فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هفتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

اثرات افزودن مکمل پروتئازی پوشش‌دار به جیره بر روی رشد، ترکیب بدن، برخی شاخص‌های بیوشمیایی خون و فعالیت تریپسین روده فیل‌ماهی (*Huso huso*)

علی خسروانی‌زاده[۱،۲]، محمد سوداگر[۳]*، حسن صالحی[۴]، علیرضا عالیشاهی[۵]، سید مهدی جعفری[۶]

تاریخ دریافت: آبان ۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۶

چکیده

در مطالعه حاضر، به منظور افزایش تاثیر مکمل پروتئازی، یک سیستم رسانش بر مبنای نانوانکپسولاسیون با نانوذرات کیتوزان (۰/۲۵ درصد) ایجاد شد و آزمایشی با ۴ تیمار به مدت ۴۵ روز برای بررسی اثرات پروتئاز نانوکپسوله شده (۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد)، نانوذرات کیتوزان و تیمار شاهد بر روی رشد، شاخص‌کبدی، درصد ترکیبات‌بدن ماهی، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت تریپسین روده فیل‌ماهیان (*Huso huso*) با میانگین وزن ۱۰/۳±۰/۴۹ گرم انجام شد. تیمارهای مختلف در شاخص وضعیت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵)، اما درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه، نرخ بازده پروتئین و شاخص کبدی در گروه‌های تغذیه شده با پروتئاز کپسوله شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های دیگر بود (P<۰/۰۵). بهترین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای پروتئاز کپسوله شده بود که به طور معنی‌داری کمتر از دیگر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). بالاترین میزان پروتئین لاشه در تیمار ۰/۰۱ درصد پروتئاز کپسوله شده مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری در میزان گلوکز، آلبومین و نسبت آلبومین به گلوبولین خون در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در تیمارهای تغذیه شده با پروتئاز کپسوله شده، پروتئین‌کل و گلوبولین خون به طور معنی‌داری بالاتر از دیگر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). نیتروژن اوره‌ای خون در تیمار ۰/۰۲ درصد پروتئاز کپسوله شده در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). بالاترین میزان فعالیت تریپسین روده در تیمار ۰/۰۱ درصد پروتئاز کپسوله شده مشاهده شد (P<۰/۰۵). در مجموع، افزودن مکمل تریپسین کپسوله شده به جیره غذایی می‌تواند کارآیی رشد فیل‌ماهی را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی ارتقا دهد.

واژگان کلیدی: *شاخص‌های رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی خون، فیل‌ماهی، Huso huso، مکمل پروتئازی.*

۱- دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- استادیار گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۴- استاد بخش تحقیقات اقتصادی- اجتماعی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران.
۵- دانشیار گروه فرآوری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۶- دانشیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: sudagar_m@yahoo.com

مقدمه

پپتیدازها از جمله مهم‌ترین گروه‌های آنزیم‌های تجاری هستند، و بیش از ۶۰ درصد تجارت آنزیم‌ها در جهان را به خود اختصاص می‌دهند. در دستگاه گوارش ماهیان، یکی از پپتیدازهای اصلی تریپسین است، یک سرین پپتیداز که پیوندهای پپتیدی را در انتهای کربوکسی آمینواسیدهای آرژنین و لایزین می‌شکند. این آنزیم یک نقش کلیدی در هضم پروتئین‌های جیره ایفا می‌کند و همچنین مسئول فعال‌سازی تریپسینوژن و دیگر زیموژن‌ها است (Polgar, 2005).

استفاده از مکمل‌های آنزیمی در جیره دارای محدودیت‌هایی مانند دمای تغییر ماهیت طبیعی[1] آن‌ها، pH ویژه، نمک فلزات سنگین، بازدارنده‌های مختلف و غیره است. از یک سو آسیب به موکوس دستگاه گوارش در جانوران می‌تواند شانس ابتلا به عفونت را افزایش دهد و از سوی دیگر با توجه به کمبود مطالعات مرتبط با بحث ایمنی آنزیم‌های پانکراسی در جانوران باید تلاش کرد از غلظت‌های مناسب این آنزیم‌ها استفاده شود (Stevens et al., 1998; Campbell et al., 1994; Oades et al., 1994). به علاوه، استفاده از آنزیم‌های پروتئاز تنظیم نشده ممکن است سبب آسیب به روده‌ها و ایجاد استرس شود. برای فایق آمدن بر این مشکلات باید یک سیستم رسانش موثر برای به حداکثر رساندن اثر مکمل آنزیمی با منشا خارجی و کاهش اثرات جانبی آن توسعه یابد (Kumari et al., 2013). استفاده از نانوحامل‌ها، نیمه‌عمر بیومولکول اصلی را برای کنترل تحویل و تحویل مداوم افزایش می‌دهد، زیرا نانوحامل‌ها بیومولکول‌ها را قادر می‌سازند از میان موانع زیستی عبور کنند. پوشش دادن بیومولکول‌ها درون نانوذرات فلزات خنثی مانند طلا و نقره یا انکپسولاسیون با نانوذرات پلیمرهای زیستی، زمینه حفاظت در برابر دژنره شدن سریع، رسانش هدفمند و کنترل رهایش عوامل زیست‌فعال را فراهم می‌کند (Ashraf-Rather et al., 2013). سیستم رهایش کنترل شده برای آنزیم‌های پروتئازی قوی (مانند مونوپروتئازها[2]) گزینه‌ای است که می‌تواند از بروز اثرات جانبی ناشی از به کارگیری این آنزیم‌ها در سیستم گوارش ماهیان بکاهد.

