14(3) 377-384, Autumn 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of replacing fish meal with plant protein sources on growth performance and digestive enzymes activity in Asian sea bass (*Lates calcalifer*)

Hamzeh Mohtashamipour[1], Mehrzad Mesbah[1,2], Takavar Mohammadian[*1,2], Mansour Torfi Mozanzadeh[3], Anahita Rezaie[2,4], Mohammadreza Tabandeh[2,5]

[1] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[2] *Excellence Center of Warm Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[3] *Agriculture Research, Education and Extension, South Iran Aquaculture Research Center, Iran Fisheries Science Research Institution Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Ahvaz, Iran*
[4] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*
[5] *Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran*

Key Words
Fish meal
Plant protein
Digestive enzymes
Growth
Asian sea bass

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the effect of replacing fish meal with plant protein sources on growth performance, digestive enzymes activity and also introducing a diet suitable for cultured Asian sea bass species in terms of biological efficiency.

Materials & Methods: A total of 600 juveniles with an average weight of 54±2.5 gr was distributed in 15 tanks (500 liters) with a density of 40 pieces in each tank and were fed with prepared diets for 60 days. The composition of plant proteins (soybean meal, wheat gluten and corn gluten) was used at two levels of 35 and 70% to replace fish meal and the growth performance and activity of digestive enzymes were examined.

Result: The results showed that T1 (fish meal) and T2 (35% replacement) had the best performance in specific growth factor, weight gain percentage, relative growth rate, weight gain. Also, replacement of 70% fish meal with plant protein sources led to a significant reduction in specific growth rate, daily weight gain and relative growth rate compared to T1 ($P<0.05$). The results of gastrointestinal enzymes activity showed that the T4 (commercial 1) in alkaline phosphatase, lipase, α-amylase and the T2 in trypsin activity had a significant difference compared to other treatments ($P<0.05$).

Conclusion: It can be inferred that Asian sea bass can easily have good growth performance by replacing 35% fish meal with plant protein sources.

* Corresponding Author's email: t.mohammadian@scu.ac.ir
Received: 7 July 2021; Reviewed: 15 August 2021; Revised: 18 October 2021; Accepted: 9 November 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.303429.2634

مقاله پژوهشی

تاثیر جایگزینی پودر ماهی با منابع پروتئین‌های گیاهی بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcalifer*)

حمزه محتشمی‌پور[۱]، مهرزاد مصباح[۱،۲]، تکاور محمدیان[۱،۲]، منصور طرفی‌موزان‌زاده[۳]، آناهیتا رضایی[۴،۲]، محمدرضا تابنده[۵،۲]*

[۱] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

[٤] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[٥] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

کلمات کلیدی

پودر ماهی
پروتئین‌های گیاهی
آنزیم‌های گوارشی
رشد
ماهی باس دریایی آسیایی

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر پروتئین‌های گیاهی بر شاخص‌های رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و هم‌چنین معرفی جیره غذایی متناسب با گونه باس دریایی آسیایی پرورشی از نظر کارایی بیولوژیکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ٦۰۰ قطعه بچه ماهی با وزن متوسط ۲/۵±٥٤ گرم در ۱۵ مخزن پرورشی (۵۰۰ لیتری) با تراکم ٤۰ قطعه در هر مخزن توزیع و به‌مدت ٦۰ روز با جیره‌های تهیه شده تغذیه شدند. ترکیب پروتئین‌های گیاهی (کنجاله سویا، گلوتن گندم و گلوتن ذرت) بوده‌و دردو سطح ۳۵ و ۷۰ ٪ جهت‌جایگزینی پودرماهی استفاده شد وعملکردرشد وفعالیت آنزیم‌های گوارشی‌موردبررسی‌قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که فاکتورهای ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن، ضریب رشد نسبی و افزایش وزن روزانه در تیمار اول (پودر ماهی) و دوم (۳۵ درصد جایگزینی) دارای بهترین عملکرد بوده است. هم‌چنین جایگزینی ۷۰ درصد پودر ماهی با منابع پروتئین‌های گیاهی منجر به کاهش معنی‌داری در ضریب رشد ویژه، افزایش وزن روزانه و ضریب رشد نسبی نسبت به تیمار اول (پودر ماهی) شد (P<۰/۰۵). نتایج بررسی آنزیم‌های گوارشی بیان داشت که تیمار چهارم (تجاری ۱) در فاکتورهای آلکالین فسفاتاز، لیپاز، آلفا آمیلاز و تیمار دوم (۳۵ درصد جایگزینی) در فعالیت آنزیم ترپسین، اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها داشتند (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: براساس‌نتایج حاصل ماهی‌باس دریایی آسیایی به‌راحتی می‌تواند با جایگزینی۳۵ درصد پودرماهی با منابع پروتئین‌های گیاهی عملکرد رشد مناسبی را داشته باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: t.mohammadian@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱٦ تیر ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۲٤ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲٦ مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۸ آبان ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.303429.2634

