بررسی فعالیت آنزیم‌های پروتئینی معده، پانکراس و روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با تیمارهای جایگزین شده پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج

نصراله احمدی فرد[۱]، عبدالمحمد عابدیان کناری[۲*] و علی معتمد زادگان[۳]

[۱] دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران
[۲] گروه شیلات دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران
[۳] گروه صنایع غذایی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۰/۱۲/۲۷)

چکیده

ترکیب ثابت جیره‌های غذایی با کیفیت در آبزی پروری از اهمیت زیادی برخوردار است. هضم و جذب مواد مغذی وابسته به فعالیت آنزیم‌های هضمی است که درماهیان گوشتخوار بیشتر توسط آنزیم‌های پروتئازی انجام می‌شود. در مطالعه حاضر اثر جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج بر فعالیت آنزیم‌های دستگاه گوارش ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های معدوی (پپسین)، پانکراسی (تریپسین و کیموتریپسین) و آنزیم‌های نوار مسواکی (Brush border) روده (آمینوپپتیداز، آلکالین فسفاتاز) ماهیان تغذیه شده با درصدهای مختلف جایگزینی (۱۰، ۲۵ و ۳۵ ٪ جایگزینی) پودر ماهی با کنسانتره سبوس برنج مورد مقایسه قرار گرفت. در ماهیان تغذیه شده با جیره گیاهی تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های پپسین، ترپسین و کیموتریپسن دستگاه گوارش آنها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). سطوح بالای جایگزینی به طور معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز تاثیر گذار بود به طوری که کمترین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به طور معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در تیمار ۳۵٪ جایگزینی مشاهده شد. فعالیت آنزیم آمینوپپتیداز در تیمار ۱۰٪ جایگزینی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت ($P > ۰/۰۵$) اما با افزایش سطح جایگزینی به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) از سطح فعالیت آن کاسته شد. کاهش فعالیت آنزیم‌های روده‌ای در سطوح بالای جایگزینی، علی رغم عدم تفاوت معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های معده‌ای و پانکراسی، شاید به دلیل داشتن ساختار پروتئینی ساده تر کنسانتره پروتئینی سبوس برنج نسبت به پودر ماهی باشد و یا اینکه عوامل ممانعت کننده‌ای تغذیه‌ایی سبب کاهش ترشح آنزیم‌های هضمی شده است. به هر حال علی رغم این تفاوت‌ها، ماهیان تغذیه شده با تیمارهای جایگزینی تا سطح ۲۵٪ تفاوت معنی‌داری را از نظر رشد با تیمار شاهد نشان ندادند. به نظر می‌رسد ماهی قزل آلای رنگین کمان قادر به سازگاری با جایگزینی نسبی پودر ماهی با کنسانتره پروتئین سبوس برنج باشند اگرچه شاید نیاز باشد تا مکانیسم‌های جبران کاهش فعالیت آنزیم‌ها در انتروسیت‌های روده ماهی گوشتخوار قزل آلای رنگین کمان بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های هضمی، *Oncorhynchus mykiss*، پروتئازها، جایگزینی و سبوس برنج

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۲۲۶۲۵۳۱۰۱ فاکس: ۰۱۲۲۶۲۵۳۴۹۹ E-mail: aabedian@modares.ac.ir