1- Thermolabile Nature
2- Monoproteases

کیتوزان با ساختار پلی۲- آمینو-۲-دئوکسی- بتا-۱ و ۴- دی- گلوکوپیرانوز و فرمول مولکولی $(C_6H_{11}O_4N)n$ از استیل‌زدایی کامل یا جزئی کیتین به دست می‌آید (Gavhane Yogeshkumar et al., 2013). کیتوزان به دلیل ویژگی‌های زیادی مانند زیست‌سازگاری، آبگریزی و زیست‌تخریب‌پذیری (Martino et al., 1995)، شکل‌های متنوع (پودر، دانه‌های ژله‌ای[1]، فیبر، کپسول و پوشش‌ها) نفوذپذیری بالا نسبت به آب، کشش سطحی خوب و پیوستگی خوب با پروتئین‌ها (Noda et al., 2001)، یک ماده ایده‌آل برای تثبیت آنزیم محسوب می‌شود. علاوه بر این کیتوزان یک ماده ارزان، خنثی، غیرسمی و با استحکام مکانیکی بالا است. بنابراین برای تثبیت و پایداری آنزیم مورد توجه است (Kumar, 2000; Ibrahim et al., 2002). آنزیم‌هایی مانند پروتئازها (Hideo and Atsuhito, 1991)، کاتالاز (Pifferi et al., 1993)، پروتئیناز (Min-Liang et al., 1996)، دکستراناز (Cetinus and Oztop, 2003)، پروکسیداز (Yuqing and Swee, 2000)، تیروزیناز (Carvalho et al., 2000)، پاپایین (Hong et al., 2002)، بتا گالاکتوسیداز (Ghanem and Skonberg, 2002)، تریپسین (Jianmin et al., 2006; Kumari et al., 2013)، اوره‌آز (Tzonka et al., 2007) و پپسین (Gamze and Senay, 2007) توسط کیتوزان تجاری تثبیت شده‌اند.

به کارگیری مکمل‌های آنزیمی مختلف در جیره آبزیان در حال افزایش است، از آنزیم‌هایی مانند فیتاز (Masumoto et al., 2001; Denstadli et al., 2007; Wang et al., 2009; Liu et al., 2013)، پروتئاز (Drew et al., 2005; Dalsgaard et al., 2012)، زایلناز (Zhang et al., 2012; Nie et al., 2009) و گلوکوناز (Haberer et al., 1997; Fan et al., 2009) در جیره ماهیان استفاده شده است. در سال‌های اخیر پروتئازها به دلیل افزایش قیمت پروتئین جیره مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند. استفاده از پروتئازها برای بهبود قابلیت هضم پروتئین به شکل گسترده‌ای در ماکیان و خوک مورد بررسی قرار گرفته است (O'-Doherty and Forde 1999; Ghazi et al., 2002, 2003; Yu et al., 2007; Oxenboll et al., 2011). مطالعات مشابهی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*؛ Drew et al., 2005؛ Dalsgaard et al., 2012)، کپور سیاه (*Mylopharyngodon piceus*؛

1- Gel Beads

Chen et al., 2009)، و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*؛ Leng et al., 2008) نیز گزارش شده است. نتایج این مطالعات بهبود معنی‌دار رشد و بهره‌برداری از مواد مغذی را در ماهیانی که از مکمل پروتئازی در جیره آن‌ها استفاده شده بود، نشان داد.

در تولید و پرورش ماهیان خاویاری به مانند دیگر آبزیان غذا و تغذیه عاملی اثرگذار و تعیین کننده محسوب می‌شود (Lindberg and Doroshov, 1986; Hung et al., 1989). با وجود انجام پژوهش‌های گسترده در سال‌های اخیر درباره تغذیه، نیازهای تغذیه‌ای، جیره‌های مصنوعی و غیره در ماهیان خاویاری، همچنان نیاز به مطالعات جدید و تکمیلی است. بنابراین، با توجه به موفقیت‌های به دست آمده در زمینه به کارگیری نانوذرات کیتوزان در افزایش کارآیی ویتامین (Alishahi et al., 2011)، هورمون (Ashraf-Rather et al., 2013) و آنزیم (Kumari et al., 2013) و اهمیت فیل‌ماهی در صنعت آبزی‌پروری ایران، در این پژوهش اثر افزودن مکمل آنزیمی پروتئازی پوشش داده شده با نانوذرات کیتوزان به جیره فیل‌ماهی و اثر آن بر قابلیت هضم، رشد، ترکیبات لاشه، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت آنزیم تریپسین روده ماهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰ قطعه فیل‌ماهی (*Huso huso*) با میانگین وزن ۰/۳±۱۰/۲ گرم در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان تهیه و در وان‌های ۲۰۰۰ لیتری، با ۱۰۰۰ لیتر آب و دبی ۸ لیتر در دقیقه برای یک دوره ۱۵ روزه سازگار شدند. ماهیان در طول این مدت با جیره تجاری متداول (Coppens، هلند) تغذیه شدند. بعد از دوره سازگاری، ماهیان به صورت انفرادی زیست‌سنجی شدند و سپس به صورت تصادفی در ۴ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ ماهی) بر اساس یک طرح کاملا تصادفی توزیع شدند. آزمایش برای یک دوره ۴۵ روزه اجرا شد. درجه حرارت آب روزانه و pH و اکسیژن محلول هر هفته با شیوه‌های استاندارد ارزیابی و ثبت شدند.

