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

- **علی خسروانی‌زاده:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **محمد سوداگر*:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **حسن صالحی:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵
- **علیرضا عالیشاهی:** گروه فرآوری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- **سیدمهدی جعفری:** گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۵

چکیده

مکمل‌های آنزیمی پروتئازی می‌توانند اثرات فاکتورهای ضد تغذیه‌ای را از بین برده و سبب بهبود رشد ماهیان شوند. هدف از این پژوهش، به‌کارگیری آنزیم تریپسین خوکی در جیره غذایی و بررسی اثرات آن بر فاکتورهای رشد، ترکیب بدن، برخی از پارامترهای بیوشیمیایی خون و فعالیت تریپسین روده فیل ماهی (*Huso huso*) بوده است. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تیمار و سه تکرار انجام شد و آنزیم تریپسین در ۳ سطح صفر، ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد به جیره غذایی اضافه شد. ماهیان به مدت ۴۵ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند و فاکتورهای رشد شامل: درصد افزایش وزن (WGP)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، شاخص وضعیت (CF)، کارایی پروتئین (PER) و شاخص کبدی (HSI) مورد بررسی قرار گرفت. از فاکتورهای بیوشیمیایی خون میزان گلوکز، BUN، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین اندازه‌گیری و بررسی شد. تیمارهای مختلف در شاخص وضعیت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p>0/05$). اما درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین در سطوح آنزیمی ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/05$). شاخص کبدی و فعالیت تریپسین روده در سطح ۰/۰۲ درصد با گروه شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند ($p<0/05$). ترکیب بدن و فاکتورهای بیوشمیایی خون، در سطوح مختلف آنزیمی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$).

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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sudagar_m@yahoo.com

مقدمه

رشد سریع جمعیت و نیاز روز افزون به منابع غذایی و به‌خصوص پروتئین از سویی و کاهش ذخایر آبزیان به‌دلایل مختلف از جمله: آلودگی آب‌ها، تخریب محیط زیست، صید بی‌رویه و غیره در قرن حاضر، بیش از پیش سبب رونق آبزی پروری در جوامع بشری گردیده، که در این میان پرورش ماهی سهم عمده‌ای را به خود اختصاص داده است. عمده هدف ماهی پروری را می‌توان تولید ماهی در کوتاه‌ترین زمان با صرف کم‌ترین نهاده دانست. هدفی که جز با افزایش حداکثری سرعت و بازده رشد به‌صورت هم‌زمان تحقق نمی‌پذیرد (Ross و Ross، ۲۰۰۸؛ Subasinghe، ۲۰۰۵).

تهیه غذا از مهم‌ترین موارد در پرورش آبزیان به‌شمار می‌آید، هزینه غذا به‌طور معمول ۳۰ تا ۶۰ درصد کل هزینه‌های لازم برای پرورش‌ماهیان وسخت‌پوستان‌را تشکیل‌می‌دهد،پس‌غذاهای مصنوعی باید با توجه به اصول علمی فرموله شوند (افشارمازندران،۱۳۸۱). پروتئین مهم‌ترین و با ارزش‌ترین بخش جیره غذایی آبزیان به‌شمار می‌رود (سالک‌یوسفی، ۱۳۷۹). کمبود پروتئین سبب کاهش میزان رشد و بازدهی غذایی، بی‌اشتهایی، کاهش تعادل ازت و غلظت پروتئین سرم خون، کم خونی، تجمع چربی در جگر و کاهش ساخت هورمون‌ها و آنزیم‌ها در بدن ماهی می‌شود. منابع پروتئینی علاوه بر این که بخش مهمی از جیره غذایی را به خود اختصاص می‌دهند، گران‌ترین بخش جیره نیز محسوب می‌گردند (افشارمازندران،۱۳۸۱).

هضم غذا در بدن حیوانات توسط آنزیم‌ها انجام می‌شود این مواد که‌ماهیت پروتئینی دارند توسط خود حیوانات یا میکرواورگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش آن‌ها تولید می‌شوند. در بدن حیوانات همه آنزیم‌ها وجود ندارند و یا مقدار آن‌ها برای هضم همه مواد غذایی کافی نیست، بنابراین بخش‌هایی از مواد غذایی هضم و جذب نشده دفع می‌شوند(Vielma وهمکاران، ۲۰۰۰). ازآن‌جاکه‌هزینه‌خوراک بالاترین سهم را در صنعت پرورش دام، طیور و آبزیان داراست، استفاده از آنزیم‌های سنتتیک می‌تواند موجبات کاهش هزینه تولید را فراهم کند و با تجزیه مواد ضد مغذی موجود در خوراک، استفاده بهینه خوراک مصرفی،سلامت تولید و کاهش آلودگی محیط‌زیست را به‌همراه داشته باشد (Vielma و همکاران، ۲۰۰۰). استفاده از مکمل‌های آنزیمی، بیش‌تر با هدف بهبود استفاده از مواد مغذی، حفظ عملکرد جیره‌هایی که‌کیفیت‌پایینی‌دارند،کاهش‌هزینه‌های‌فرمولاسیون،وسعت بخشیدن به دامنه مواد اولیه جیره، فائق آمدن بر عوامل ناسازگار و ضد تغذیه‌ای مواد اولیه، کاهش دفع مواد مغذی در آب و بازده اقتصادی بهتر صورت می‌گیرد (Singh و همکاران، ۲۰۱۱). افزایش نرخ رشد و کارایی پروتئین در ماهیان آزاد (*Salmo salar*) تغذیه شده با جیره حاوی آنزیم‌های پانکراسی (Carter و همکاران، ۱۹۹۴)، افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی در ماهیان کپور (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده باجیره حاوی مکمل آنزیمی تریپسین گاوی (Dabrowska و همکاران، ۱۹۷۹) و افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی در ماهی روهو (*Labeo rohita*) (Kumari و همکاران، ۲۰۱۳) تغذیه شده با جیره حاوی تریپسین گزارش شده است.