مقدمه

پرورش آبزیان به‌عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود. چرا که با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، این صنعت سهم به‌سزایی در تامین نیازهای غذایی مردم را به عهده دارد. در این ارتباط کمبود منابع آب شیرین سبب شده که پرورش ماهیان دریایی به یکی از شاخه‌های بسیار مهم و درحال گسترش درصنعت آبزی‌پروری تبدیل شود. در سال ۲۰۰۰، تولید جهانی ماهی ۳۲/۴ میلیون تن و در سال ۲۰۰۸، ۵۲/۵ میلیون تن و این میزان در سال ۲۰۱۸ در حدود ۸۲/۱ میلیون تن بوده است که سهم آبزیان دریایی پرورشی ۳۰/۸ میلیون تن و سهم ماهیان دریایی پرورشی حدود ۷/۳ میلیون تن می باشد (۱). با افزایش روز افزون تولیدات آبزی‌پروری، نیاز برای پودر ماهی به‌دلیل کیفیت بالای غذایی در خوراک ماهی افزایش یافته است (۲). پودر ماهی به‌عنوان منبع اصلی پروتئین در رژیم‌های غذایی برای ماهیان محسوب می‌شود. این ماده به‌دلیل قابلیت هضم و پروفایل اسیدآمینه‌ای خوب از اهمیت بالایی برخوردار است (۳) با توجه به افزایش تقاضا برای این ماده و میزان ثابت برداشت و حتی سیر نزولی صید ماهی جهت تامین آن، سبب شده است تولید پودر ماهی کاهش یابد، به‌طوری‌که فائو برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ هشدار داد که ذخایر ماهیان دریایی بیش از حد مورد استفاده قرار گرفته است (۴). هزینه بالا و تامین ناپایدار پودر ماهی باعث شده است که تا راهکارهایی برای جایگزینی این ماده صورت پذیرد (۵). تحقیقات زیادی در این رابطه برای تعیین بهترین ماده با ارزش غذایی مشابه برای جایگزینی کامل یا جزئی پودر ماهی در رژیم‌های غذایی ماهیان پرورشی صورت گرفته است. تحقیقات نشان داده است که یکی بهترین منابع برای جایگزینی پودر ماهی، پروتئین‌های گیاهی هستند. تأیید شده است که پروتئین‌ها و روغن‌های گیاهی از منابع قابل اطمینان، در دسترس و جزو اقتصادی‌ترین و ارزان‌ترین گزینه‌های منابع پروتئینی هستند (۵، ۶). استفاده از پروتئین‌های گیاهی باید به گونه‌ای باشد که نیاز اسیدهای آمینه‌ای ماهی را تامین و منجر به کاهش خوش‌خوراکی غذا نشود. در صنعت آبزی‌پروری، هزینه خوراک ممکن است تا ۷۰ درصد از کل هزینه‌های تولید را تشکیل دهد. افزایش راندمان خوراک، به ویژه بهبود جذب متابولیک مواد مغذی رژیم غذایی، در تولیدات دامی امروزه از اولویت‌های بالایی برخوردار است. هرگونه کاهش در هزینه‌های تولید خوراک، بدون تأثیر بر راندمان آن، اثر مثبت مستقیمی بر سودآوری تولید آبزیان خواهد داشت (۷). گزارش شده است که ماهی باس دریایی ژاپنی به‌راحتی می‌تواند با رژیم غذایی دارای پودر ماهی با درصد پایین (۲۵٪ پودر ماهی) سازگاری پیدا کند. اما زمانی که این ماهی تنها با جیره پروتئین گیاهی تغذیه شد، مشکلاتی در متابولیسم مواد مغذی و وضعیت بهداشتی آن پدید آمد (۲). در مطالعه Santigosa و همکاران، مشاهده کردند که وقتی باس دریایی ژاپنی با پودر ماهی با درصد پایین تغذیه شود (۲۵ درصد پودر ماهی، رژیم غذایی تجاری در مزرعه) می‌تواند رژیم غذایی حاوی پروتئین گیاهی را در یک هفته بپذیرد (۸). Torrecillas و همکاران، دریافتند که می‌توان میزان پودر ماهی را تا ۱۰ درصد و میزان روغن ماهی را تا سه درصد در رژیم‌های غذایی غالباً گیاهی، بدون تأثیر بر عملکرد رشد بچه ماهی باس دریایی اروپایی کاهش داد (۹). به‌طور مشابه، به‌نظر می‌رسد که جایگزینی ترکیب پودر ماهی و روغن ماهی با ترکیب پروتئین‌های گیاهی و روغن گیاهی تا ۷۰ درصد در چندین گونه ماهی دریایی تأثیر سویی بر عملکرد رشد یا استفاده از خوراک نداشته است، اما باید تعادل میان اسیدهای چرب امگا۳ و امگا ۶ رعایت شود. در پژوهشی Jalili و همکاران، مشاهده کردند که جایگزینی ۴۰ درصد پودر ماهی با منابع گیاهی اثرات منفی معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و کارایی غذا در بین تیمارهای مختلف ماهی قزل‌آلا نداشت (۱۰). هم‌چنین آنان بیان کردند که جایگزینی ۷۰ و ۱۰۰ درصد پودر ماهی با منابع گیاهی باعث کاهش معنی‌دار وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و ضریب کارایی پروتئین و چربی در مقایسه با گروه شاهد داشت ($P<0/05$)(۱۰). ماهی باس دریایی آسیایی از ماهیان با ارزش دریایی بوده که با نام باراموندی شناخته می‌شود؛ از گونه مهم و تجاری آبزی‌پروری جنوب‌شرق آسیا، که به‌میزان زیادی در استرالیا، تایلند و اندونزی پرورش داده می‌شود (۱۱). دامنه پراکنش این ماهی از اقیانوس هند شمالی تا اقیانوس آرام غربی می‌باشد و از ایران تا قسمت شمالی استرالیا گسترش یافته و در دمای اپتیمم ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد پرورش داده می‌شود (۱۲). در ۱۵ سال گذشته تولید ماهی باس دریایی آسیایی در استرالیا به‌طور پیوسته افزایش یافته است و این روند قابل پیش‌بینی هم‌چنان نیز ادامه دارد (۱۳، ۱۴). سازش‌پذیری با غذای دستی، تکثیر در شرایط اسارت، نرخ رشد سریع (نرخ رشد ماهی سی باس در مراحل اولیه زندگی کم بوده اما از وزن ۳۰ گرم رشد سریع این ماهی شروع شده و بعد از رسیدن به وزن ۴ کیلوگرم کاهش پیدا می‌کند) و قیمت بالای محصول در بازار به واسطه کیفیت بالای گوشت از عواملی است که ماهی باس دریایی آسیایی را به یک گونه مناسب برای آبزی‌پروری تبدیل می‌کند (۱۵، ۱۶، ۱۴). با توجه به کمبود پودر ماهی و اهمیت جایگزینی آن با منابع پروتئین‌های گیاهی در جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی، هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر جایگزینی پودر ماهی توسط پروتئین‌های گیاهی و معرفی یک جیره مناسب در مقایسه با جیره‌های تجاری که درصنعت آبزی پروری کشور مورد استفاده قرار می‌گیرند