مکمل آنزیمی مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از کیتوزان (Sigma-Aldrich، آمریکا) با وزن مولکولی پایین (۱۵۰-۳۱۰ کیلودالتون) و درجه استیل‌زدایی بیش از ۷۵ درصد تهیه شد. برای تهیه نانوذرات، ۲۵۰ میلی‌گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۱ درصد به کمک همزن مغناطیسی با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حل شد. محلول ۰/۲۵ درصد سدیم تری‌پلی‌فسفات

(STPP) به نسبت ۱:۲ به محلول کیتوزان افزوده شد تا محلول کلوئیدی شود. در ادامه محلول ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصدی از آنزیم تریپسین خوکی (EC 3.4.21.4؛ Sigma-Aldrich، آمریکا) در فسفات بافر ۶۷ میلی‌مولار تهیه و به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان- تری‌پلی‌فسفات افزوده شد. بعد از تشکیل نانوکپسول‌های تریپسین- کیتوزان محلول تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ارزیابی اندازه و پتانسیل زتا نانوکپسول‌ها توسط دستگاه تفرق نوری پویا[1] (DLS) بروخاون (Nano ZS، Brookhaven Instruments، Zeta Plus Particle Sizing، آمریکا) در مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB) دانشگاه تهران صورت گرفت.

طی دوره تیمار، برای تغذیه ماهیان از جیره تجاری با محتوای ۵۰ درصد پروتئین، ۱۴ درصد چربی، ۰/۸ درصد فیبر و ۸/۶ درصد خاکستر به عنوان جیره پایه استفاده شد. بر روی جیره ۱ (شاهد) بافر بدون آنزیم، محلول حاوی نانوذرات کیتوزان به میزان ۰/۲۵ درصد بر روی جیره ۲، محلول‌های حاوی آنزیم تریپسین به میزان ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد نیز به ترتیب بر روی جیره‌های شماره ۳ و ۴ اسپری شد (جدول ۱) و در نهایت برای به حداقل رساندن آب‌شویی، بر روی تمام جیره‌ها مقدار ثابتی پودر ژله حل شده در آب، اسپری شد (عادلیان و همکاران، ۱۳۹۵).

غذادهی روزانه دو بار (۹ صبح و ۶ عصر) و به میزان ۳ درصد از وزن بدن انجام شد.

برای سنجش رشد، هر ۱۵ روز یک بار وزن ماهیان با ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم و طول کل آن‌ها با دقت یک میلی‌متر اندازه‌گیری شد. میزان غذادهی نیز مطابق با افزایش وزن تنظیم شد.

جدول ۱: ترکیب جیره در تیمارهای مختلف

تیمارها	ترکیب جیره
تیمار ۱ (تیمار شاهد)	جیره پایه
تیمار ۲	جیره پایه به همراه نانوذرات کیتوزان ۰/۲۵ درصد
تیمار ۳	جیره پایه به همراه ۰/۰۱ درصد مکمل آنزیمی تریپسین با پوشش کیتوزان
تیمار ۴	جیره پایه به همراه ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی تریپسین با پوشش کیتوزان

1- Dynamic Light Scattering

تجزیه تقریبی ترکیبات لاشه ماهیان برای اندازه‌گیری میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر بر اساس دستور العمل AOAC (۲۰۰۵) انجام شد. برای این منظور، در پایان دوره از هر تکرار ۳ ماهی به صورت تصادفی صید و بخشی از عضله پشتی آن‌ها برداشته شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری رطوبت جیره از آون ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد، برای سنجش پروتئین خام از روش کجلدال در سه مرحله هضم، تقطیر و تیتراسیون و ضرب کردن میزان نیتروژن به دست 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 شد (AOAC, 2005).

با استفاده از داده‌های به دست آمده از زیست‌سنجی‌ها، اندازه‌گیری وزن کبد و نیز میزان پروتئین موجود در غذا و اندازه‌گیری پروتئین لاشه، شاخص‌های درصد افزایش وزن بدن (BWI)، ضریب چاقی (CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR)، نرخ بازده پروتئین (PER)، شاخص کبدی (HSI) و نرخ بقا (SR) طبق رابطه‌های ۱ تا ۷ تعیین شد (Tacon, 1990).

رابطه ۱:

$$BWI\ (\%) = [(W_f - W_i) / W_i] \times 100$$

W_i: وزن اولیه (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم).

رابطه ۲:

$$CF = (W / L^3) \times 100$$

W: وزن (گرم)؛ L: طول کل (سانتی‌متر).