مقدمه

قزل آلای رنگین کمان با تولید سالانه ۶۲۶۳۰ تن در ایران از مهمترین ماهیان سردآبی در ایران و ششمین ماهی پرورشی سردآبی در جهان محسوب می‌گردد (Golchinfar *et al.,* 2011). بهبود کیفیت غذایی این ماهی یکی از دغدغه‌ها و علاقه‌مندی‌های محققین می‌باشد. بیش از ۵۰ درصد منبع پروتئینی در تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان پودرماهی می‌باشد (Pike *et al.,* 1990). پودر ماهی به دلیل داشتن کیفیت و کمیت پروتئینی بالا و همچنین مقبولیت بالا توسط ماهی در ماهیان گوشتخوار بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد (Wilson and Halver 1986). منابع محدود غذایی و گران قیمت بودن پودر ماهی محققین تغذیه را وادار به یافتن یک جایگزین مناسب پروتئینی نموده است (Leenhouwers *et al.,* 2007). مهمترین منابع مورد استفاده جایگزین، پودر سویا (Escaffre *et al.,* 1997; Mambrini *et al.,* 1999)، پودر نخود (Hardy 1996)، پودر لوبیا (Burel *et al.,* 1998; Glencross *et al.,* 2004) و دیگر پودرهای گیاهی (Watanabe *et al.,* 1997; Palmegiano *et al.,* 2005; Mente *et al.,* 2003) می‌باشد. منابع پروتئین گیاهی می‌تواند مشکلات متعددی از قبیل فاکتورهای ضد تغذیه‌ای (Francis *et al.,* 2001) و عدم تعادل اسیدهای آمینه (Watanabe *et al.,* 1995) را سبب شود اما Alexis (2005) عنوان کرده که مشکل اصلی منابع گیاهی در غذای ماهی مقادیر بالای کربوهیدرات آنها می‌باشد. به طور معمول برای ماهیان سردآبی و دریایی میزان کربوهیدرات نباید بیشتر از ۲۰٪ باشد (Alexis 2005). به دلیل درصد بالای کربوهیدات و فیبر در سبوس برنج، میزان مصرف سبوس برنج در ترکیب جیره غذایی ماهیان گوشتخوار محدود می‌باشد به همین دلیل ترکیبات پروتئینی این محصول باید استخراج و به صورت ایزوله یا کنسانتره در جیره غذایی مورد استفاده قرار گیرد. تهیه یک جیره غذایی معمولاً وابسته به اطلاعات مرتبط به هضم پذیری مواد مغذی مورد استفاده در جیره بوده و این اطلاعات در تعیین ارزش غذایی و کیفیت این مواد مغذی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به هر حال هضم و جذب مواد مغذی بطور مستقیم وابسته به فعالیت آنزیم‌های هضمی، بخصوص در رابطه با پروتئین آنزیم‌های پروتئازی، می‌باشند. پودر ماهی جزء اصلی ترکیب غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌باشد اما استفاده از منابع پروتئینی جایگزین دیگر به دلیل فراوانی و قیمت پایین در حال افزایش می‌باشد. بیشتر منابع جایگزین از پودرهای گیاهی می‌باشد که استفاده از آنها بدلیل دار بودن مقادیر بالای کربوهیدرات بر فیزیولوژی هضم در دستگاه گوارش اثر گذار بوده و قابلیت هضم و مصرف مواد مغذی را کاهش می‌دهد (Deguara *et al.,* 2003). از آن جایی که بیشتر توجهات در مورد اثرات پودرهای گیاهی جایگزین بر روی رشد و کارایی تبدیل غذایی می‌باشد، ولیکن مطالعات کمی در مورد تاثیرات غذایی به ویژه کنسانتره‌های پروتئینی گیاهی بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی ار قبیل تغییرات در فعالیت آنزیم گوارشی صورت گرفته است (Krogdahl *et al.,* 2003). نتایج مطالعات صورت گرفته بر روی ماهی تیلاپیا (Krogdahl *et al.,* 2003) و ماهی کاد آتلانتیک (Lemieux *et al.,* 1999) و سالمون آتلانتک (Krogdahl *et al.,* 2003) نشان دادند که اجزاء غذایی بر روی عملکرد متابولیکی (بخصوص ترشح آنزیم)و نرخ رشد و کارایی تبدیل غذا تاثیر گذار می‌باشد. عامل ضد تغذیه‌ای موجود در منابع گیاهی سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های هضمی می‌گردد (Huisman and Tolman 1992). در دو دهه اخیر مطالعات گسترده‌ای در رابطه با توانایی هضمی و نیازهای تغذیه‌ایی ویژه لارو و افراد جوان ماهیان صورت گرفته است (Cahu and Zambonino Infante 2001). در مراحل اولیه تغذیه لارو ماهیان آنزیم‌های اسیدی معدوی (پپسین) و آنزیم‌های قلیایی پانکراسی (تریپسین و کیموترپسین) در هضم مواد غذایی بسیار اهمیت دارد (Cahu and Zambonino Infante 2001). هضم نهایی مواد غذایی در روده صورت گرفته که آنزیم‌های مرتبط به هر ماده غذایی در آنجا ترشح می‌گردد. آنزیم آلکالین فسفاتاز و آنزیم آمینو پپتیداز از آنزیم‌های نوار مسواکی (Brush border) مهم در هضم نهایی مواد پروتئینی می‌باشند. آنزیم آلکالین فسفاتاز یک آنزیم غالب در قسمت نوار مسواکی روده بوده و اغلب به عنوان شاخص استفاده می‌شود. این آنزیم در حضور سوبسترا در مدت زمان کوتاهی فعالیت خود را نشان می‌دهد (Wahnon *et al.,* 1992). آمینو پپتیداز در میان مهمترین آنزیم‌های روده یک نقش اساس را در هیدولیز نهایی و جذب پروتئین‌های جیره ایفا می‌کند (Douglas *et al.,* 1999). فعالیت این دو آنزیم با حضور مواد غذایی پپتیدی افزایش می‌یابد (Sonoyama *et al.,* 1994). با توجه به تاثیر منابع متفاوت پروتئینی به علت تفاوت در ساختار شان بر ترشح آنزیم‌های گوارشی، مطالعه حاضر در مورد تاثیر کنسانتره پروتئینی سبوس برنج به عنوان جایگزین پودر ماهی بر روی فعالیت آنزیم‌های معدوی (پپسین)، پانکراسی (تریپسین و

کیموتریپسین) و روده‌ای (آلکالین فسفااز و آمینو پپتیداز) لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان به عنوان مدل صورت گرفت.

روش کار

نحوه تهیه ماهیان و شرایط انجام آزمایش

این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان واقع در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. از ۱۲۰۰ قطعه آلوین ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن متوسط ۱۳۰ میلی گرم جهت انجام آزمایش (۱۰۰ قطعه در هر واحد آزمایش) استفاده گردید. در این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی به دلیل شرایط یکنواخت آزمایشگاهی استفاده شد. این آزمایش با ۳ تکرار برای هر تیمار طراحی شد که مجموعا ۱۲ تانک ۱۵۰ لیتری مدور استفاده شد. شرایط روشنایی بصورت ۱۲: ۱۲ (روشنایی: تاریکی) بود. شاخص فیزیکوشیمیایی آب واحدهای آزمایشی از قبیل درجه حرارت (°C ۱۵-۱۳)، pH (۷/۵-۷/۸)، اکسیژن محلول (۶/۵-۷/۵) بررسی و با تعویض آب به صورت ۱۰۰٪ روزانه در دامنه مطلوب حفظ شدند (Tarazona and Muñoz 1995). تغذیه به میزان ۲/۵٪ وزن بدن در ابتدا و سپس ۶ بار در روز تا مرحله سیری (نخوردن غذا) (NRC, 1993) در دوره ۳۰ روزه انجام گردید.

طراحی آزمایش

در این مرحله از فرآورده تهیه شده (کنسانتره پروتئینی سبوس برنج با ۷۵ ٪ پروتئین) جهت ساخت جیره‌های غذایی استفاده شد. سه تیمار جایگزینی با پودر ماهی شامل۱۰٪، ۲۵٪ و ۳۵٪ جایگزینی به همراه یک تیمار شاهد (۱۰۰ درصد پودر ماهی) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). جیره شاهد حاوی ۵۲٪ پروتئین با استفاده از نرم افزار جیره نویسی لیندو فرموله گردید. اجزای جیره‌ها با افزودن مقدار آب مناسب به شکل خمیری یکنواخت تبدیل گردید. سپس خمیر حاصله از دستگاه چرخ گوشتی با قطر چشمه ۲ میلی‌متر (Hardy and Barrows 2002) عبور داده شدند. در نهایت پلت‌های مرطوب در دمای °C ۳۰ به مدت ۲۴ ساعت خشک (Farhangi and Carter 2001) بسته بندی و در دمای °C۲۰- نگهداری شدند.