بر شاخص‌های رشد، کارایی تغذیه و فعالیت برخی از آنزیم‌های گوارشی در ماهی باس دریایی آسیایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره‌های غذایی: در این آزمایش از ترکیب منابع پروتئین گیاهی شامل کنجاله سویا، گلوتن ذرت و گلوتن گندم در ۲ سطح ۳۵ و ۷۰ درصد جایگزینی پودر ماهی در جیره استفاده شد، هم‌چنین از ترکیب روغن‌ها (روغن ماهی، روغن سویا و روغن لیسیتین) نیز استفاده شد. منابع پروتئین جیره در تیمار ۱ (پودر ماهی)، تیمار ۲ (۳۵درصد جایگزینی پودر ماهی توسط پروتئین گیاهی)، تیمار ۳ (۷۰ درصد جایگزینی پودر ماهی توسط پروتئین گیاهی)، تیمار ۴ (جیره تجاری ۱) و تیمار ۵ (جیره تجاری ۲) بود. پس از تهیه اقلام مورد نیاز از مراکز معتبر جهت ساخت جیره‌های غذایی و آنالیز بیوشیمیایی اجزای غذایی، اقدام به جیره نویسی با نرم‌افزار WUFFDA ورژن ۲.۱ با در نظر گرفتن نیازهای تغذیه‌ای ماهی باس دریایی آسیایی شد. پس از تنظیم جیره‌ها، اجزای غذایی با هم ترکیب و به‌حالت خمیری درآمده و سپس با استفاده از چرخ‌گوشت به‌صورت پلت درآمدند. پلت‌ها با توجه به سایز دهان ماهی به پلت‌هایی با اندازه مطلوب تبدیل شدند. پس از آن در انکوباتور با دمای ۳۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶-۸ ساعت خشک و تا هنگام استفاده در یخچال با دمای تقریبی ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پلت‌های آماده شده به منظور عدم از دست دادن خواص احتمالی مکمل‌های غذایی عملیات جیره‌سازی به ترتیب فوق هر ۱۵ روز یک‌بار انجام شد.

ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی: میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر جیره‌های آزمایشی به‌روش AOAC، مورد سنجش قرار گرفتند (۱۷). برای تعیین میزان رطوبت، نمونه مورد نظر توزین شده در داخل پتری‌دیش قرار داده شده، سپس در داخل آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت پتری‌دیش‌ها از آون خارج شده و دوباره وزن شدند. با محاسبه اختلاف وزن به‌دست‌آمده درصد رطوبت مشخص شد. میزان خاکستر نمونه‌ها با سوزاندن نمونه در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ساعت اندازه‌گیری شد. پروتئین کل با استفاده از دستگاه کجلدال اتوماتیک (Kjeltec^{TM}2300, Foss, Sweden) با ضرب میزان نیتروژن به‌دست آمد در عدد ۶/۲۵ محاسبه شد و هم‌چنین چربی کل جیره‌های آزمایشی و ماهیان نیز با استفاده از دستگاه سوکسله (Soxtec system) اندازه‌گیری شد.

جدول۱: اجزای تشکیل‌دهنده و آنالیز تقریبی جیره تهیه شده در پژوهش حاضر (٪)

	تیمار ۱ (پودر ماهی)	تیمار ۲ (۳۵٪جایگزینی)	تیمار ۳ (۷۰٪جایگزینی)	تیمار ۴ (تجاری۱)	تیمار ۵ تجاری۲)
رطوبت	۸.۲۸	۸.۳۶	۸.۴۵	۸.۸	۸.۶۲
پروتئین کل	۴۷.۶۹	۴۷.۴۱	۴۷.۱۴	۴۷.۵	۴۷.۳۴
چربی کل	۱۶.۸	۱۶.۴۷	۱۶.۲	۱۶.۸۷	۱۶.۴
خاکستر	۱۴.۵۷	۱۴.۶	۱۴.۲۱	۱۴.۹	۱۴.۳۴
کربوهیدرات	۱۲.۶۶	۱۳.۱۶	۱۴	۱۱.۹۳	۱۳.۳
انرژی ناخالص (kcal/g)	۴.۱۶	۴.۱۲	۴.۰۲	۴.۱	۴.۰۴

شرایط نگه‌داری و تغذیه ماهی‌ها: تعداد ۶۰۰ قطعه بچه‌ماهی باس دریایی آسیایی با وزن متوسط ۲/۵±۵۴ گرم از مرکز تکثیر راموز واقع در بوشهر تهیه و توسط تانکر حمل ماهی مجهز به اکسیژن به مرکز تحقیقاتی ماهیان دریایی جنوب کشور در بندر امام انتقال داده شد و پس از سازگاری ۲ هفته‌ای برای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بچه‌ماهی‌ها به‌صورت کاملاً تصادفی به ۵ تیمار در ۳ تکرار (۱۵ مخزن ۵۰۰ لیتری) تقسیم شدند، به‌طوری‌که هر تکرار شامل ۴۰ قطعه بچه‌ماهی بود. طول دوره تحقیق بدون احتساب دو هفته سازگاری، ۶۰ روز بود. به‌منظور تأمین اکسیژن مورد نیاز ماهیان، درون هر مخزن سه عدد سنگ هوا متصل به هواده مرکزی قرار داده شد. دوره‌ی نوری در زمان انجام تحقیق به‌صورت ۱۰-۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲-۱۰ ساعت تاریکی درنظر گرفته شد. هم‌چنین غذادهی ماهیان برحسب درصد وزن ماهی و روزانه در ۳ نوبت انجام پذیرفت. در طی دوره پرورش PH آب ورودی ۰/۲±۷.۳، دمای آب ۰/۵±۲۶ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۰/۳±۸.۲ در نظر گرفته شد.

شاخص‌های رشد: زیست‌سنجی ماهیان جهت محاسبه شاخص‌های رشد و تغذیه‌ای و مقایسه بین تیمارها در انتهای آزمایش با استفاده از ۹ قطعه ماهی از هر تیمار صورت گرفت. هم‌چنین این شاخص‌ها با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

افزایش وزن بدن: وزن نهایی- وزن اولیه

ضریب رشد نسبی: ((وزن ثانویه - وزن اولیه)/ وزن اولیه) × ۱۰۰

ضریب رشد ویژه : (گاریتم طبیعی وزن نهایی- لگاریتم طبیعی وزن اولیه / دوره پرورش) × ۱۰۰
فاکتور وضعیت: (طول کل ماهی(سانتی‌متر)/ وزن نهایی (گرم))×۱۰۰
ضریب تبدیل غذایی: غذای خورده شده (گرم)/ وزن به‌دست آمده (گرم)
درصد افزایش وزن: وزن نهایی/ وزن اولیه × ۱۰۰
ضریب کارایی پروتئین: افزایش وزن / پروتئین مصرف شده
ضریب کارایی تغذیه‌ای : افزایش وزن بدن / غذای مصرفی