رابطه ۳:

$$FCR = F / W$$

F: مقدار غذای مصرف شده (گرم)؛ W: وزن به دست آمده (گرم).

رابطه ۴:

$$SGR\ (\%/day) = [(Ln\ W_f - Ln\ W_i) / t] \times 100$$

W_i: وزن اولیه (گرم)؛ W_f: وزن نهایی (گرم)؛ t: طول دوره پرورش (روز).

رابطه ۵:

$$PER\ (\%) = (W / P) \times 100$$

W: وزن به دست آمده (گرم)؛ P: پروتئین مصرف شده (گرم).

رابطه ۶:

$$HSI\ (\%) = (W_L / W_B) \times 100$$

W_L: وزن کبد (گرم)؛ W_B: وزن بدن (گرم).

رابطه ۷:

$$SR\ (\%) = (N_f / N_i) \times 100$$

N_i: تعداد ماهیان در ابتدا دوره؛ N_f: تعداد ماهیان در پایان دوره.

در انتهای دوره پرورش از هر واحد آزمایشی (هر تکرار) سه ماهی (از هر تیمار آزمایشی ۹ ماهی) پس از بیهوشی خونگیری شد. از هر ماهی ۱/۵ میلی‌لیتر خون از محل سیاهرگ دمی، در انتهای باله مخرجی توسط سرنگ استریل گرفته شد و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. سرم با سانتریفیوژ (5810R، Eppendorf، آلمان) نمونه خون به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه جدا شد و به تیوب‌های استریل انتقال یافت. نمونه‌های سرم تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شاخص‌های بیوشمیایی خون شامل گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN)، پروتئین کل و آلبومین با استفاده از کیت‌های کلینیکی تجاری (پارس آزمون، ایران) سنجیده شد. میزان گلوبولین نیز با کم کردن میزان آلبومین از پروتئین کل به دست آمد و نسبت آلبومین به گلوبولین سرم از تقسیم میزان آلبومین بر گلوبولین به دست آمد.

از هر تکرار ۳ عدد ماهی با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع شد و به منظور به حداقل رساندن فعالیت‌های آنزیمی سریعا در مجاورت یخ کالبدگشایی شد. روده ماهیان به دقت خارج، تخلیه و با دقت یک میلی‌گرم توزین شد. به کمک هموژنایزر (T25 Digital، IKA-Werke، آلمان) یک محلول هموژن از بافت روده‌ها در ۹ میلی‌لیتر بافر (۱۰۰mM بافر Tris-HCl به همراه ۰/۱mM EDTA و ۰/۱٪ Triton X-100، pH ۷/۸) تهیه شد. سوسپانسیون به دست آمده با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و از فاز رویی نمونه‌ها برای سنجش میزان آنزیم تریپسین استفاده شد (Furne et al., 2008). فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و سوبسترای BAPNA (Nα–benzoyl- DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) سنجش شد. برای این منظور، در ابتدا ۴۳/۵ میلی‌گرم BAPNA در یک میلی‌لیتر DMSO (Dimethylsulphoxide) حل شد و سپس با محلول بافر Tris–HCl ۰/۰۵ مولار ($CaCl_2.2H_2O$ ۰/۰۲ مولار، pH ۷/۵) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱/۲۵ سوبسترای آماده شده (BAPNA) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس

واکنش با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۳۰ درصد متوقف و میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. میزان آنزیم تریپسین از طریق رابطه ۸ محاسبه شد (Erlanger, 1961).

رابطه ۸:

$$E = (A \times V \times 1000) / (8800 / W)$$

E: غلظت آنزیم تریپسین (واحد در میلی‌گرم پروتئین)؛ A: میزان جذب نور در طول موج ۴۱۰ نانومتر؛ V: حجم مخلوط واکنش (میلی‌لیتر)؛ W: وزن پروتئین در مخلوط واکنش (میلی‌گرم).

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

داده‌های به دست آمده به کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۲) با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه میانگین بین تیمارها، از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد.

نتایج

در طول دوره پرورش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب در حد متعارف (دما ۲۵/۸۹±۰/۸ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۶/۴±۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، pH ۸/۱±۰/۱) بودند و هیچ گونه مرگ و میری در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. آنزیم‌های پوشش داده شده ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد به ترتیب دارای میانگین اندازه ۱۱۰/۰±۱/۳ و ۱۵۶/۲±۲/۴ نانومتر و پتانسیل زتا ۴۱/۰۰±۱/۶۱ و ۳۹/۸۴±۱/۶۶ میلی‌ولت بودند. در پایان ۴۵ روز پرورش، شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه، نرخ بازده پروتئین و شاخص کبدی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل آنزیمی پوشش داده شده با نانوذرات کیتوزان (۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد) به طور معنی‌داری از ماهیان گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی نانوذرات ۰/۲۵ درصد کیتوزان بالاتر بود (P<۰/۰۵). در مورد شاخص‌های بالا، اختلاف معنی‌داری بین ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی دیده نشد (P>۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی (FCR) به طور معنی‌داری در گروه شاهد بالاتر از سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای تغذیه شده با مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی پوشش‌دار مشاهده شد. ضریب چاقی در تیمارهای مختلف

اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). در مورد نرخ بقا نیز بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵؛ جدول ۲).

در جدول ۳ نتایج مربوط به اثر افزودن مقادیر مختلف مکمل آنزیمی پوشش داده شده با نانوذرات کیتوزان در جیره بر ترکیب بدن فیل‌ماهیان پرورشی آورده شده است. مقادیر رطوبت و چربی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد (P>۰/۰۵). بیشترین میزان پروتئین متعلق به ماهیان تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۱ درصد آنزیم بود، که به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). میزان خاکستر در تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). کمترین میزان خاکستر نیز در تیمار تغذیه با جیره حاوی نانوذرات کیتوزان مشاهده شد که به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (P>۰/۰۵).

جدول ۲: شاخص‌های رشد و کبدی فیل‌ماهیان در تمیارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص / تیمار	شاهد	کیتوزان ٪۰/۲۵	مکمل آنزیمی ٪۰/۰۱	مکمل آنزیمی ٪۰/۰۲
وزن اولیه (گرم)	۱۰/۴±۰/۲	۱۰/۲±۰/۵	۱۰/۳±۰/۴	۱۰/۲±۰/۳
وزن نهایی (گرم)	۲۶/۱±۲/۸ a	۲۸/۲±۱/۴ a	۳۶/۱±۳/۴ b	۳۳/۶±۳/۷ b
درصد افزایش وزن	۱۵۰/۹±۳۱/۹ a	۲۷۶/۴±۱۴/۶ b	۳۵۰/۶±۳۹/۱ c	۳۳۰/۱±۴۵/۵ c
SGR (درصد در روز)	۲/۰±۰/۲۸ a	۲/۲±۰/۱۱ b	۲/۷±۰/۲۴ c	۲/۶±۰/۳۰ c
ضریب تبدیل غذایی	۲/۱۸±۰/۴ c	۱/۸۴±۰/۱ b	۱/۳۱±۰/۲ a	۱/۴۶±۰/۳ a
نرخ بازده پروتئین (٪)	۰/۹۵±۰/۲ a	۱/۰۹±۰/۰ a	۱/۵۶±۰/۲ b	۱/۴۲±۰/۳ b
شاخص وضعیت	۰/۳۳±۰/۰۳	۰/۳۴±۰/۰۳	۰/۳۶±۰/۰۴	۰/۳۵±۰/۰۴
شاخص کبدی (٪)	۳/۲±۰/۱۵ a	۳/۲±۰/۰۳ a	۳/۹±۰/۰۷ b	۳/۸±۰/۰۶ b
نرخ بقا (٪)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

وجود حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

جدول ۳: ترکیب بیوشمیایی لاشه فیل‌ماهیان در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص / تیمار	شاهد	کیتوزان ٪۰/۲۵	مکمل آنزیمی ٪۰/۰۱	مکمل آنزیمی ٪۰/۰۲
رطوبت (٪)	۷۶/۷۱±۰/۸۲	۷۶/۶۳±۰/۶۶	۷۵/۵۱±۰/۵۲	۷۵/۵۷±۰/۳۷
پروتئین خام (٪)	۱۴/۸۱±۰/۱۹ [a]	۱۵/۱۳±۰/۳۱ [a]	۱۵/۷۹±۰/۳۸ [b]	۱۵/۳۴±۰/۲۱ [ab]
چربی خام (٪)	۴/۵۷±۰/۳۷	۴/۶۵±۰/۱۴	۴/۳۳±۰/۳۲	۴/۴۶±۰/۲۸
خاکستر (٪)	۳/۴۸±۰/۰۳ [b]	۳/۲۶±۰/۰۵ [a]	۳/۶۸±۰/۰۸ [c]	۳/۷۹±۰/۱۱ [c]

وجود حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

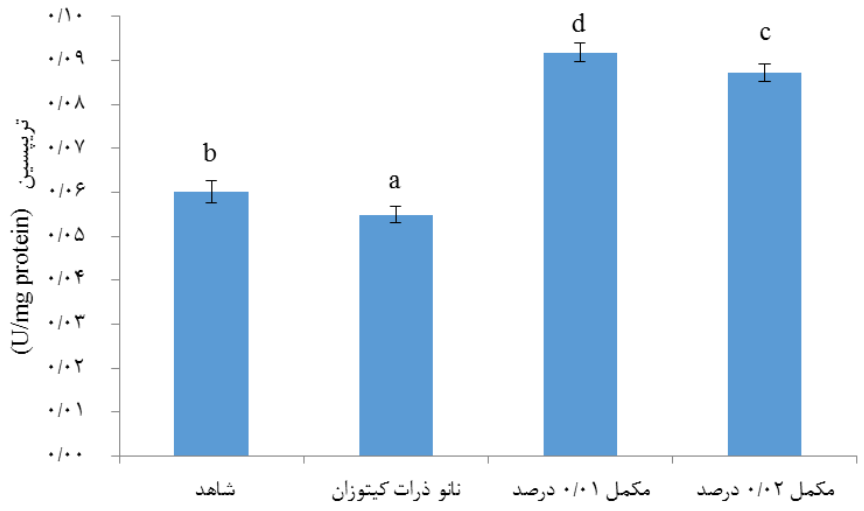
جدول ۴ میزان شاخص‌های بیوشمیایی خون شامل گلوکز، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد، بر اساس نتایج به دست آمده در مورد شاخص‌های گلوکز، آلبومین و نسبت آلبومین به گلوبولین اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بالاترین میزان نیتروژن اوره‌ای خون در تیمار تغذیه شده با ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی پوشش‌دار مشاهده شد که به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). بالاترین میزان گلوبولین نیز در تیمار ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی مشاهده شد که به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی به شکل معنی‌داری پروتئین کل بالاتری را درمقایسه با سایر تیمارها نشان دادند (P<۰/۰۵).