جدول ۱: ترکیب جیره غذایی لارو ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با تیمارهای جایگزینی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج

		تیمار غذایی*		
اجزای غذایی (٪)	**شاهد**	**RBC10**	**RBC25**	**RBC35**
پودر ماهی	۶۴/۸۷	۵۸/۳۷	۴۸/۶۳	۴۲/۱۱
آرد گندم	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
کنسانتره پروتئینی سبوس برنج	-	۶/۴۸۷	۱۶/۲	۲۲/۷
گلوتن گندم	۵	۵	۵	۵
روغن ماهی	۴/۷۸	۴/۷۹۴	۴/۸	۴/۸۱
روغن سویا	۴/۷۸	۴/۷۹۴	۴/۸	۴/۸۱
مکمل معدنی	۳	۳	۳	۳
مکمل ویتامینی	۲	۲	۲	۲
آنتی اکسیدان	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
بایندر	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
سلولز	۴	۴	۴	۴
پروتئین (نیتروژن × ۶/۲۵) (بر اساس وزن خشک)	۵۲/۸۶	۵۱/۶۹	۵۲/۴	۵۲/۳
چربی (بر اساس وزن خشک)	۱۷/۰۱	۱۶/۵۷	۱۶	۱۶/۴۸
خاکستر (بر اساس وزن خشک)	۱۶/۲	۱۷/۸	۱۸/۱	۱۶/۹
میزان انرژی (کیلو ژول بر گرم)	۱۹/۷۸	۱۹/۵	۱۹/۱۴	۱۸/۹

* تیمارهای غذایی شامل ۳ تیمار: RBC10: تیمار جایگزینی ۱۰ ٪ پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج RBC25: تیمار جایگزینی ۲۵ ٪ پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج و RBC35: تیمار جایگزینی ۳۵ ٪ پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج

نمونه برداری و شکافتن شکم ماهی

در انتهای آزمایش جهت نمونه برداری از ماهیان عمل غذادهی در شب قبل از نمونه بردای قطع شد. تعداد ۲۰ عدد ماهی از هر تکرار با استفاده از گل میخک بیهوش شدند. ماهیان بیهوش شده بر روی یخ قرار داده شدند و تمام مراحل کار در شرایط سرد بر روی یخ انجام گرفت. ابتدا ماهیان بیومتری شده سپس ضد عفونی انجام گرفت. دستگاه گوارش ماهیان به کمک ابزار جراحی برداشته شده و بعد از پاک کردن باقی مانده غذا در ظروفی در کنار یخ قرار داده شد. بعد از اتمام نمونه گیری دستگاه گوارش جمع آوری شده به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند.

استخراج عصاره آنزیمی

جهت استخراج عصاره آنزیمی و تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های معدوی و پانکراسی طبق روش مطالعات قبلی (Babaei *et al.,* 2011) دستگاه گوارشی جمع‌آوری شده با کمک یک همژنایزر برقی با دور بالا (WIGGEN, D500, Germany) در کنار یخ هموژن گردیدند. برای هموژن کردن از بافر تریس اسیدی ۱۰۰میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و تریتون X-100 ۰/۱ درصد استفاده شد. pH محلول در ۷/۸ تنظیم گردید و به نسبت ۱ گرم از نمونه و ۹ میلی لیتر از بافر استفاده گردید. هموژنات در دور ۳۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید (Hermle Z36HK, Germany). بعد از سانتریفوژ قسمت فوقانی (سوپرناتانت) جمع‌آوری شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های نوار مسواکی روده از روش Cahu و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد (Cahu *et al.,* 1999). یک قسمت از بافت دستگاه گوارشی با ۳۰ قسمت از بافر تریس ۲ میلی مولار، مانیتول ۵۰ میلی مولار (30 v/w) در pH ۷ به مدت۳۰ ثانیه با هموژنایزر برقی با آخرین دور هموژن گردیدند. عصاره آنزیم‌های نوار مسواکی به روش Crane و همکاران (۱۹۷۹) تهیه گردید (Crane *et al.,* 1979). به طور خلاصه بعد از اضافه کردن CaCl2 ۰/۱ مولار بافت هموژن شده به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. سوپر ناتانت به ویال‌های جدید منتقل و تا زمان سنجش پروتئین و آنزیم‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تعیین میزان پروتئین محلول

میزان پروتئین محلول عصاره آنزیمی با به کارگیری روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه گیری شد (Bradford 1995). جهت تهیه محلول برادفورد ابتدا ۱۰۰ میلی گرم ماده رنگی کوماسی بلو در ۵۰ سی سی الکل اتانول ۹۵ درصد حل نموده و سپس ۱۰۰ سی سی اسید فسفریک ۸۵ درصد به آن افزوده و حجم آن با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده شد. محلول بدست آمده را با استفاده از کاغذ صافی واتمن نمره ۱ صاف و تا زمان سنجش دور از نور نگهداری شد. جهت رسم منحنی استانداردهای غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA) در سه تکرار تهیه نموده و سپس با افزودن ۱ میلی لیتر معرف برادفورد که قبلاً تهیه شده بود تغییرات جذب نوری در طول موج ۵۹۵ اندازه گیری شد. برای تهیه غلظت‌های مختلف BSA ابتدا محلول اولیه BSA با غلظت ۱ mg/ml تهیه و سپس غلظت‌های مختلف BSA تهیه شدند.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

سنجش فعالیت آنزیمی پپسین بر اساس روش Anson (۱۹۸۳) که در Worthington (۱۹۹۱) منتشر شده است انجام گرفت (Worthington 1991). به طور خلاصه عصاره آنزیمی استخراج شده با سوبسترا (۲٪ محلول هموگلوبین در اسید کلریدریک ۰.۳ نرمال در pH ۲) مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. واکنش با افزودن TCA ۵٪ (Trichloroacetic) متوقف شده و لوله‌های سنجش به کمک سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۶ دقیقه با دور ۴۰۰۰ g سانتریفوژ شدند. میزان جذب قسمت فوقانی (سوپرناتانت) در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد از فعالیت آنزیم پپسین به عنوان یک میکروگرم تیروزین آزاد شده در دمای ۳۷ درجه در یک میلی لیتر می‌باشد.