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گوارشی : بدین‌منظور ابتدا از هر تیمار ۹ قطعه ماهی با استفاده از سوزن قطع نخاع شدند، سپس اقدام به کالبدگشایی و جداسازی روده شد (۱۸). نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش (یک هفته پس از نمونه گیری) در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تهیه عصاره آنزیمی و سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز (۱۹، ۲۰)، تریپسین (۲۰)، کیمو تریپسین (۲۱)، پروتئاز (۲۲)، آلکالین فسفاتاز (۲۳) و لیپاز (۲۰) با روش‌های ذکر شده مورد سنجش قرارگرفت. برای این‌کار نمونه‌های منجمد شده، پس از خارج شدن از فریزر ۷۰-توسط ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین گردید و قبل از ذوب شدن کامل، به نسبت ۱ به ۹ (w/v) با بافر همگن‌سازی(Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Triton X-100 ۰/۱ درصد، pH=۷/۸) مخلوط شده، نمونه‌ها توسط هموژنایزر الکتریکی (مدل D 500) هموژن شدند (۲۴، ۲۵). سپس محصول هموژن شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل Z36HK) در چهار درجه سانتی‌گراد و g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. در نهایت از مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد. از آن‌جائی‌که محاسبه دقیق مقدار بافت و یکسان سازی آن، بین نمونه‌های مختلف عملاً دارای دقت کامل نمی‌باشد لذا فعالیت آنزیم براساس واحد در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه (U/mgprotein.min-1) به‌عنوان فعالیت اختصاصی یا فعالیت ویژه (specific activity) بیان شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از دی نیترو سالسیلیک اسید به‌عنوان معرف و از نشاسته یک درصد به‌عنوان سوبسترا برای شناسایی مالتوز استفاده شد، سپس در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. برای تعیین فعالیت آنزیم تریپسین از ان- بنزوئیل- ال- آرژنین اتیل استر به‌عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت و در طول موج ۲۵۳ نانومتر قرائت شد. هم‌چنین برای اندازه‌گیری کیموتریپسین از بنزوئیل-ال-تیروزین اتیل استر (BTEE) به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. جهت اندازه‌گیری آنزیم پروتئاز از کازئین یک درصد به‌عنوان سوبسترا و جذب نوری با طول موج ۲۸۰ استفاده شد. برای سنجش آنزیم لیپاز از امولسیون روغن زیتون آزمایشگاهی به‌عنوان سوبسترا و محلول تیمول فتالئین به‌عنوان معرف استفاده گردید و درنهایت توسط محلول هیدروکسیدسدیم تیتراسیون صورت گرفت.

آنالیز آماری: نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون shapiro wilk انجام گردید و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way Anova) استفاده شد، هم‌چنین مقایسه میانگین بین تیمارها براساس پس آزمون دانکن (Duncan's Multiple range Test) انجام شد و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد در جدول ۲ ارائه شده است. بررسی فاکتور وضعیت نشان داد که در پایان آزمایش، هیچ اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت (P>۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار درصد افزایش وزن مربوط به تیمار اول و دوم بود، به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای سوم و پنجم داشت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین مقدار ضریب رشد ویژه مربوط به تیمار اول، دوم و چهارم بوده که اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمارهای سوم و پنجم دارند (P<۰/۰۵). پایین‌ترین میزان شاخص ضریب تبدیل غذایی مربوط به تیمار دوم بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار پنجم داشت (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان ضریب کارایی پروتئین و ضریب کارایی تغذیه‌ای در تیمار دوم و کم‌ترین میزان در تیمار پنجم مشاهده شد، که تنها بین بیش‌ترین و کم‌ترین میزان، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها در رابطه با افزایش وزن روزانه و ضریب رشد نسبی نشان داد که تیمارهای اول، دوم و چهارم دارای بیش‌ترین افزایش وزن‌گیری روزانه بود، این در حالی است که تیمار سوم و پنجم کم‌ترین وزن‌گیری روزانه را از خود نشان دادند. شایان ذکر است این اختلاف بین بیش‌ترین و کم‌ترین میزان به‌صورت معنی‌داری تفاوت داشتند (P<۰/۰۵). نتایج در ارتباط با آنزیم کیموتریپسین نشان داد که تیمار سوم با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیش‌ترین میزان را به خود اختصاص داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین کم‌ترین میزان آنزیم کیموتریپسین مربوط به تیمارهای اول و پنجم بود. آنالیز داده‌ها در ارتباط با آنزیم آلکالین فسفاتاز بیان داشت که تیمار چهارم بیش‌ترین میزان را دارا بوده و با تیمار اول و پنجم اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از بررسی آنزیم لیپاز حاکی از آن داشت که تیمار چهارم بیش‌ترین میزان را داشت و با تیمار سوم و دوم اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین مشاهده شد که آنزیم تریپسین در تیمار اول بیش‌ترین مقدار را داشته که با تیمارهای سوم، چهارم و

پنجم اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). آنالیز داده‌های آنزیم آلفا آمیلاز در پایان این تحقیق بیان داشت که تیمار چهارم بالاترین میزان و با تیمار اول، سوم و پنجم اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج آنالیز آنزیم پروتئاز نشان داد که بیش‌ترین میزان در تیمار چهارم مشاهده شد و نسبت به تیمارهای سوم و پنجم دارای اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار شاخص‌های رشد ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف

پارامترها	زمان	تیمار ۱ (پودر ماهی)	تیمار ۲ (۳۵٪جایگزینی)	تیمار ۳ (۷۰٪جایگزینی)	تیمار ۴ (تجاری۱)	تیمار ۵ (تجاری۲)
فاکتور وضعیت	۰تا۶۰	$۱.۴۶±۰.۰۵^{A}$	$۱.۳۴±۰.۲۲^{A}$	$۱.۳۳±۰.۰۴^{A}$	$۱.۴۱±۰.۰۳^{A}$	$۱.۴۳±۰.۰۲^{A}$
درصد افزایش وزن	۰تا۶۰	$۲۵۱.۰۷±۱۶.۳^{A}$	$۲۳۰.۲۳±۵۰.۱۸^{A}$	$۱۶۲.۰۷±۱۲.۸۷^{BC}$	$۲۱۶.۳۶±۴.۴۷^{AB}$	$۱۵۷.۱۴±۱.۱۴^{C}$
ضریب رشد ویژه	۰تا۶۰	$۲.۰۹±۰.۰۷^{A}$	$۱.۹۷±۰.۲۵^{A}$	$۱.۶±۰.۰۸^{B}$	$۱.۹۱±۰.۰۲^{A}$	$۱.۵۷±۰.۰۰۷^{B}$
ضریب تبدیل غذایی	۰تا۶۰	$۱.۴۵±۰.۰۷^{AB}$	$۱.۲۵±۰.۱۴^{A}$	$۱.۴۸±۰.۰۵^{AB}$	$۱.۴۹±۰.۰۹^{AB}$	$۱.۸۱±۰.۰۳^{C}$
ضریب کارایی پروتئین	۰تا۶۰	$۱.۴±۰.۰۶^{AB}$	$۱.۶۴±۰.۱۹^{A}$	$۱.۳۸±۰.۰۵^{AB}$	$۱.۳۷±۰.۰۸^{AB}$	$۱.۱۲±۰.۰۲^{B}$
افزایش وزن روزانه	۰تا۶۰	$۲.۲۷±۰.۱۵^{A}$	$۲.۰۸±۰.۴۴^{A}$	$۱.۴۶±۰.۱۱^{B}$	$۱.۹۲±۰.۰۱^{A}$	$۱.۴۱±۰.۰۰۷^{B}$
ضریب کارایی تغذیه‌ای	۰تا۶۰	$۶۸.۹۷±۳.۳۴^{AB}$	$۸۰.۵۷±۹.۵۶^{A}$	$۶۷.۶۳±۲.۵۸^{AB}$	$۶۷.۱۵±۴^{AB}$	$۵۵.۱۴±۱.۰۲^{B}$
ضریب رشد نسبی	۰تا۶۰	$۲۵۱.۰۷±۱۶.۳^{A}$	$۲۳۰.۲۳±۵۰.۱۸^{A}$	$۱۶۲.۰۷±۱۲.۸۷^{B}$	$۲۱۶.۳۶±۴.۴۷^{A}$	$۱۵۷.۱۴±۱.۱۴^{B}$

*حروف غیرهمنام در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول۳: مقایسه میانگین و انحراف معیار شاخص‌های آنزیم‌های گوارشی ماهی باس دریایی آسیایی در تیمارهای مختلف

پارامترها	تیمار ۱ (پودر ماهی)	تیمار ۲ (۳۵٪جایگزینی)	تیمار ۳ (۷۰٪جایگزینی)	تیمار ۴ (تجاری۱)	تیمار ۵ (تجاری۲)
کیموتریپسین	$۰.۰۵±۰.۰۰۹^{C}$	$۰.۱۳±۰.۰۴^{B}$	$۰.۲۹±۰.۱۱^{A}$	$۰.۱۵±۰.۰۷^{B}$	$۰.۰۹±۰.۰۳^{C}$
آلکالین فسفاتاز	$۱.۴۶±۰.۵۸^{B}$	$۲.۵۵±۱.۰۹^{AB}$	$۲.۵۹±۱.۰۶^{AB}$	$۳.۰۹±۱.۴۴^{A}$	$۱.۵۲±۰.۴۶^{B}$
لیپاز	$۲۶۴.۲۴±۸۵.۱۳^{AB}$	$۱۵۴.۲۳±۴۷.۵۱^{B}$	$۱۲۵.۰۱±۴۷.۱۲^{B}$	$۲۷۷.۴۶±۷۳.۱۵^{A}$	$۱۶۸.۵۸±۴۸.۶۳^{AB}$
تریپسین	$۱۶۲۳.۷۷±۴۳۵.۳۸^{A}$	$۱۳۵۶.۴±۸۳.۸۸^{AB}$	$۲۸۵.۳۲±۷۶.۳۴^{C}$	$۵۴۴.۵۱±۱۵۵^{C}$	$۸۱۸.۸۶±۲۷۸.۳۸^{BC}$
آلفا آمیلاز	$۰.۴۹±۰.۱۷^{C}$	$۱.۲۹±۰.۱۹^{AB}$	$۱.۰۱±۰.۲۷^{B}$	$۱.۷۶±۰.۵۲^{A}$	$۰.۹۹±۰.۳۲^{B}$
پروتئاز	$۱۳.۵۷±۳.۷۱^{AB}$	$۱۰.۹±۱.۹^{AB}$	$۹.۴۳±۳.۱^{B}$	$۱۵.۷۷±۵.۲۵^{A}$	$۹.۵۹±۲.۷۵^{B}$

*حروف غیرهمنام در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

بحث

نگرانی‌های زیست محیطی اخیر در مورد افزایش آلودگی آب‌های جاری حاصل از آبزی‌پروری و هم‌چنین کاهش ذخایر آبزیان و افزایش نیاز جامعه بشری به پروتئین، دانشمندان را بر آن داشته که راهکارهایی در توسعه استراتژی برای بهبود دسترسی به مواد مغذی در رژیم غذایی جانوران پرورشی بیابند. در این مطالعه مشاهده شد که تیمار اول (پودر ماهی)، دوم (۳۵ درصد جایگزینی) و چهارم (تجاری ۱) بهبود معنی‌داری در اکثر شاخصه‌های رشدی اندازه‌گیری شده در این تحقیق از خود نشان داد. ضریب تبدیل غذایی در تیمار دوم (۳۵ درصد جایگزینی) بهترین ضریب تبدیل غذایی را دارا بود. با جایگزینی پودر ماهی توسط پروتئین‌های گیاهی تا سطح ۳۵ درصد در جیره غذایی آیتم‌های ضریب رشد نسبی، ضریب رشد ویژه و افزایش وزن روزانه، افزایش معنی‌داری نسبت به سطح ۷۰ درصد جایگزینی را از خود نشان دادند. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه Movahedrad و همکاران (۲۶) و Haghbayan و همکاران (۲۷) در جایگزینی پودر ماهی با آردسویا در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطابقت داشت به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان افزایش‌وزن بدن و کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار ۵۰ درصد جایگزینی سویا مشاهده شد. Wang و همکاران، نشان دادند که استفاده از پروتئین کنسانتره سویا حاوی مکمل لایزین و متیونین در جیره غذایی میش‌ماهی زرد بزرگ (*Larimichthys cocea*) می‌تواند بدون تاثیر منفی بر عملکرد رشد به‌طور کامل جایگزین پودر ماهی در غذا شود. برخلاف نتایج حاضر، جایگزینی آرد ماهی تا ۳۰ درصد با پروتئین سویای تخمیر شده و کنجاله سویا در جیره بچه‌ماهی شانک زرد باله (*Acanthopagrus latus*)، تاس ماهی سیبری و بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) تفاوت معنی‌داری در میزان وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و نرخ بقاء مشاهده نگردید (۲۹، ۳۰). در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌داری در جایگزینی ۳۵ درصد با ۷۰ درصد در میزان ضریب کارایی پروتئین، ضریب رشد ویژه، افزایش وزن و درصد افزایش وزن در طول آزمایش مشاهده شد. احتمالاً می‌تواند