نتایج حاصل از سنجش آنزیم تریپسین روده فیل‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف در شکل ۱ آمده است. میزان فعالیت آنزیم تریپسین در روده ماهیان تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۱ درصد مکمل آنزیمی پوشش‌دار به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود (P<۰/۰۵). میزان فعالیت این آنزیم در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد مکمل آنزیمی پوشش‌دار نیز به شکل معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی نانوذرات کیتوزان بود (P<۰/۰۵).

جدول ۴: شاخص‌های بیوشمیایی خون فیل‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص / تیمار	شاهد	کیتوزان ٪۰/۲۵	مکمل آنزیمی ٪۰/۰۱	مکمل آنزیمی ٪۰/۰۲
گلوکز (mg/dl)	۵۰/۰±۵/۵	۴۲/۰±۲/۶	۴۲/۶±۶/۰	۴۴/۶±۴/۰
BUN (mmol/l)	۱/۴۴±۰/۱۸ a	۱/۳۳±۰/۲۵ a	۱/۶۱±۰/۰۷ ab	۱/۸۲±۰/۱۴ b
پروتئین کل (mg/dl)	۰/۹۳±۰/۰۷ a	۰/۹۰±۰/۰۵ a	۱/۱۲±۰/۰۶ b	۱/۲۳±۰/۱۰ b
آلبومین (mg/dl)	۰/۳۸±۰/۰۱	۰/۳۶±۰/۰۸	۰/۴۱±۰/۰۸	۰/۴۳±۰/۰۵
گلوبولین (mg/dl)	۰/۵۴±۰/۰۵ a	۰/۵۳±۰/۰۳ a	۰/۷۰±۰/۰۲ b	۰/۷۹±۰/۰۴ c
نسبت آلبومین به گلوبولین	۰/۷۰±۰/۰۴	۰/۶۹±۰/۲۰	۰/۵۹±۰/۱۴	۰/۵۴±۰/۰۳

وجود حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۱: اثر جیره‌های مختلف بر فعالیت تریپسین روده فیل‌ماهی (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بحث

پروتئازها آنزیم‌هایی هستند که به شکل اختصاصی پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها را هیدرولیز می‌کنند. پروتئازهای گوارشی پروتئین غذا را هیدرولیز می‌کنند. با توجه به مشارکت پروتئازها در فرآیند هضم، اعتقاد بر این است که برای بهبود ارزش تغذیه‌ای جیره، باید از پروتئازها به عنوان مکمل در جیره استفاده کرد. با وجود این که مکمل‌سازی خوراک با پروتئازها یا مخلوطی از آنزیم‌ها ممکن است اثرات مثبتی روی عملکرد ماهیان داشته باشد (Maugle et al., 1983; Kolkovski et al., 1993)، در بسیاری از موارد، نتایج متناقضی در مطالعات مختلف گزارش شده است زیرا آنزیم‌ها توسط بعضی ترکیبات در سیستم گوارش ماهی مورد تغذیه، غیرفعال می‌شوند (Campbell and Bedford 1992; Divakaran and Velasco 1999; Garcia-Ruiz et al., 2006; Miller et al., 2007). یکی از راهکارهای محافظت از آنزیم‌ها پوشش دادن آن‌ها است. در مطالعه حاضر مکمل پروتئازی با استفاده از نانوذرات کیتوزان پوشش داده شد. نتایج این بررسی نشان داد استفاده از مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۰۲ درصد مکمل پروتئازی پوشش‌دار در جیره فیل‌ماهی در کنار کاهش ضریب تبدیل غذایی، شاخص‌های رشد شامل وزن نهایی، درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه، نرخ بازده پروتئین و شاخص کبدی را بهبود بخشید، میزان پروتئین و خاکستر لاشه را افزایش داد، اما بر شاخص وضعیت و بقا اثر معنی‌داری نداشت.

در مطالعات مختلفی که برای بررسی اثرات افزودن آنزیم‌های مکمل پروتئازی به صورت منفرد (مانند تریپسین، پاپایین و پروتئازهای باکتریایی) در جیره صورت گرفته است عمدتا افزودن آنزیم‌های پروتئازی به جیره سبب افزایش رشد و بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای در آبزیان شده است (جدول ۵). مشابه نتایجی که در مطالعه حاضر نیز به دست آمد. تنها در مطالعه Kolkovski و همکاران (۱۹۹۷) استفاده از ۰/۰۵ درصد آنزیم پانکراس خوک در جیره لاروهای ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) اثر معنی‌داری بر رشد لاروها نداشت.