جهت سنجش فعالیت آنزیمی تریپسین از BAPNA (N-α-benzoyldlarginine- p-nitroanilide) به عنوان سوبسترا استفاده گردید. ۱ میلی مولار از سوبسترای BAPNA در بافر تریس اسیدی ۵۰ میلی مولار و کلرید کلسیم ۲۰ میلی مولار حل شده و pH آن در ۷/۵ تنظیم گردید. محلول آماده شده با عصاره آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه انکوبه شدند و میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر ثبت شد (Erlanger *et al.,* 1961).

فعالیت آنزیمی کیموتریپسین با استفاده از SAPNA ۰/۱ میلی مولار در تریس اسیدی ۵۰ میلی مولار و کلرید کلسیم

۲۰ میلی مولار به عنوان سوبسترا سنجیده شد. تغییر جذب در دقیقه بر هر میلی گرم پروتئین به عنوان یک واحد فعالیت کیموتریپسین نشان داده شد (Erlanger *et al.*, 1961). ضریب Extinction در ماده p – نیترآنیلید برابر با ۸۸۰۰ سانتی‌متر مربع در میلی گرم برآورد شده است.

$$A.C. = Abs./\min)\times 1000\times$$

$$Activity\ units = \frac{(Abs\ 410/min)\times 1000\times ml\ of\ reaction\ mixture}{8800\times mg\ protein\ in\ reaction\ mixture}$$

فعالیت آنزیمی آلکالین فسفاتاز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از ۴-نیترو فنیل فسفات (PNPP) به عنوان سوبسترا در بافر ۳۰ میلی مولار کربنات سدیم (pH 9.8) سنجش شد. یک واحد از فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به عنوان ۱ میکرو گرم BTEE آزاد شده در دقیقه در واحد میلی لیتر از هموژنات براش بردری نشان داده شد. میزان جذب در طوج موج ۴۰۷ نانومتر قرائت شد (Bessey *et al.*, 1946).

آنزیم آمینو پپتیداز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از بافر فسفات سدیم ۸۰ میلی مولار و L-leucine p-nitroanilide به عنوان سوبسترا سنجش شد (Maroux *et al.*, 1973). یک واحد فعالیت آنزیم به عنوان ۱ میکرو گرم نیترآنیلید آزاد شده در دقیقه در یک میلی لیتر از هموژنات براش بردری تعریف شد.

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

پس از بررسی نرمال بودن داده‌های خام با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنوف میزان همگنی واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون Leven مورد بررسی قرار گرفت. از روش آنالیز واریانس یک طرفه، برای بررسی داده‌ها استفاده شد. برای بررسی تفاوت بین میانگین داده‌ها از آزمون دانکن (برای داده‌های نرمال) استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نسخه ۱۵ نرم افزار SPSS بررسی شدند.

نتایج

نتایج رشد

بر اساس جدول ۲ جیره غذایی بر روی رشد تاثیر گذار بوده است. در ماهیان تغذیه شده با تیمارهای جایگزینی پودر ماهی با سبوس برنج بیشترین ضریب رشد ویژه و همچنین افزایش وزن در تیمار ۱۰٪ جایگزینی بود ولی این میزان با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (P> ۰/۰۵). تیمار ۲۵٪ نیز تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت ولی با افزایش سطح جایگزینی تا سطح ۳۵٪ هر دو فاکتور فوق نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشته است (P< ۰/۰۵).

جدول ۲: وزن اولیه، درصد افزایش وزن (WG%) و ضریب رشد ویژه (SGR) ماهی قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با سطوح مختلف جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج (Mean± SD).

حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه عدم معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

	تیمارها			
فاکتورهای رشد	شاهد	RBPC-10	RBPC-25	RBPC-35
وزن اولیه (میلی گرم)	۱۳۱±۰/۵۸	۱۳۱±۰/۵۸	۱۳۳/۶۷±۰/۸۸	۱۳۳±۰/۵۸
افزایش وزن (درصد)	۸۲۰/۷۸±۱۹[a]	۸۳۸/۹۱±۴/۵۶a	۸۱۴/۹۷±۲۷/۹۷[a]	۸۰۴/۶±۱۸/۴۳[b]
ضریب رشد ویژه	۷/۴۰±۰/۰۷[a]	۷/۴۷±۰/۰۲[a]	۷/۳۸±۰/۱[a]	۷/۳۴±۰/۰۷[b]

* تیمارهای غذایی شامل ۳ تیمار: RBPC-10: تیمار جایگزینی ۱۰ ٪ پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج RBPC-25: تیمار جایگزینی ۲۵ ٪ پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج و RBPC-35: تیمار جایگزینی ۳۵ ٪ پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج

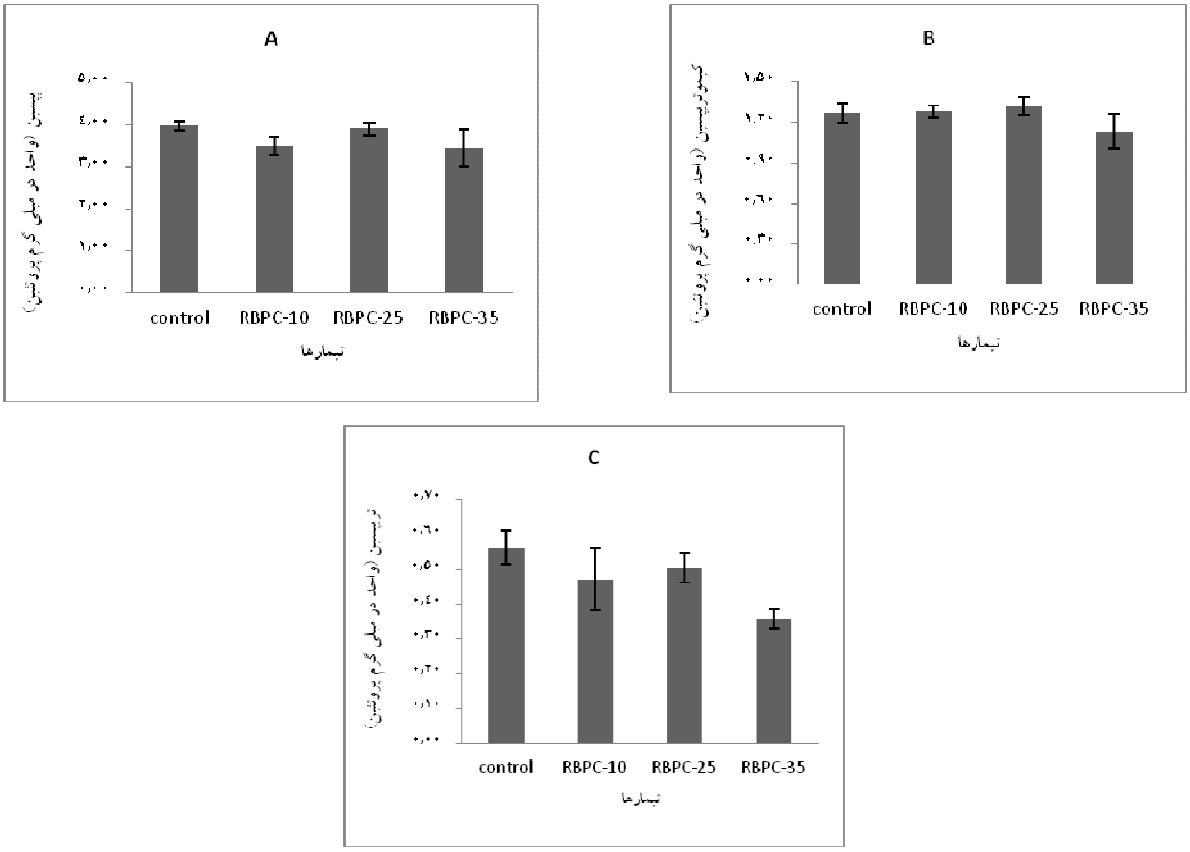
آنزیم‌های هضمی

نتایج حاصل از مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارش در ماهیان تغذیه شده با تیمارها مختلف در نمودارهای ۱تا ۵ آورده شده است. آنزیم پپسین اندازه گیری شده در تیمارهای تغذیه شده با جایگزین‌های پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان ندادند (P> ۰/۰۵) اگر چه با افزایش جایگزینی از فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار شاهد کاسته شد (نمودار ۱- A).

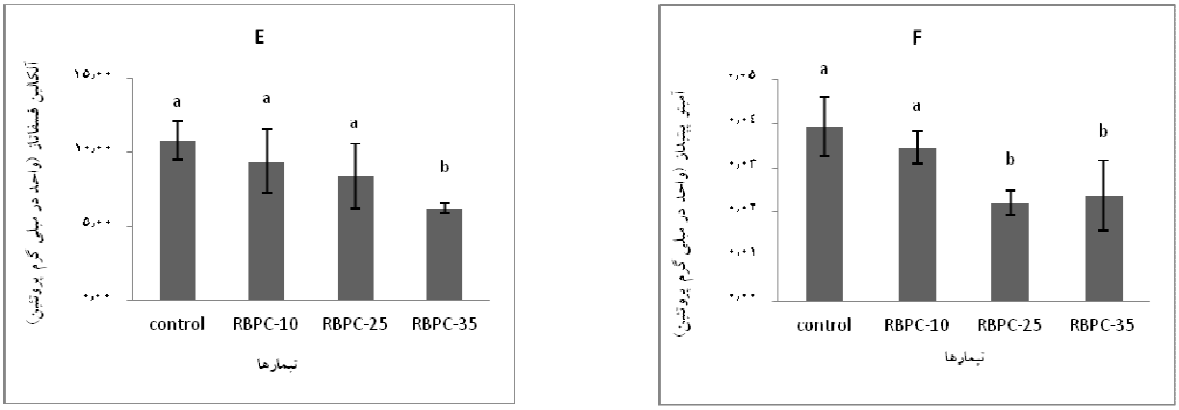
اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در گروه‌های ماهیان که با سطوح مختلف کنسانتره پروتئینی سبوس برنج تغذیه شدند نشان داد که بین فعالیت این آنزیم‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P> ۰/۰۵). با وجود این در ماهیان تغذیه شده با سطوح بالای جایگزینی میزان فعالیت این دو آنزیم نسبت به تیمار شاهد کمتر بود (نمودار ۱- B و ۱- C).

فعالیت آنزیم‌های نوار مسواکی (brush border) روده در

بین تیمارها تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد (P< ۰/۰۵). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نواحی روده نشان داد که تیمار جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج تا سطح ۲۵٪ تاثیر معنی‌داری را بر روی فعالیت آین آنزیم نداشته است ولیکن با افزایش جایگزینی در تیمار ۳۵٪ جایگزینی فعالیت آنزیم فوق به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است (نمودار ۲-E). همچنین فعالیت آنزیم آمینو پتیداز روده با افزایش سطوح جایگزینی کاهش معنی‌داری (P< ۰/۰۵) را نشان داد بطوری که در تیمار ۲۵ و ۳۵ درصد جایگزینی میزان فعالیت این آنزیم به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است (نمودار ۲-F).



نمودار ۱: فعالیت آنزیم‌های گوارشی معدوی و پانکراسی در ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با تیمارهای جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج A : میزان فعالیت آنزیم پپسین B : میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین C : میزان فعالیت آنزیم تریپسین.