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

مواد و روش‌ها

تعداد ۹۰ قطعه فیل‌ماهی با میانگین وزن ۰/۴±۱۰/۴ گرم در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان تهیه و در مخازن ۲۰۰۰ لیتری، با ۱۰۰۰ لیتر آب و دبی ۸ لیتر در دقیقه برای یک دوره ۱۵ روزه سازگار و در طول این مدت با جیره غذایی متداول تغذیه شدند. آزمایش برای یک دوره ۴۵ روزه اجرا شد. در شروع مطالعه ماهیان پس از زیست‌سنجی به‌صورت انفرادی، به‌صورت تصادفی در ۳ گروه آزمایش با ۳ تکرار براساس یک طرح کاملاً تصادفی توزیع شدند. درجه حرارت آب روزانه و اسیدیته و اکسیژن محلول هر هفته با شیوه‌های استاندارد ارزیابی و ثبت شدند. برای انجام این پژوهش از جیره‌تجاری Coppens بامحتوای ۵۰٪ پروتئین، ۱۴٪ چربی، ۰/۸ درصد فیبر و ۸/۶ درصد خاکستر در کنار آنزیم تریپسین خوکی (EC:۳,۴,۲۱,۴)، محصول کمپانی سیگما آلدریچ (T۴۷۹۹) به‌میزان صفر، ۰/۰۱ درصد و ۰/۰۲ درصد برای تغذیه ماهیان استفاده گردید (جدول ۱). برای حل کردن آنزیم از بافر سدیم فسفات با اسیدیته ۷/۶ استفاده شد، محلول حاوی آنزیم بر روی جیره‌ها اسپری شد (بر روی جیره شاهد بافر بدون آنزیم اسپری شد) و در نهایت جهت به حداقل رساندن آب‌شویی، بر روی تمام جیره‌ها مقدار ثابتی پودر ژله حل شده در آب، اسپری گردید (عادلیان و همکاران، ۱۳۹۵).

جدول ۱: جیره‌های مورد استفاده برای تغذیه تیمارهای مختلف

گروه آزمایش	جیره مورد استفاده برای تغذیه
گروه یک یا گروه شاهد	جیره پایه
گروه سه	جیره پایه به همراه مکمل ۰/۰۱٪ تریپسین خوکی
گروه چهار	جیره پایه به همراه مکمل ۰/۰۲٪ تریپسین خوکی

غذادهی روزانه دو بار (۹ صبح و ۶ عصر) و به‌میزان ۳ درصد از وزن بدن انجام شد. هر ۱۵ روز یک‌بار ماهیان با ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم برای سنجش رشد توزین و با دقت یک میلی‌متر طول کل آن‌ها اندازه‌گیری شد و میزان غذا مطابق با افزایش وزن تنظیم گردید. با استفاده از داده‌های حاصل از زیست‌سنجی‌ها و نیز میزان پروتئین موجوددر غذا و اندازه‌گیری پروتئین لاشه، شاخص‌های: درصد افزایش وزن بدن، ضریب چاقی، ضریب تبدیل غذایی، نرخ رشد ویژه، نرخ بازده پروتئین و شاخص کبدی تعیین شدند (Tacon، ۱۹۹۰).

ضریب چاقی (CF) = وزن تر / طول^3 ×۱۰۰

درصد افزایش وزن بدن (BWI) = $W_2 - W_1 / W_1 \times 100$

نرخ رشد ویژه (SGR) = $(\ln W_2 - \ln W_1) / \text{دوره پرورش به‌روز} \times 100$

ضریب تبدیل غذایی (FCR)= مقدار غذای خورده شده(گرم)/ افزایش وزن بدن(گرم)

نرخ بازده پروتئین (PER)= وزن تولید شده(گرم)/ پروتئین مصرفی(گرم)

شاخص کبدی (HSI) = وزن کبد/ وزن بدن ×۱۰۰

در روابط بالا W_1 وزن اولیه و W_2 وزن نهایی ماهی بر حسب گرم می‌باشند.

تجزیه تقریبی ترکیبات لاشه ماهیان جهت اندازه‌گیری میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر براساس دستورالعمل AOAC (۲۰۰۵) انجام شد. برای اندازه‌گیری رطوبت جیره از آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت استفاده شد، برای سنجش پروتئین خام ازروش کجلدال در سه مرحله هضم، تقطیر و تیتراسیون و ضرب کردن میزان ازت به‌دست آمده از هر گرم ماده خشک در عدد ۶/۲۵، استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان چربی خام از سوکسله و حلال اتر و برای سنجش میزان خاکستر از سوزاندن نمونه‌ها در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید (AOAC، ۲۰۰۵).