جدول ۵: خلاصه مطالعات مختلف در زمینه استفاده از آنزیم‌های پروتئازی منفرد در جیره آبزیان

مکمل آنزیمی	گونه	اثرات بر رشد	منبع
آنزیم تریپسین	کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)	افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی	Dabrowski و Glogowski (۱۹۷۷)
عصاره آنزیمی روده و پانکراس کپور	لاروهای کپور معمولی	افزایش رشد	Dabrowska و همکاران (۱۹۷۹)
آنزیم پانکراس خوک	لارو ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*)	اثر معنی‌داری بر رشد لاروها نداشت	Kolkovski و همکاران (۱۹۹۷)
پروتئاز طبیعی	کپور سیاه (*Mylopharyngodon piceus*)	افزایش رشد، بهبود قابلیت هضم ظاهری پروتئین، کاهش ضریب تبدیل غذایی و بی اثر بر شاخص کبدی	Chen و همکاران (۲۰۰۹)
آنزیم Papain (پروتئازی گیاهی)	کپور معمولی	افزایش رشد، نرخ رشد ویژه، بازده پروتئین و کاهش ضریب تبدیل غذایی	Singh و همکاران (۲۰۱۱)
تریپسین پوشش‌دار	ماهی روهو (*Labeo rohita*)	افزایش نرخ رشد ویژه، شاخص کبدی و قابلیت‌هضم، کاهش ضریب تبدیل غذایی	Kumari و همکاران (۲۰۱۳)
آنزیم Papain	میگو آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*)	افزایش رشد و بقا	Patil و Singh (۲۰۱۴)
پروتئاز باکتریایی	میگو پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)	افزایش رشد، نرخ رشد ویژه، بازده پروتئین و کاهش ضریب تبدیل غذایی	Song و همکاران (۲۰۱۶)
آنزیم تریپسین	فیل‌ماهی (*Huso huso*)	افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی	خسروانی‌زاده و همکاران (۱۳۹۶)
آنزیم تریپسین پوشش‌دار	فیل‌ماهی	فزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی	مطالعه حاضر

در مطالعاتی که در آن‌ها از آنزیم‌های مکمل پروتئازی در کنار آنزیم‌های مکمل دیگر در جیره ماهیان مختلف استفاده شده بود، تنها در موارد معدودی افزایش رشد در ماهیان گزارش شد (جدول ۶). یکی از این موارد مربوط به مطالعه‌ای است که توسط Ghomi و همکاران (۲۰۱۲) بر روی فیل‌ماهی انجام شد. آن‌ها نشان دادند استفاده از مولتی آنزیم کمین (که حاوی پروتئاز نیز است) در جیره فیل‌ماهی سبب افزایش رشد و شاخص رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی شد، به طوری که میزان ۲۵۰ میلی‌گرم آنزیم در هر کیلوگرم غذا بیشترین رشد را نشان

جدول ۶: خلاصه مطالعات مختلف در زمینه استفاده از آنزیم‌های پروتئازی به همراه دیگر آنزیم‌ها در جیره آبزیان

مکمل آنزیمی	گونه	اثرات بر رشد	منبع
مخلوط آنزیمی (تریپسین، پروتئاز قلیایی، پروتئاز اسیدی، آمینو گلوکوسیداز، آمیلاز و سلولاز)	ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*)	افزایش رشد و کارآیی خوراک	Carter و همکاران (۱۹۹۴)
مکمل چند آنزیمی کربوهیدراز و پروتئاز	ماهی آزاد اقیانوس اطلس	بی‌اثر	Carter (۱۹۹۸)
پروتئاز قارچی، مولتی آنزیم AK، پروتئاز Enzeco و Enzyme Superzyme (پروتئاز و کربوهیدراز)	میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)	بی‌تاثیر بر بقا، وزن و نرخ رشد ویژه	Divakaran و Velasco (۱۹۹۹)
	قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)	بی‌اثر بر رشد	Ogunkoya و همکاران (۲۰۰۶)
پروتئاز، بتا-گلوکوناز و زایلاناز	تیلاپیای هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*)	بهبود رشد، نرخ رشد ویژه و بازده پروتئین، کاهش شاخص کبدی و بی اثر بر ضریب چاقی	Lin و همکاران (۲۰۰۷)
مخلوط آنزیمی حاوی پروتئاز باکتریایی	قزل‌آلای‌رنگین‌کمان	بی اثر بر رشد	Farhangi و Carter (۲۰۰۷)
Aquagrow (پروتئازی باکتریایی)	کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)	بهبود فاکتورهای رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی	Leng و همکاران (۲۰۰۸)
مولتی آنزیم کمین (حاوی پروتئاز)	فیل‌ماهی (*Huso huso*)	افزایش رشد و شاخص رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی	Ghomi و همکاران (۲۰۱۲)
بتا-گلوکاناز، زایلاناز و پروتئاز	قزل‌آلای‌رنگین‌کمان	بی اثر بر رشد	Dalsgaard و همکاران (۲۰۱۲)
ناتوزایم (حاوی پروتئاز) و همی‌سل	ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)	افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل‌غذایی	Zamini و همکاران (۲۰۱۴)
Aquagrow	ماهی تیلاپیا و میگو پاسفید غربی	افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل‌غذایی	Li و همکاران (۲۰۱۵)
Aquagrow	کاراس طلایی (*Carassius auratus gibelio*)	افزایش رشد	Shi و همکاران (۲۰۱۶)
آویزایم (پروتئاز، زایلاناز و آمیلاز)	قزل‌آلای‌رنگین‌کمان	بهبود شاخص‌های رشد و بقا	قبادی و همکاران (۱۳۸۸)
کمین و فیتاز	قزل‌آلای‌رنگین‌کمان	بی اثر بر رشد، بقا و ضریب تبدیل غذایی	مرتضوی تبریزی و همکاران (۱۳۹۰)
کمین	کپور معمولی	افزایش رشد، نرخ رشد ویژه و کاهش ضریب تبدیل غذایی	عادلیان و همکاران (۱۳۹۵)

