.J.; Beukes, N.; Pletschke, B.I. and Whiteley, C., 2013.** Enzyme activity I the Nile perch gut: Implications to Nile Perch culture. Intertational Journal oFisheries and Aquaculture. Vol. 5, No. 9, pp: 122-228.

25. **Nelson, J.S., 1976.** Fishes of the worlds, 3 edition. New York. John Wile and Sons. ISBN: 0471547131

26. **Odedeyi, D.O. and Fagbenro, O.A., 2010.** Feeding habits and digestive enzymes in the gut of *Mormyrus rume* (*Osteichthyes* mormy*ridea*). Tropical zoology. Vol. 23, pp: 75-89.

27. **Saraquete, M.C.; Polo, A. and Gonzalez De Canales, M.L., 1993.** A histochemicaland immunohistochemical study of digestive enzymes and homons during the larval development of the sea bream (*Sparus aurata*). The Histochemical Journal. Vol. 25, No. 6, pp: 430-437.

28. **Smith, L.S., 1989.** Digestive function in teleost fish. In Fish Nutrition, 2nd end, ed. Halver, J.E. Sandiago: Academy press. pp: 331-421.

29. **Stevens, C.E., 1988.** Comparative physiology of the vertebrate digestive system.Ca mbrige university Press. New York. 288 p.

30. **Stevens, C.E. and Hume, I.D., 1995.** Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. Press Syndicate of the University of Cambridge. Melbourne. 521 p.

31. **Sunde, J.; Eiane, S.A.; Rustad, A.; Jensen, H.B.; Opstvedt, J.; Nygard, E.; Venturini, G. and Rungruangsak-Torrissen, K., 2004.** Effect of fish feed processing conditions on digestive proteactivities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Aquaculture Nutrition. Vol. 10, No. 4, pp: 261-277.

32. **Worthington, C.C., 1998.** In Worthington Enzyme Manual (Worthigton, C. C. ed.) Worthington Biochemical Corporation, Freehold. New Jersey. pp: 212-214.