در انتهای دوره پرورش از هر واحد آزمایشی(هر تکرار) سه ماهی (از هر تیمار آزمایشی۹ماهی) پس از بی‌هوشی خونگیری شدند. از هر ماهی ۱/۵ سی‌سی خون از محل شریان دمی، در انتهای باله مخرجی توسط سرنگ استریل گرفته و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. سرم خون به کمک دستگاه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه) جدا و به تیوب‌های استریل انتقال یافت و سپس تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. فاکتورهای بیوشمیایی خون شامل: گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین سرم با استفاده از کیت‌های کلینیکی تجاری (پارس آزمون، ایران) سنجیده شد.

۳ عدد ماهی از هر تکرار با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع شده و سریعاً در مجاورت یخ، به‌منظور به‌حداقل رساندن فعالیت‌های آنزیمی کالبدگشایی گردید. روده ماهیان به‌دقت‌خارج، تخلیه و با دقت یک میلی‌گرم توزین شدند. به کمک هموژنایزر یک محلول هموژن از بافت‌های مذکور در ۹ میلی‌لیتر بافر (۱۰۰ mM Tris–HCl buffer with 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.8) تهیه شد. محلول‌های حاصل با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۴درجه‌سانتی‌گرادسانتریفیوژشده‌وازفازرویی‌نمونه‌هاجهت سنجش میزان آنزیم تریپسین استفاده گردید (Furne، ۲۰۰۸). فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و سوبسترا BAPNA (Nα–benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) سنجش گردید، برای این منظور در ابتدا ۴۳/۵ میلی‌گرم BAPNA در یک میلی‌لیتر Dimethylsulphoxide (DMSO) حل شد و سپس با محلول‌بافر Tris–HCl ۰/۰۵ مولار ($CaCl_2.2H_2O$ ۰/۰۲ مولار، pH=۷/۵) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه ۲۵ ماکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱/۲۵ سوبسترای آماده شده (BAPNA) به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گوبه شده و سپس واکنش با اضافه نمودن ۱ میلی‌لیتر اسیداستیک ۳۰ درصد متوقف و میزان جذب نوری در طول ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. میزان آنزیم تریپسین از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میلی گرم پروتئین/واحد} = \frac{\text{میلی لیتر مخلوط واکنش} \times ۱۰۰۰ \times \text{میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر}}{\text{میلی گرم پروتئین در مخلوط واکنش} \div ۸۸۰۰}$$

میزان پروتئین کل نمونه‌ها به شیوه Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از سرم گاوی به‌عنوان استاندارد محاسبه شد.

داده‌های به‌دست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۲) با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه میانگین بین تیمارها، از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

در طول دوره پرورش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب در حد متعارف (دما ۰/۸±۲۵/۸۹ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۲±۶/۴ میلی-گرم در لیتر، اسیدیته ۰/۱±۸/۱) بودند و هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. در پایان۴۵روز پرورش، شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه و کارایی پروتئین در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل آنزیمی تریپسین (۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد) به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) از ماهیان گروه شاهد بالاتر بود. در مورد شاخص‌های فوق اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد آنزیم تریپسین دیده نشد ($p>0/05$). ضریب تبدیل غذایی (FCR) به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) در گروه شاهد بالاتر از سایر گروه‌ها بود. ضریب

چاقی در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری (p>۰/۰۵) را نشان نداد. شاخص کبدی در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد آنزیم به‌طور معنی‌داری(p<۰/۰۵) بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود(جدول ۲).

در جدول ۳ نتایج مربوط به اثر افزودن مقادیر مختلف مکمل آنزیمی تریپسین در جیره بر ترکیب بدن فیل‌ماهیان پرورشی آورده شده است. بیش‌ترین میزان پروتئین متعلق به ماهیان تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد آنزیم بود، که به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بالاتر از تیمار شاهد بود. مقادیر رطوبت و چربی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد. میزان خاکستر در تیمار ۰/۰۲ درصد به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) بیش‌تر از سایر تیمارها بود.

جدول ۴ میزان فاکتورهای بیوشمیایی خون شامل: گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد، براساس نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آنزیم مکمل تریپسین مشاهده نشد (p>۰/۰۵). نتایج حاصل از سنجش آنزیم تریپسین روده فیل‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر صفر، ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد افزودنی تریپسین در شکل ۱ آمده است. میزان فعالیت آنزیم تریپسین در روده ماهیان تیمار ۰/۰۲ درصد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول ۲: شاخص‌های رشد و کبدی فیل‌ماهیان پرورشی در تمیارهای مختلف