به‌دلیل کاهش خوش‌خوراکی غذا، کمبود اسیدآمینه ضروری، کمبود فسفر، اختلال در متابولیسم چربی و وجود گسترده مواد ضدتغذیه‌ای در پروتئین‌های گیاهی باشد (۲۶، ۳۱). در مجموع علت بالاتر بودن شاخص‌های رشد مانند ضریب رشدویژه، درصدافزایش وزن و افزایش وزن در تیمار اول در مقایسه با جیره‌های جایگزینی می‌توان به عدم وجود عوامل ضدتغذیه‌ای، عدم کمبود اسیدهای آمینه ضروری، وجود طعم‌دهنده‌ها و خوش‌خوراکی پودر ماهی نسبت داد. در این مطالعه سطوح جایگزینی پروتئین گیاهی به‌جای پودر ماهی تاثیر منفی بر شاخص‌های رشد ماهی باس دریایی جوان نداشت حتی در برخی از شاخص‌های رشد مانند ضریب تبدیل غذایی، ضریب کارایی پروتئین و ضریب کارایی تغذیه‌ای در تیمار دوم (۳۵ درصد جایگزینی) نسبت به تیمار اول (پودر ماهی) بهبود مشاهده شد. امروزه پروتئین‌های گیاهی، ماده‌غذایی پیشرو در جیره غذایی آبزیان محسوب می‌گردند، به‌طوری‌که جایگزینی ۳۵ درصد پروتئین گیاهی باعث بهبود شاخص‌های رشد در ماهی باس دریایی آسیایی شد که هم‌سو با مطلعه حاضر Mamauaga و همکاران، بر روی ماهی کفشک ژاپنی به‌نتایج مشابهی دست یافتند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی به‌ویژه پروتئاز، آلکالین فسفاتاز، تریپسین، کیموتریپسین، آمیلاز و لیپاز برای بررسی فرآیند گوارش مهم است و اطلاعات مربوط به ظرفیت کامل گوارش و استفاده از موادمغذی در گونه‌های ماهی را فراهم می‌کند که ممکن است تأثیر بالقوه‌ای بر استفاده از خوراک و عملکرد رشد داشته باشند. تغییرات غذا و مکمل‌های غذایی می‌تواند بر تولید آنزیم‌های گوارشی درون‌زاد و برون‌زاد موثر باشد (۳۳). در ابتدا لازم به ذکر است که نتایج فعالیت آنزیم‌های گوارشی و عملکرد رشد هم‌خوانی و هم بستگی موردانتظار را نداشتند، اما افزایش فعالیت آنزیم‌های لیپاز، تریپسین، پروتئاز و آمیلاز در روده و ضمائم پیلوریک در تیمار دوم (۳۵ درصد جایگزینی) نسبت به تیمار سوم (۷۰ درصد جایگزینی) دیده شد. احتمالاً این چنین می‌توان استنباط کرد که سیستم گوارشی ماهیان تغذیه شده با ۳۵ درصد جایگزینی توانسته‌اند با پروتئین‌های گیاهی موجود در جیره سازگاری پیدا کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهد پروتئین‌های گیاهی (گلوتن ذرت و گلوتن گندم) حاوی لایزین و متیونین می‌تواند جایگزین پروتئین پودر ماهی در جیره ماهی باس دریایی آسیایی بدون تاثیر منفی بر عملکرد آنزیم‌های لیپاز، تریپسین و آمیلاز شود، ولی با افزایش سطح جایگزینی (از ۳۵ درصد به ۷۰ درصد) کاهش فعالیت آنزیم‌ها مشاهده شد. هم‌سو با مطالعه حاضر Wang و همکاران، در میش ماهی زرد بزرگ (۲۸) و Movahedrad و همکاران، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۲۶) نتایج مشابهی را به‌دست آوردند. وجود مواد ضدتغذیه‌ای در منابع گیاهی موجب مهار سیستم آنزیمی و کاهش هضم مواد غذایی می‌شود (۳۴). احتمالاً کاهش فعالیت آنزیم پروتئازی در مطالعه حاضر می‌تواند تحت تاثیر کیفیت، مقدار مواد مغذی، حضور مواد ضدتغذیه‌ای تا ۷۰ درصد جایگزینی پروتئین‌های گیاهی به‌جای پودر ماهی در جیره غذایی ماهی باس دریایی آسیایی باشد. هم‌سو با مطالعه حاضر Krogdahl و همکاران، نشان داد فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پرزهای غشاء و درون سلول‌های جذب کننده روده در ماهی آزاد اقیانوس اطلس تحت تاثیر سطوح کنجاله سویا در رژیم غذایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که با تغییرات مورفولوژیک روده، هضم ظاهری و اختلالات جذب همراه بود (۳۵). هم‌چنین Trejo Escamilla و همکاران، در جایگزینی آرد ماهی با بیش از ۴۵ درصد پروتئین سویای کنسانتره در جیره میش ماهی فعالیت آنزیم‌های پانکراتیک و پرزهای غشاء روده به‌طور پیوسته کاهش یافت (۳۶). مطالعه انجام شده توسط Lin و Lou، نشان داد افزایش سطح کنجاله سویای جیره فرآیند گوارشی را در ماهی هیبرید تیلاپیا تحت تاثیر قرار داده و سبب کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز گردید. نتایج نشان داد جایگزینی پودر ماهی با پروتئین گیاهی در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و بچه‌ماهی شانک زرد باله تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های لیپاز و آمیلاز نداشت و تنها در جایگزینی با سطوح بالا موجب کاهش فعالیت آنزیم لیپاز گردید. در مطالعه حاضر میزان تریپسین در تیمار دوم (۳۵ درصد جایگزینی) نسبت به تیمارهای تجاری برخلاف Robaina و همکاران (۳۸) و Zaertabar و همکاران (۳۹)، افزایش فعالیت معنی‌داری را نشان داد. آنزیم آلکالین فسفاتاز یکی از آنزیم‌های مهم در مرحله نهایی هضم بوده و در غشا نوار مسواکی (Brush border) روده قرار دارد، لذا با توجه به اهمیت آن در پژوهش حاضر مورد سنجش قرار گرفت و مشاهده شد که در تیمارهای جایگزینی پروتئین‌های گیاهی در کل آزمایش اختلاف معنی‌داری با گروه‌های تجاری نداشت. اگرچه در مخالفت با نتایج ما، Zaertabar و همکاران (۳۹)، Silva و همکاران (۴۰) و Ahmadifard و همکاران (۴۱) کاهش معنی‌داری در تیمارهای جایگزین نسبت به تیمار شاهد مشاهده کردند، هم‌چنین در مطالعه Tibaldi و همکاران (۴۲) و Krogdhal و همکاران (۳۵) نیز کاهش فعالیت این آنزیم در تیمار تغذیه شده با پودر سویا گزارش کردند. با بررسی فعالیت آنزیم لیپاز در پژوهش حاضر، افزایش معنی‌داری در تیمار چهارم (تجاری ۱) نسبت به ۳۵ و ۷۰ درصد جایگزینی مشاهده شد و تیمار اول (پودر ماهی) اختلافی با گروه‌های تجاری نداشت. نتایج مطالعه Zaertabar و همکاران در بچه‌ماهی آزاد دریای خزر (۳۹) و Farhoudi در ماهی باس دریایی آسیایی (۴۳) هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر بود که احتمالا کاهش این آنزیم تحت تاثیر فاکتورهای ضد تغذیه‌ای و اثر بر آنزیم‌های پانکراسی در تیمارهای جایگزینی بیش‌تر می‌توان عنوان نمود. بالا بودن فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار چهارم را احتمالاً به‌دلیل استفاده از افزودنی‌ها و تکنیک ساخت اکسترود در