نمودار۲ : فعالیت آنزیم‌های گوارشی نوار مسواکی رودوی در ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با تیمارهای جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج E : میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز F : میزان فعالیت آنزیم آمینو پپتیداز

بحث

آزمایش حاضر نشان دهنده امکان جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج تا سطح ۲۵٪ می‌باشد بدون اینکه تاثیر معنی‌داری بر روی کاهش رشد داشته باشد. در ارتباط با جایگزینی پودرماهی مطالعات مختلفی صورت گرفته و موفقیات نسبی و یا کاملی حاصل شده است (Kaushik *et al.,* 1989; Aragao *et al.,* 2003; Gallagher, 1994; Escaffre *et al.,* 1997; Olli *et al.,* 1995; Gomes *et al.,* 1993; Mambrini *et al.,* 1999; Medale *et al.,* 1998). به هر حال Kissil و همکاران (۲۰۰۰) کاهشی درمیزان تغذیه در سطوح بالا جایگزینی پودر ماهی با کانولا دست یافتند (Kissil *et al.,* 2000).

در تغذیه ماهیان تغییرات منبع پروتئین می‌تواند بر تولید آنزیم‌های endogenous تاثیر گذار باشد (Sunde *et al.,* 2004). از فعالیت آنزیم‌های هضمی به عنوان یک پیش بینی کننده تفاوت‌های رشدی و مصرف بالقوه غذا یاد می‌شود (Karun *et al.*, 2011). آنزیم‌های پروتئازی نقش بسیار موثری در فرایند هضم در آزاد ماهیان دارند (Sunde *et al.*, 2001; Golchinfar *et al.,* 2011). در مطالعه حاضر اثر تیمارهای جایگزینی در مقایسه با شاهد بر روی آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین قزل آلای رنگین کمان توانایی سازگاری و ترشح این آنزیم‌ها را با تغذیه تیمارهای غذایی مختلف نشان داد که این یافته‌ها با مطالعات صورت گرفته بر روی گونه‌های *Scylla serrata* (Pavasovic *et al.,* 2004)، *Gadus morhua* (Refstie *et al.,* 2006) و *Litopenaeus vannamei* (Rivas-Vega *et al.,* 2006) مطابقت دارد. به هر حال با جایگزینی پودر ماهی با پودر لوبیا کاهشی در فعالیت آنزیم تریپسین روده‌ای مشاهده شده است (Robaina *et al.*, 1995).

بیشتر آنزیم‌های روده که نقش مهمی در هضم نهایی دارند بر روی غشاهای نوار مسواکی (brush border) انتروسیت‌ها قرار دارند (Silva *et al.,* 2010). این آنزیم‌ها از قبیل آلکالین فسفاتاز و آمینوپپتیداز در مراحل اولیه لاروی قزل آلا گزارش شده است (Golchinfar *et al.,* 2011). آلکالین فسفاتاز یکی از مهمترین آنزیم‌های غشاء روده بوده و به عنوان شاخص در جذب مواد مغذی تلقی می‌شود (Silva *et al.,* 2010). آلکالین فسفاتاز به عنوان آنزیم integral و برعکس آنزیم آمینوپپتیداز یک آنزیم Extrinsic در غشاهای میکروویلی روده قرار دارد (Wahnon *et al.,* 1992). در مطالعه حاضر اثر جایگزینی پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج بر روی آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز تاثیر معنی‌داری داشت. فعالیت این دو آنزیم در تیمارهای بالای جایگزینی به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت. استفاده از پروتئین سبوس برنج با ساختار ساده تر نسبت به پروتئین پودر ماهی با ساختار چهارم پروتئینی شاید یکی از عوامل کاهش ترشح آنزیم‌های پروتئازی روده‌ای شده باشد. کنسانتره پروتئینی سبوس برنج تولید شده در شرایط قلیایی دارای ساختار ساده و قابلیت هضم بالایی می‌باشند (Kumagai *et al.,* 2006) و به احتمال زیاد با اثر گذاشتن آنزیم‌های معده و پانکراسی قابلیت جذب از طریق روده را داشته و سبب تحریک و ترشح آنزیم‌های روده‌ای نشده‌اند. Silva و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه بر روی جایگزینی پودر ماهی با پودر لوبیا و کانولا در ماهی سی بریم به این نتیجه رسیدند که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به طور معنی‌داری در تیمارهای تغذیه شده با تیمارهای جایگزین کاهش یافته است در حالی که فعالیت آنزیم آمینوپپتیداز در این تیمارها نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود (Silva *et al.,* 2010). یکی از مهمترین محدودیتهای استفاده از پودرهای گیاهی وجود فاکتورهای ضد مغذی در آنها بوده که موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های هضمی می‌شوند (Francis *et al.,* 2001). مطالعات نشان داده که ماهی قزل آلای رنگین کمان حساسیت بالایی به ممانعت کننده‌های پروتئازی سویا دارند (Krogdahl *et al.*, 1994؛ Sandholm *et al.*, 1976). سبوس برنج حاوی فیتات، لکتین و ممانعت کننده تریپسین به عنوان فاکتور ضد مغذی می‌باشد (Juliano, 1985). در مطالعه حاضر شاید یکی از علت‌های کاهش فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز وجود همین مواد ضد مغذی در محصول به کار رفته در جیره ماهیان بوده باشد که به همراه کربوهیدرات‌ها از سبوس برنج حذف نشده باشند. همچنین عدم تعادل اسیدهای آمینه جیره غذایی (Watanabe *et al.,* 1995) می‌تواند سبب کاهش ترشح آنزیم‌های فوق باشد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در حضور سوبسترا در حد کمتر چند ساعت افزایش می‌یابد (Nikawa *et al.,* 1998). در مطالعه حاضر حداکثر فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد با بیشترین مقدار پودر ماهی مشاهده شد که احتمالاً به علت حضور مقادیر زیاد فوشو پروتئین (phoshoproteins) در پودر ماهی در مقایسه با پروتئین‌های گیاهی می‌باشد (Silva *et al.*, 2010). به هر حال شاید فعالیت بیشتر این آنزیم‌ها در تیمار شاهد نشانگر این باشد که در ماهیان تغذیه شده با پودرماهی میکروویلی و ویلی روده بهتر