تیمارها	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	درصد افزایش وزن	SGR (درصد در روز)	FCR	PER	CF	HSI	درصد بقا
شاهد	۱۰/۴±۰/۲^{a}	۲۶/۱±۲/۸^{a}	۱۵۰/۹±۳۱/۹^{a}	۲/۰±۰/۲۸^{a}	۲/۱۸±۰/۴^{b}	۰/۹۵±۰/۲^{a}	۰/۳۳±۰/۰۳^{a}	۳/۲±۰/۱۵^{a}	۱۰۰
۰/۰۱	۱۰/۵±۰/۴^{a}	۳۰/۲±۲/۳^{b}	۲۸۷/۶±۲۶/۳^{b}	۲/۳±۰/۲۰^{b}	۱/۷۰±۰/۲^{a}	۱/۱۹±۰/۱^{b}	۰/۳۴±۰/۰۴^{a}	۳/۴±۰/۰۹^{a}	۱۰۰
۰/۰۲	۱۰/۳±۰/۳^{a}	۳۱/۱±۳/۳^{b}	۳۰۲/۲±۳۹/۰^{b}	۲/۴±۰/۲۸^{b}	۱/۶۳±۰/۳^{a}	۱/۲۶±۰/۲^{b}	۰/۳۴±۰/۰۲^{a}	۳/۷±۰/۲۱^{b}	۱۰۰

میانگین (± انحراف معیار)

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست (p<۰/۰۵).

جدول ۳: ترکیب بیوشمیایی لاشه ماهیان در تیمارهای مختلف (براساس درصد)

تیمارها	رطوبت	پروتئین خام	لیپید خام	خاکستر
شاهد	۷۶/۷۱±۰/۸۲	۱۴/۸۱±۰/۱۹^{a}	۴/۵۷±۰/۳۷	۳/۴۸±۰/۰۳^{a}
۰/۰۱	۷۶/۴۳±۰/۹۷	۱۵/۳۰±۰/۲۰^{ab}	۴/۳۷±۰/۴۶	۳/۵۲±۰/۰۹^{a}
۰/۰۲	۷۵/۷۲±۰/۷۶	۱۵/۴۸±۰/۳۴^{b}	۴/۳۱±۰/۲۶	۳/۷۵±۰/۱۰^{b}

میانگین (± انحراف معیار)

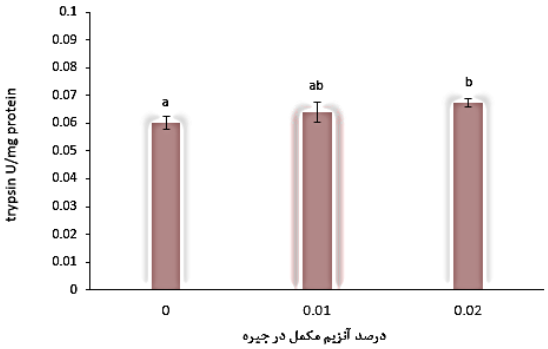
حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست (p<۰/۰۵).

جدول ۴. فاکتورهای بیوشمیایی خون فیل‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف

تیمارها	گلوکز (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	BUN (میلی‌مول/لیتر)	پروتئین کل (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	آلبومین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	گلوبولین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	نسبت آلبومین به گلوبولین
شاهد	۵۰/۰±۵/۵^{a}	۱/۴۴±۰/۱۸^{a}	۰/۹۳±۰/۰۷^{a}	۰/۳۸±۰/۰۱^{a}	۰/۵۴±۰/۰۵^{a}	۰/۷۰±۰/۰۴^{a}
۰/۰۱	۴۷/۰±۳/۰^{a}	۱/۵۱±۰/۱۱^{a}	۰/۹۷±۰/۲۲^{a}	۰/۴۰±۰/۰۴^{a}	۰/۵۷±۰/۱۸^{a}	۰/۷۳±۰/۱۷^{a}
۰/۰۲	۴۶/۳±۶/۵^{a}	۱/۵۶±۰/۰۲^{a}	۱/۰۷±۰/۱۸^{a}	۰/۳۶±۰/۰۲^{a}	۰/۷۱±۰/۱۶^{a}	۰/۵۲±۰/۰۸^{a}

میانگین (± انحراف معیار)

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست (p<۰/۰۵).



شکل۱: اثر درصدهای مختلف مکمل آنزیمی بر فعالیت تریپسین روده فیل‌ماهی

(حروف متفاوت روی هر میله نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهاست ($p<۰/۰۵$)

بحث

نتایج این بررسی نشان داد استفاده از مکمل تریپسین در جیره فیل‌ماهی در کنار کاهش ضریب تبدیل غذایی، رشد را بهبود می‌بخشد، میزان پروتئین و خاکستر لاشه را افزایش می‌دهد، اما بر فاکتورهای بیوشمیایی خون و بقا اثر معنی‌داری ندارد.

در پژوهش حاضر با افزایش میزان آنزیم ترپسین در جیره غذایی، رشد افزایش یافت و بهترین میزان رشد را گروه تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد تریپسین نمایش داد، هم‌چنین این گروه بهترین ضریب تبدیل غذایی را داشت. در این تیمار شاخص کبدی نیز به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود. در بررسی Kumari و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ماهی روهو (*Labeo rohita*) نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد به‌طوری‌که ماهیان تغذیه شده باجیره‌حاوی ۰/۰۲ درصد تریپسین در مقایسه با ماهیان گروه شاهد رشد بیش‌تری را نشان دادند، ضریب تبدیل غذایی کم‌تر و شاخص کبدی بالاتری داشتند. افزودن آنزیم تریپسین به‌میزان ۵/۶۷ گرم در کیلوگرم در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) موجب افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی شد و بر بقا ماهیان اثر منفی نداشت (Dobrowski، ۱۹۷۷). نتایج این مطالعه نیز موید نتیجه به‌دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد.