کارخانه نسبت داد، چرا که تیمار چهارم (تجاری ۱) باعث افزایش نسبی فعالیت آنزیم گوارشی در ماهیان شده است. آلفا آمیلاز از دسته آنزیم‌های آمیلولیتیک بوده و منجر به تجزیه نشاسته و تولید مالتوز می‌شود، ولی بر سایر فرم‌های کربوهیدرات تاثیر کمی دارد. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در تیمار چهارم (تجاری ۱) بیش‌ترین فعالیت آنزیم مشاهده شد و با تیمارهای جایگزینی اختلاف معنی‌داری داشت. هم‌سو با مطالعه حاضر Kumar و همکاران (۴۴) نتایج مشابهی را مشاهده کردند، اگرچه Farhoudi (۴۳)، Palmaganio و همکاران (۴۵) و Zaertabar و همکاران (۳۹) در مخالفت با نتایج حاضر، افزایش این آنزیم را گزارش کردند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر سطح ۳۵ درصد جایگزینی پروتئین‌های گیاهی به‌جای پودر ماهی تاثیر منفی بر شاخص‌های رشد ماهی باس دریایی جوان نداشت. هم‌چنین جیره غذایی در سطح ۳۵ درصد جایگزینی پروتئین‌های گیاهی به‌جای پودر ماهی باعث افزایش برخی فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند تریپسین نسبت به سطح ۷۰ درصد شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، احتمالاً این سطح از جایگزینی می‌تواند از لحاظ اقتصادی و استفاده در کارخانه‌های تولیدکننده خوراک ماهی مفید واقع شود.

تشکر و قدردانی

این کار با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (شماره قرارداد پژوهانه: SCU.VC99.299) و قطب علمی ماهیان گرمابی، دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد. نویسندگان این تحقیق از دستورالعمل‌های دانشگاهی تبعیت کردند و آزمایش‌ها براساس رعایت دستورالعمل اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی انجام پذیرفت.

منابع

1. **FAO. 2020.** The state of world fisheries and aquacultures. SOFIA, Rome, Italy. 150 p.
2. **Zhanga, Y., Chenb, P., Liangb, X.F., Hanc, J., Wub, X.F., Yanga, Y.H. and Xueb, M., 2019.** Metabolic disorder induces fatty liver in Japanese seabass, Lateolabrax japonicas fed a full plant protein diet and regulated by cAMP-JNK/NF-kBcaspase signal pathway. Elsevier. Fish and Shellfish Immunology. 90: 223-234. Doi: 10.1016/j.fsi.2019.04.060
3. **Sookying, D., Davis, D.A. and Soller Dias da Silva, F., 2013.** A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei. Aquac. Nutr. 19: 441-448.
4. **Katya, K., Park, G., Bharadwaj, A., Browdy, C., Anon, V. and Bai, S.C., 2018.** Organic acids blend as dietary antibiotic replacer in marine fish olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture Research. 49(10): 1-8. DOI:10.1111/are.13749
5. **Hardy, R.W., 2010.** Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research. 41:* 770-776.
6. **Tacon, A.G.J. and Metian, M., 2008.** *Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture. 285: 146-158*
7. **Ibrahem, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S. and Abd El Aty, A.M., 2010.** Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immun. 29: 241-246.
8. **Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. and Gallardo, M.A., 2008.** Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream *(Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. Aquaculture. 282: 68-74.
9. **Torrecillas, S., Robaina, L., Caballero, M.J., Montero, D., Calandra, G., Mompel, D., Karalazos, V., Kaushik, S. and Izquierdo, M.S., 2017.** Combined replacement of fishmeal and fish oil in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Production performance, tissue composition and liver morphology. Aquaculture. 474: 101-112.
10. **Jalili, R., Agh, N., Noori, F. and Imani, A., 2013.** Effects of replacing fish meal and fish oil with plant sources in the diet of rainbow trout (*Oncorhynshus mykiss*). Journal of Fisheries. 66(2): 119-131. (In Persian)
11. **Larson, H., 1999.** Order Perciformes. Suborder Percoidei. Centropomidae. Sea perches. 2429-2432.
12. **Tian, X. and Qin, J.G., 2003.** A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi, *Lates calcarifer*. Aquaculture 224: 169-179.
13. **Thirunavukkarasu, A.R., Abraham, M. and Kailasam, M., 2004.** Handbook of seed production and culture of Asian seabass, Lates calcarifer (Bloch), CIBA, Bulletin. 18: 1-58.
14. **Boonyaratpalin, M. and Williams, K., 2002.** Asian seabass Lates calcarifer. In: Webster, C.D. and Lim, C., (Eds.), Nutrient requirements and feeding of finfish for Aquaculture, CAB Publishing. 40-50
15. **Mathew, G., 2009.** Taxonomy, identification and biology of Seabass (*Lates calcarifer*). National Training on 'Cage Culture of Seabass' held at CMFRI, Kochi. 14-23 December.
16. **Singh, R.K., 2000.** Growth, survival and production of *Lates calcarifer* in a seasonal rain-fed coastal pond of the Konkan region. Aquaculture. 8: 55-60.
17. **Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005.** Official Methods of Analysis, 18th ed. AOAC international, Gaithersburg, Maryland, USA.
18. **Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M., Ghorbanpoor, M. and Gharibi, D., 2017.** Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ongrowth performance, gut microbial flora and digestive enzymes activities in *Tor grypus* (Karaman, 1971). Iran. J. Fish. Sci. 16: 296-317.
19. **Bernfeld, P., 1951.** Amylases α and β. In methods in enzymology. Vol. 1 (Colowick, P. and Kaplan, N.O., eds). New York: Academic press. 149-157.
20. **Worthington, C.C., 1991.** Worthington. manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold, New Jerse. 80-85.
21. **Hummel, B. C., 1959.** A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. Canadian journal of biochemistry and physiology. 37(12): 1393-1399.
22. **Walter, H.E., 1984.** *Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as* ubstrates. In: Bergmeyer, H.U., Ed. Methods of Enzymatic Analysis. Vol. V. Verlag Chemie, Weinheim. 270-277.