توسعه یافته است.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق فعالیت آنزیم‌های معدوی (پپسین)، پانکراسی (تریپسین و کیموتریپسین) و آنزیم‌های نوار مسواکی (Brush border) روده (آلکالین فسفاتاز و آمینوپپتیداز) مورد بررسی قرار گرفت. در ماهیان تغذیه شده با تیمارهای جایگزین پودر ماهی با کنسانتره پروتئینی سبوس برنج فعالیت آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموترپسین تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند. اما فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آمینو پپتیداز در تیمارهای با جایگزینی بالا به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. استفاده از پروتئین سبوس برنج با ساختار ساده تر نسبت به پروتئین پودر ماهی با ساختار چهارم پروتئینی شاید یکی از عوامل کاهش ترشح آنزیم‌های پروتئازی روده‌ای شده باشد و شاید حضور مواد ضد مغذی و یا عدم تعادل اسیدهای آمینه جیره سبب کاهش فعالیت‌های آنزیم‌های روده شده است که عوامل فوق می‌تواند در کاهش رشد در ماهیان قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با سطوح بالای جایگزینی دخیل باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله حاضر بر خود لازم می‌دارند از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل حمایت‌های مالی از تحقیق حاضر تقدیر و تشکر به عمل آورند. همچنین از خانم مهندس نغمه صوفی زاده به خاطر همکاری فراوان و بی دریغشان در انجام تحقیق فوق و آقای مهندس کمالی مسئول محترم آزمایشگاه شیلات کمال تشکر را دارا هستیم.

منابع

Alexis, M.N., 2005. Use of plant materials in fish diets: carbohydrate fraction and its effect in fish nutrition. In: Howell, B., Flos, R. (Eds), Lessons from the past to optimaise the future, . Aquaculture Europe 2005, 05-09 August 2005, Trondheim, Norway. EAS Special puplication 35, 3-8.

Aragao, C., Conceicao L.E.C., Dias J., Marques A.C., Gomes E., Dinis M.T. 2003. Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. Aquaculture Research 34, 1443-1452.

Babaei SS, Kenari AA, Nazari R, Gisbert E. 2011. Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (Acipenser persicus) during larval ontogeny. Aquaculture 318, 138-144.

Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. Journal of Biological Chemistry 164, 321-329.

Bradford H., 1995. Glutamate, GABA and epilepsy. Progress in Neurobiology 47, 477-511.

Burel C., Boujard T., Corraze G., Kaushik S.J., Boeuf G., Mol K.A., Van Der Geyten S., Kühn E.R. 1998. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. Aquaculture 163, 325-345.

Cahu C., Zambonino Infante J., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161-180.

Cahu C., Zambonino Infante J., Quazuguel P., Le Gall M., 1999. Protein hydrolysate *vs*. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171, 109-119.

Crane R.K., Boge G., 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, 264-267.

Deguara S., Jauncey K., Agius C., 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. Journal of Fish Biology 62, 1033-1043.

Douglas S., Gallant J., Bullerwell C., 1999. Molecular investigation of aminopeptidase N expression in the winter flounder, Pleuronectes americanus. Journal of Applied Ichthyology 15, 80-86.

Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics 95, 271-278.

Escaffre A.M., Zambonino Infante J.È.L., Cahu C.L., Mambrini M., Bergot P., Kaushik S.J. 1997. Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture 153, 63-80.

Farhangi M., Carter C., 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). Aquaculture Research 32, 329-340.

Francis G., Makkar H.P.S, Becker K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture 199, 197-227.

Gallagher M.L., 1994. The use of soybean meal as a replacement for fish meal in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis*). Aquaculture 126, 119-127.

Glencross B, Evans D, Hawkins W, Jones B. 2004. Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 235, 411-422.

Golchinfar F., Zamani A., Hajimoradloo A., Madani R., 2011. Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*: from hatching to primary stages after yolk sac absorption. Iranian Journal of Fisheries Sciences 10, 403-414.

Gomes E.F., Corraze G., Kaushik S., 1993. Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapeseed and peas) on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 113, 339-353.

Hardy R.W., 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. Animal Feed Science and Technology 59, 71-80.

Hardy R.W., Barrows FT., 2002. Diet formulation and manufacture. Fish nutrition 3, 505-600.

Huisman J., Tolman G., 1992. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, P.C., Haresign, W., Cole, D.J.A. (Eds.). Recent Advances in Animal Nutrition. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, UK , pp. 3–31

Juliano B.O., 1985. Rice properties and processing. Food Reviews International 1, 423-445.

Karun T, Uthaiwan K., Satit K., Pisamai S., Rungruangsak-Torrissen, K., 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (Betta splendens Regan, 1910). Aquaculture 322–323, 1-9.

Kaushik S., Médale F., Fauconneau B., Blanc D., 1989. Effect of digestible carbohydrates on protein/energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 79, 63-74.

Kissil G.W., Lupatsch I., Higgs D., Hardy R., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquaculture Research 31, 595-601.

Krogdahl Å., Lea T.B., Olli J.J., 1994. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 107, 215-219.

Krogdahl Å., Bakke-McKellep A., 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.

Kumagai T., Kawamura H., Fuse T., Watanabe T., Saito Y., Masumua T., Watanabe R., Kadowaki M., 2006. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. Journal of Nutritional Science and Vitaminology 52, 467-472.

Leenhouwers J.I., ter Veld M., Verreth J.A.J., Schrama J.W., 2007. Digesta characteristiscs and performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed cereal grains that differ in viscosity. Aquaculture 264, 330-341.

Lemieux H., Blier P., Dutil J.D., 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? Fish Physiology and Biochemistry 20: 293-303.

Mambrini M., Roem A.J., Carvedi J., Lalles J., Kaushik S., 1999. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Animal Science 77, pp: 2990-2999.