در مطالعه Dobrowska و همکاران (۱۹۷۹) افزودن عصاره آنزیمی روده و پانکراس کپور ماهیان بالغ به جیره لاروهای کپور معمولی سبب افزایش رشد آن‌ها نسبت به جیره‌های بدون آنزیم شد، اما این افزایش رشد کم‌تر از لاروهای تغذیه شده با غذای زنده بود. Carter و همکاران (۱۹۹۴) نیز افزایش رشد در ماهیان آزاد (*Salmo salar*) تغذیه شده با جیره حاوی پروتئاز را منتشر کردند. Klokovski و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند استفاده از ۰/۰۵ درصد آنزیم پانکراس خوک در جیره لاروهای ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) اثر معنی‌داری بر رشد لاروها نداشت. به‌غیر از مطالعه اخیر دو مطالعه دیگر نتایج به‌دست آمده در این بررسی را تایید می‌کنند.

در مطالعه Ghomi و همکاران (۲۰۱۱) استفاده از مولتی آنزیم کمین (که حاوی پروتئاز نیز می‌باشد) در جیره فیل‌ماهی افزایش رشد را نشان داد، به‌طوری‌که میزان ۲۵۰ میلی‌گرم آنزیم در هر کیلوگرم غذا بیش‌ترین رشد را نشان داد، هم‌چنین بیش‌ترین میزان شاخص رشد ویژه و پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی در این غلظت گزارش شد. در مطالعه دیگری که با استفاده از آنزیم کمین روی ماهی کپور معمولی انجام شد غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم بیش‌ترین میزان رشد و نرخ رشد ویژه و کم‌ترین ضریب تبدیل غذایی را نشان داد (عادلیان و همکاران، ۱۳۹۵). استفاده از آنزیم کمین به‌همراه فیتاز با مقادیر ۰/۵، ۱ و ۱/۵ کیلوگرم در هر تن غذا در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) اثر معنی‌داری بر فاکتورهای رشد، بقا و ضریب تبدیل غذایی نداشت (مرتضوی‌تبریزی و همکاران، ۱۳۹۰). به‌غیر از مطالعه اخیر نتایج دو مطالعه دیگر مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد.

استفاده از آنزیم آویزایم (حاوی پروتئاز) در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب بهبود شاخص‌های رشدو بقا شد (قبادی و همکاران، ۱۳۸۸). Zamini و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند استفاده از مکمل آنزیمی Natuzyme (حاوی پروتئاز) به‌میزان ۰/۵ گرم در کیلوگرم در جیره ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) رشد را در مقایسه با گروه شاهد بهبود بخشید و ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد. Ogunkoya و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند، به‌کارگیری مکمل آنزیمی Superzyme (حاوی پروتئاز) به‌میزان ۱ و ۲/۵ گرم در کیلوگرم در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان بر رشد بی اثر است. استفاده از آنزیم Bio-feed (حاوی پروتئاز باکتریایی) در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان توسط Farhangi و Carter (۲۰۰۷) اثر معنی‌داری بر رشد ماهیان نداشت. استفاده از پروتئاز باکتریایی در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان اثر معنی‌داری بر رشد نداشت (Dalsgaard و همکاران، ۲۰۱۲). برخلاف ۳ مطالعه اخیر ۲ مطالعه دیگر موید نتایج این پژوهش می‌باشند.

Chen و همکاران (۲۰۰۹) در تغذیه ماهی کپور سیاه (*Mylopharyngodon piceus*) از پروتئاز طبیعی استفاده کردند که دوز یک درصد سبب افزایش رشد شد، اما اثری بر شاخص کبدی نداشت. افزودن مولتی آنزیم حاوی پروتئاز طبیعی به جیره ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) میزان رشد، نرخ رشد ویژه و بازده پروتئین را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید، شاخص کبدی در تیمارهای حاوی آنزیم کاهش یافت و ضریب چاقی تفاوت

معنی‌داری نداشت (Lin و همکاران، ۲۰۰۷). این دو مطالعه همانند مطالعه حاضر افزایش رشد در پی استفاده از آنزیم مکمل را تایید می‌کنند.

در مطالعه Shi و همکاران (۲۰۱۶) افزودن آنزیم Aquagrow (AG) که پروتئازی باکتریایی است به جیره ماهی کاراس طلایی (Carassius auratus gibelio) سبب افزایش رشد در ماهیان گردید. در مطالعه دیگری با افزودن همین آنزیم در غلظت ۱۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره ماهی کپور معمولی فاکتورهای رشد بهبود یافت و ضریب تبدیل غذایی کاهش یافت (Leng و همکاران، ۲۰۰۸). در پژوهشی دیگر اثر افزودن آنزیم AG به جیره ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) و میگو پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مورد بررسی قرار گرفت، در مورد میگوها افزودن مکمل آنزیمی به جیره‌های با سطح پایین پودر ماهی، فاکتورهای رشد را بهبود بخشید و هم‌تراز جیره‌های با سطح پودر ماهی بالا کرد. در ماهیان تیلاپیا نیز در بین جیره‌هایی که به‌صورت فشرده تهیه شده بودند جیره‌های حاوی آنزیم موجبات افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی را فراهم کردند (Li و همکاران، ۲۰۱۵). نتایج این مطالعات به لحاظ اثر بر رشد مشابه نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌باشد.

استفاده از آنزیم Papain (یک آنزیم پروتئاز گیاهی) در جیره ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌میزان ۲ درصد در جیره بهترین عملکرد را نشان داد، سبب افزایش رشد، نرخ رشد ویژه و کارایی پروتئین شد، هم‌چنین کاهش ضریب تبدیل غذایی را به‌همراه داشت (Sing و همکاران، ۲۰۱۱). در گزارشی دیگر در مورد استفاده از آنزیم Papain در جیره میگو آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*)، افزودن ۰/۱ درصد آنزیم به جیره سبب افزایش رشد و بقا در پست لاروها شد (singh و Patil، ۲۰۱۴) که مؤید نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. Song و همکاران (۲۰۱۶) اثرات افزودن پروتئاز باکتریایی (غلظت‌های: ۱۲۵، ۱۵۰ و ۱۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) به جیره میگوی پاسفید غربی را مورد ارزیابی قرار دادند، که غلظت ۱۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم بهترین میزان رشد، نرخ رشد ویژه، بازده پروتئین و ضریب تبدیل غذایی را داشت ولی اثر معنی‌داری در میزان بقا مشاهده نشد، این نتایج مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. در مطالعه دیگری بر روی میگو پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) اثر چهار پروتئاز تجاری (پروتئاز قارچی، مولتی‌آنزیم AK، پروتئاز Enzeco و Enzyme) مورد ارزیابی قرار گرفت و برخلاف بررسی حاضر، اثر معنی‌داری بر رشد مشاهده نگردید (Velascoو Divakaran، ۱۹۹۹).

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

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره فیل‌ماهی تاثیری بر محتوای رطوبت و چربی لاشه ماهیان نداشته، اما در تیمار ۰/۰۲ درصد میزان خاکستر و پروتئین لاشه ماهیان بیش‌تر از گروه شاهد بود. در مطالعه Lin و همکاران (۲۰۰۷) استفاده از مولتی آنزیم حاوی پروتئاز در ماهی تیلاپیا هیبرید اثری بر ترکیبات لاشه ماهیان نداشت، نتایجی که در مطالعات Shi و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ماهی کاراس طلایی (با استفاده از آنزیم AG)، Leng و همکاران (۲۰۰۸) بر روی کپور معمولی (با استفاده از آنزیم AG) و Kolkovski و همکاران (۱۹۷۷) بر روی باس دریایی (با استفاده از آنزیم پانکراس) نیز گزارش شد. در بررسی Song و همکاران (۲۰۱۶) استفاده از پروتئاز باکتریایی در جیره میگوی پاسفید غربی بر میزان رطوبت، چربی و خاکستر لاشه اثری نداشت ولی میزان پروتئین لاشه را در تیمار ۱۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش داد. در مطالعه Ghomi و همکاران (۲۰۱۱) استفاده از آنزیم کمین، پروتئین لاشه را در گروه‌های مختلف به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش و چربی را افزایش داد، هم‌چنین خاکستر در تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (که بیش‌ترین رشد را داشت) بالاتر از سایر گروه‌ها بود. به‌جز مطالعه اخیر سایر مطالعات نتایج به‌دست آمده در این پژوهش را تایید می‌کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره فیل‌ماهی تاثیری بر میزان فاکتورهای بیوشیمیایی خون (گلوکز، BUN، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین) ندارد. در مطالعه عادلیان و همکاران (۱۳۹۵) نیز میزان گلوکز، پروتئین کل، و آلبومین در ماهیان کپور تغذیه شده با جیره حاوی کمین تغییری معنی‌داری نداشت. در مطالعه حسینی‌فرد و همکاران (۱۳۹۲) که با استفاده از آنزیم آویزایم (حاوی پروتئاز) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت نیز میزان پروتئین کل و گلوبولین تغییری را نشان نداد، اما در مطالعه Kumari و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ماهی روهو (با استفاده از آنزیم تریپسین) میزان گلوکز و نسبت آلبومین به گلوبولین در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت، فاکتورهای BUN و گلوبولین نسبت به ماهیان شاهد افزایش داشت و پروتئین کل و آلبومین تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. به‌جز مطالعه اخیر سایر مطالعات نتایج به‌دست آمده در این پژوهش را تایید می‌کنند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آنزیم تریپسین در جیره فیل‌ماهی به‌میزان ۰/۰۲ درصد فعالیت تریپسین در روده ماهیان را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد،