23. **Crane, R.K., Boge, G. and Rigal, A., 1979.** Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 554(1): 264-267.

24. **Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J. and Venturini, G., 2002.** In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82(6): 644-654.

25. **Cahu, C.L., Infante, J.Z., Quazuguel, P. and Le Gall, M.M., 1999.** Protein hydrolysate vs fish meal in compound diets for 10-day old sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. 171(1-2): 109-119.

26. **Movahedrad, F., Hajimoradloo, A., Zamani, A. and Kolangi, H., 2017.** Effect of dietary fish meal replacement by AquPro (Processed soybean meal) on growth performance and digestive enzymes activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Iranian Scientific Fisheries Journal. 27(2): 47-59. (In Persian)

27. **Haghbayan, S., Shamsaie, M., Eila, N., Abdolahtabar, S.Y., Bozorg Zadeh, P. and Rezaie, D., 2015.** Effects of dietary soybean meal (HP310) source on growth performance and blood parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries. 68(2): 209-223. (In Persian)

28. **Wang, P., Zhu, J., Feng, J., He, J., Lou, Y. and Zhou, Q., 2017.** Effects of dietary soy protein concentrate meal on growth, immunity, enzyme activity and protein metabolism in relation to gene expression in large yellow croaker *(Larimichthys crocea).* Aquaculture. 477: 15-22.

29. **Ehsani, J., Azarm, H.M., Maniat, M., Ghabtani, A. and Eskandarnia, H., 2014.** Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, body composition and activity of digestive enzymes of juvenile yellowfin sea bream. International Journal of Biosciences. 5: 99-107.

30. **Alboghbeish, M., Mohammadiazarm, H., Yavari, V. and Zakeri, M., 2015.** Effect of fish meal replacement by soybean meal and baker's yeast on growth performance and feed utilization of juvenile *Mesopotamichthys sharpeyi* Gunther 1874. Journal of Animal Research. 28(2): 136-145. (In Persian)

31. **Ye, J., Liu, X., Wang, Z. and Wang, K., 2011.** Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture International. 19: 143-153.

32. **Mamauaga, R.E.P., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Gao, J., Nguyen, B.T. and Ragaza, J.A., 2011.** Soy peptide inclusion levels influence the growth performance, proteolytic enzyme activities, blood biochemical parameters and body composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 321: 252-258.

33. **Sandholm, M., Smith, R.R., Shih, J.C.H. and Scott, M.L., 1976.** Determination of antitrypsin activity on agar plates: relationship between antitrypsin and biological value of soybean for trout. Journal of Nutrition. 106: 761-766.

34. **Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N., 2001.** Analysis of condensed tannins: a review. Animal Feed Science and Technology. 91: 21-40.

35. **Krogdahl, A., Bakke-McKellep, A.M. and Baeverfjord, G., 2003.** Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar L*). Aquaculture Nutrition. 9: 361-371.

36. **Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M.A., Flores-Ibarra, M., Álvarez González, C.A. and López, L.M., 2017.** Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: Effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. Aquaculture Research. 48(8): 4038-4057.

37. **Lin, S. and Luo, L., 2011.** Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus×O. aureus).* Animal Feed Science and Technology. 168(1): 80-87.

38. **Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M. and Montero, D., 1997.** Corn gluten meal and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. Aquaculture. 157: 347-359.

39. **Zaretbar, A., Ouraji, H., Yegane, S. and Keramat, A., 2020.** The effects of replacing fish meal with barley protein concentrate on digestive enzyme activity and hepatic enzymes of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 28(6): 111-121. (In Persian)

40. **Silva, F.C., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J.L., Le Gall, M.M., Kaushik, S. and Gatesoupe, F.J., 2010.** *Influence of partial*substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, Sparus aurata and goldfish, Carassius auratus. Aquaculture. 306(1-4): 233-237.

41. **Ahmadi Fard, N., Abedian Kenari, A. and Motamedzadegan, A., 2013.** Study of Proteases (Gastric, Intestine and Pancreas) Enzyme Activities of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed Partial Substitution of Dietary Fish Meal with Rice Bran Protein Concentrate. Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources). 65(4): 365-376. (In Persian)

42. **Tibaldi, E., Hakim, Y., Uni, Z., Tulli, F., de Francesco, M., Luzzana, U. and Harpaz, S., 2006.** Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax).* Aquaculture. 261(1): 182-193 .

43. **Farhoudi, A., 2016.** The effect of partial replacement of fish meal with *Gracilaria pygmaea* macroalgae on growth performance, approximate carcass analysis, apparent digestibility and digestive enzymes of Asian seabass. PhD Thesis, Hormozgan University.

44. **Kumar, V., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2011.** Detoxified *Jatropha curcas* kernel meal as a dietary protein source: growth performance, nutrient utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio L*) fingerlings. Aquaculture Nutrition. 17(3): 313-326.

45. **Palmegiano, G.B., Dapra, F., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Guo, K., Peiretti, P.G., Sicuro, B. and Zoccarato, I., 2006.** Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 258(1-4): 357-367.