Maroux S., Louvard D., Barath J., 1973. The aminopeptidase from hog intestinal brush border. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology 321, 282-295.

Medale F., Boujard T., Vallee F., Blanc D., Mambrini M., Roem A., Kaushik S.J., 1998. Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. Aquatic Living Resources 11, 239-246.

Mente E., Deguara S., Santos M.B., Houlihan D., 2003. White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 225, 133-147.

Nikawa T., Rokutan K., Nanba K., Tokuoka K., Teshima S., Engle M.J., Alpers D.H., Kishi K., 1998. Vitamin A up-regulates expression of bone-type alkaline phosphatase in rat small intestinal crypt cell line and fetal rat small intestine. The Journal of Nutrition 128, 1869-1887.

Olli J., Krogdahl Å., Våbenø A., 1995. Dehulled solvent-extracted soybean meal as a protein source in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture Research 26, 167-174.

Palmegiano G.B., Agradi E., Forneris G., Gai F., Gasco L., Rigamonti E., Sicuro B., Zoccarato I., 2005. Spirulina as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). Aquaculture Research 36: 188-195.

Pavasovic M., Richardson N.A., Anderson A.J., Mann D., Mather P.B., 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab*, Scylla serrata*. Aquaculture 242, 641-654.

Pike I., Andorsdóttir G,, Mundheim H., 1990. The role of fish meal in diets for salmonids: International Association of Fish Meal Manufacturers. Technical Bulletn no. 24

Refstie S., Landsverk T., Bakke-McKellep A.M., Ringo E., Sundby A., Shearer K.D., Krogdahl A., 2006. Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (Gadus morhua) fed standard or bioprocessed soybean meal. Aquaculture 261: 269-284.

Rivas-Vega M, Goytortúa-Bores E, Ezquerra-Brauer J, Salazar-García M, Cruz-Suárez L, Nolasco H, Civera-Cerecedo R. 2006. Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). Food Chemistry 97, 41-49.

Robaina L., Izquierdo M., Moyano F., Socorro J., Vergara J., Montero D., Fernandez-Palacios H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. Aquaculture 130, 219-233.

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

Silva F.C.P., Nicoli J.R., Zambonino-Infante J.L., Le Gall M.M., Kaushik S., 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, 233-237.

Sonoyama K., Kiriyama S., Niki R., 1994. Effect of dietary protein level on intestinal aminopeptidase activity and mRNA level in rats. The Journal of Nutritional Biochemistry 5, 291-297.

Sunde J., Taranger G., 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 25, 335-345.

Sunde J., Eiane S., Rustad A., Jensen H., Opstvedt J., Nygård E., Venturini G., Rungruangsak-Torrissen K., 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition 10, 261-277.

Tarazona J.V., Muñoz M.J., 1995. Water quality in salmonid culture. Reviews in Fisheries Science 3, 109-139.

Wahnon R., Cogan U., Mokady S., 1992. Dietary fish oil modulates the alkaline phosphatase activity and not the fluidity of rat intestinal microvillus membrane. The Journal of Nutrition 122, 1077-1084.

Watanabe T., Verakunpiriya V., Watanabe K., Kiron V., Satoh S., 1997. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. Fisheries Science 63, 258-266.

Watanabe T., Aoki H., Viyakarn V., Maita M., Yamagata Y., Satoh S., Takeuchi T., 1995. Combined use of alternative protein sources as a partial replacement for fish meal in a newly developed soft-dry pellet for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Suisanzoshoku 43, 511-520.

Wilson R.P., Halver J.E., 1986. Protein and amino acid requirements of fishes. Annual review of Nutrition 6, 225-244.

Worthington. 1991. Worthigton enzyme manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold. New Jersey.

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

N. Ahmadi Fard[1], A. Abedian Kenari[2*] and A. Motamedzadegan[3]

[1] Fisheries Department, Marine Science Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran
[2] Fisheries Department, Marine Science Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran
[3] Food Science Department, University of Natural Resources and Agriculture, Sari, Mazandaran, Iran

(Received: 27-Dec.2011 – Accepted: 17-Mar.2012)

Abstract

Consistent composition of high quality diets is extremely important for aquaculture. Digestion and absorption of the nutrients depend directly on activity of digestive enzymes, in particular the protease enzymes in carnivores. The present study investigated the effects of substituting fish meal (FM) with rice bran protein concentrate (RBPC) on digestive enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The activities of gastric (pepsin), pancreatic (trypsin and chymotrypsin) and brush border intestine (alkalinephosphatase and amino peptidase) enzymes were examined in specimens that were fed the experimental diets, *i.e.* FM meal was replaced by RBPC at three levels (10, 25 and 35%). One diet that had no replacement was considered as control. In fish fed vegetable diets, there was no significant difference between groups fed RBPC and the control in the specific activity of gastric (pepsin) and pancreatic (Trypsin and Chymotrypsin) enzymes ($P > 0.05$). Results of intestine enzymes showed that there were significant differences between specimens in the control group and those received higher levels of replacement. The alkalinephosphatase (AP) activity was at the lowest level in RBPC-35 group. No significant difference was detected between the control and RBPC-10 groups in the activity of aminopeptidase (AM) but the activity decreased with increase of level of replacement. Reduced intestinal enzyme activity in high levels of replacement, despite the lack of significant difference between gastric and pancreatic enzymes activity, may be due to simpler protein structure of rice bran protein concentrate compared with that of the fish meal, or nutritional inhibitors may have reduced the activity of digestive enzymes. However, in spite of these differences in intestinal enzymes activity, there was no significant difference in growth characteristics of fishes between 25 % replacement and the control group. It seems that this species is able to adapt to partial substitution of fish meal by RBPC, however, the mechanism for compensating the decrease of specific activity in the enterocytes of rainbow trout is still needed to be investigated.

Key word: Digestive enzyme, Replacement, Rice bran, Proteases and *Oncorhynchus mykiss*

*Corresponding author: Tel: +981226253101 Fax: +986253499 Email: aabedian@modares.ac.ir