مشابه این نتایج در پژوهش صورت گرفته بر روی ماهی روهو با استفاده از ۰/۰۲ درصد تریپسین به‌دست آمد (Kumari و همکاران، ۲۰۱۳). Lin و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند استفاده از مولتی آنزیم حاوی پروتئاز طبیعی در جیره تیلاپیا باعث افزایش فعالیت پروتئاز روده و پانکراس می‌شود، اما در مطالعه Chen و همکاران (۲۰۰۹) بر روی کپور سیاه (با استفاده از پروتئاز طبیعی) در فعالیت پروتئاز روده تغییری گزارش نشد و فقط فعالیت پروتئازی هپاتوپانکراس در تیمار ۱ درصد افزایش یافت. استفاده از پروتئاز AG در جیره‌های حاوی ۶ و ۱۰ درصد آرد ماهی فعالیت پروتئازهای ماهی کپور معمولی را افزایش داد (Leng و همکاران، ۲۰۰۸). در بررسی Li و همکاران (۲۰۱۵) استفاده از آنزیم AG در جیره‌های حاوی پودر ماهی کم، فعالیت پروتئاز پانکراس میگو پاسفید غربی را افزایش داد و به سطح جیره‌های با پودر ماهی زیاد رساند، اما در فعالیت پروتئاز روده تغییری مشاهده‌نشد. در مطالعه Song و همکاران (۲۰۱۶) نیز فعالیت تریپسین در هپاتوپانکراس میگو پاسفید غربی با افزایش سطح آنزیم پروئتاز باکتریایی در جیره‌های حاوی پودر ماهی کم، افزایش یافت، اما این افزایش کم‌تر از جیره حاوی پودر ماهی زیاد بود.نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد استفاده از مکمل پروتئازی در جیره آبزیان می‌تواند سبب افزایش فعالیت پروتئازهای آن‌ها شود، نتایجی که در مطالعه حاضر نیز مشاهد گردید.

به‌طورکلی پژوهش حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره غذایی فیل‌ماهی کارایی جیره را افزایش می‌دهد و سبب بهبود فاکتورهای رشد می‌شود، مطالعه حاضر استفاده از غلظت ۰/۰۲ درصد تریپسین در جیره فیل‌ماهی را توصیه می‌کند، هر چند ممکن‌است استفاده از مقادیر بالاتر این آنزیم و یا روش‌های به‌کارگیری دیگر دارای تاثیرات بهتری باشند اما تایید آن نیازمند پژوهش‌های تکمیلی خواهد بود. از سوی دیگر استفاده از تریپسین به بقای ماهیان لطمه‌ای وارد نکرد و اثرات جانبی در بر نداشت. انجام مطالعات بیش‌تر در زمینه ایمن بودن این آنزیم برای فیل‌ماهی در آینده می‌تواند صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت و پرسنل مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان به‌خصوص جناب مهندس میقانی ریاست مجتمع، جناب مهندس شهریاری و جناب مهندس مخدومی به جهت همکاری و مساعدت در مراحل مختلف انجام این پژوهش تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **افشارمازندران، ن.، ۱۳۸۱.** راهنمای عملی تغذیه و نهاده‌های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. انتشارات نوربخش. ۲۱۶ صفحه.

۲. **حسینی‌فرد، س.م.؛ قبادی، ش.؛ خدابخش، ا. و رازقی‌منصور، م.، ۱۳۹۲.** تأثیر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آرد سویا همراه با مکمل آنزیمی آویزایم بر شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۹، شماره ۳، صفحات ۴۳ تا ۵۴.

۳. **سالک‌یوسفی، م.، ۱۳۷۹.** تغذیه آبزیان پرورشی. انتشارات اصلانی. ۳۱۸ صفحه.

۴. **عادلیان م.؛ ایمان‌پور، م.ز.؛ تقی‌زاده، و. و مازندرانی، م.، ۱۳۹۵.** استفاده از مولتی آنزیم کمین در جیره غذایی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و اثرات آن بر شاخص‌های رشد و برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی خون. محیط زیست جانوری. سال ۸، شماره ۱، صفحات ۲۰۱ تا ۲۰۶.

۵. **قبادی، ش.؛ متین‌فر، ع.؛ نظامی ش.ع. و سلطانی، م.، ۱۳۸۸.** عملکرد مکمل آنزیمی آویزایم بر جایگزینی آرد ماهی با آرد سویا و تاثیر آن بر رشد و بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله شیلات. سال ۳، شماره ۲، صفحات ۱۱ تا ۲۲.

۶. **مرتضوی‌تبریزی، ج.؛ شیعه، ج.؛ نوتاش، ش.؛ میرزایی، ح. و وطن‌خواه، ا.م.، ۱۳۹۰.** تاثیر مقادیر مختلف مولتی آنزیم بر تغییرات آنزیم‌های کبدی و فاکتورهای عملکردی در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرواری. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۱۱۰۳ تا ۱۱۱۱.

۷. **مرتضوی‌تبریزی، س.ج.؛ نجاتی، م.؛ نوتاش، ش. و میرزایی،ح.، ۱۳۹۰.** بررسی تاثیر سطوح مختلف مولتی آنزیم بر عملکرد و میزان بقا پرواری (*Oncorhynchus mykiss*) ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۴۹ تا ۵۵.

۸. **AOAC (Association of Official Analytical Chemists), ۲۰۰۵.** Official Methods of Analysis ۱۶th edition. AOAC, Gaithersburg, Maryland. 532 P.

۹. **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. Vol. 72, pp: 248-254.

۱۰. **Carter, C.G.; Houlihan, D.F.; Buchanan, B. and Mitchell, A.I., 1994.** Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a diet containing supplementary enzymes. Aquaculture research. Vol. 25, No. 1, pp: 37-46.

۱۱. **Chen, J.M.; Ye, J.Y.; Xu, Y.X.; Shen, B.Q.; Guo, J.L.; Pan, Q. and Wang, Y.H., 2009.** Effect of adding neutral protease to diets on growth performance, digestion, and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Acta Hydrobiologica Sinica. Vol. 33, No. 4, pp: 726-731.

۱۲. **Dabrowska, H.; Grudniewski, H. and Dabrowski, K., 1979.** Artificial diets for common carp: effect of the addition of enzyme extracts. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 41, No. 4, pp: 196-200.

۱۳. **Dabrowski, K. and Glogowski, J., 1977.** A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. Aquaculture. Vol. 12, pp: 349-360.

۱۴. **Dalsgaard, J.; Verlhac, V.; Hjermitslev, N.; Ekmann, K.S.; Fischer, M.; Klausen, M. and Pedersen, P.B., 2012.** Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. Animal feed science and technology. Vol. 171, pp: 181-91.

۱۵. **Divakaran, S. and Velasco, M., 1999.** Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research. Vol. 30, pp: 335-339.

۱۶. **Erlanger, B.F.; Kokowski, N. and Cohen, W., 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archive Biochemistry and Biophysics. Vol. 95, pp: 271-278.

۱۷. **Farhangi, M. and Carter, C.G., 2007.** Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 1274-1282.

۱۸. **Furne, M.; García-Gallego, M.; Hidalgo, M.C.; Morales, A.E.; Domezain, A.; Domezain, J. and Sanz, A., 2008.** Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 149, pp: 420-425.

۱۹. **Ghomi, M.R.; Shahriari, R.; Langroudi, H.F.; Nikoo, M. and von Elert, E., 2012.** Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. Aquaculture International. Vol. 20, pp: 249-254.

۲۰. **Kolkovski, S., Tandler, A. and Izquierdo, M., 1997.** Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. Vol. 148, pp: 313-322.

۲۱. **Kumari, R.; Gupta, S.; Singh, A.R.; Ferosekhan, S.; Kothari, D.C.; Kumar, P.A. and Jadhao, S.B., 2013.** Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-Like enzyme in fish gastrointestinal tract. Plos One. Vol. 8, No. 9, pp: 1-12.

۲۲. **Leng, X.; Liu, D.; Li, X. and Lu, Y., 2008.** Effects of adding Protease AG on growth and digestive protease activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. Chinese Journal of Animal Nutrition. Vol. 20, No. 3, pp: 1-7.

۲۳. **Li, X.; Chai, X.; Liu, D.; Chowdhury, K. and Leng, X., 2015.** Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus*× *O. aureus.* Aquaculture Nutrition. Vol. 21, No. 4, pp: 1-10.

۲۴. **Lin, S.; Mai, K. and Tan, B., 2007.** Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus x O. aureus*. Aquaculture Research. Vol. 38, pp: 1645-1653.

۲۵. **Ogunkoya, A.E.; Page, G.I.; Adewolu, M.A. and Bureau, D.P., 2006.** Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 254 pp: 466-475.

۲۶. **Patil, D. and Singh, H., 2013.** Effect of papain supplemented diet on growth and survival of post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. Vol. 1, No. 6, pp: 176-179.

۲۷. **Ross, L.G. and Ross, B., 2008.** Anaesthesia and Sedation of Aquatic Animals. 3rd ed. Oxford, Blackwell Science. 236 P.

۲۸. **Shi, Z.; Li, X.Q.; Chowdhury, M.K.; Chen, J.N. and Leng, X.J., 2016.** Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Aquaculture. Vol. 460, pp: 37-44.

۲۹. **Singh, P.; Maqsood, S.; Samoon, M.H.; Phulia, V.; Danish, M. and Singh-Chalal, R., 2011.** Exogenous supplementation of papain as growth promoter in diet of fingerlings of *Cyprinus carpio*. International Aquatic Research. Vol. 3, pp: 1-9.

۳۰. **Song, H.L.; Tan, B.P.; Chi, S.Y.; Liu, Y.; Chowdhury, M. and Dong, X.H., 2016.** The effects of a dietary protease-complex on performance, digestive and immune enzyme activity, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* fed high plant protein diets. Aquaculture Research. Vol. 47, No. 5, pp: 1-11.

۳۱. **Subasinghe, R.P., 2005.** Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. Preventive Veterinary Medicine. Vol. 67, pp: 117-124.

۳۲. **Tacon, A.G.J., 1990.** Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Washington DC, Argent Laboratories press. 454 P.

۳۳. **Vielma, J.; Makinen, T.; Ekholm, P. and Koskela, J., 2000.** Influenceof dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) andalgal availability of phosphorus load. Aquaculture. Vol. 183, pp: 349-362.

۳۴. **Zamini, A.A.; Kanani, H.G.; Esmaeili, A.A.; Ramezani, S. and Zoriezahra, S.J., 2014.** Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). Comparative Clinical Pathology. Vol. 23, pp: 187-192.