داد. همچنین بیشترین میزان شاخص رشد ویژه و پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی در این غلظت گزارش شد (Ghomi et al., 2012).

در بررسی Kumari و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ماهی روهو (*Labeo rohita*) که با استفاده از افزودن آنزیم تریپسین پوشش داده شده با نانوذرات کیتوزان به جیره غذایی انجام شد، نیز نتایج مشابه نتایج مطالعه حاضر به دست آمد. به طوری که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی مکمل ۰/۰۱ درصد تریپسین پوشش داده شده با نانوذرات ۰/۴ درصد کیتوزان در مقایسه با سایر تیمارها دارای بالاترین میزان نرخ رشد ویژه، نرخ بازده پروتئین و شاخص کبدی و کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی بود.

در مجموع با بررسی نتایج به دست آمده در منابع مختلف و نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت افزودن پروتئاز به جیره غذایی عمدتا توانسته است شاخص‌های رشد را بهبود بخشد، در موارد معدودی هم که به افزایش رشد منجر نشده، احتمالا عواملی مانند انتخاب نوع آنزیم، شیوه فرآوری آنزیم، نحوه افزودن آنزیم به جیره، نحوه نگهداری جیره، گونه آبزی، نحوه تغذیه آن و غیره را موثر دانست.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از مکمل پروتئازی پوشش‌دار در جیره فیل‌ماهی تاثیری بر محتوای رطوبت و چربی لاشه ماهیان نداشت، اما میزان خاکستر لاشه ماهیان بیشتر از گروه شاهد بود. میزان پروتئین لاشه نیز در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۱ درصد آنزیم، بالاتر از تیمار شاهد بود. در مطالعه Lin و همکاران (۲۰۰۷) استفاده از مولتی‌آنزیم حاوی پروتئاز در ماهی تیلاپیای هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) اثری بر ترکیبات لاشه ماهیان نداشت. نتایج مشابهی نیز در مطالعات Shi و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus gibelio*) با استفاده از آنزیم AG، Leng و همکاران (۲۰۰۸) بر روی کپور معمولی با استفاده از آنزیم AG و Kolkovski و همکاران (۱۹۹۷) بر روی باس دریایی با استفاده از آنزیم پانکراس، گزارش شد. در بررسی Song و همکاران (۲۰۱۶) استفاده از پروتئاز باکتریایی در جیره میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) 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 (۲۰۱۲) استفاده از آنزیم کمین، پروتئین لاشه را در گروه‌های مختلف به طور 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 (Ghomi et al., 2012).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره فیل‌ماهی بر گلوکز، آلبومین و نسبت آلبومین به گلوبولین خون بی‌تاثیر بود، اما BUN، پروتئین کل وگلوبولین را افزایش داد. در مطالعه عادلیان و همکاران (۱۳۹۵) میزان گلوکز، پروتئین کل و آلبومین در ماهیان کپور تغذیه شده با جیره حاوی کمین تغییر 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) استفاده از آنزیم تریپسین (به دو شکل پوشش‌دار و بدون پوشش) در جیره ماهی روهو سبب کاهش میزان گلوکز خون شد. نسبت آلبومین به گلوبولین نیز در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت، که این کاهش در تیمارهایی که از آنزیم تریپسین به شکل پوشش داده شده با نانوذرات کیتوزان به عنوان مکمل غذایی استفاده شد شدیدتر بود. میزان نیتروژن اوره‌ای خون و گلوبولین در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت، بالاترین میزان نیتروژن اوره‌ای خون در تیمار تغذیه شده با مکمل ۰/۰۲ درصد مکمل پوشش‌دار بود و بالاترین سطح گلوبولین در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی مکمل ۰/۰۱ درصد مکمل پوشش‌دار مشاهده شد. پروتئین کل در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی مکمل بدون پوشش تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت، اما در تیمارهای تغذیه شده با مقادیر مختلف مکمل پوشش‌دار میزان پروتئین کل نسبت به گروه‌های دیگر افزایش داشت، این افزایش در تیمار ۰/۰۱ درصد تریپسین پوشش داده شده با نانوذرات کیتوزان در بالاترین سطح قرار داشت. در مورد آلبومین تغییرات روند مشخصی نداشت.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از آنزیم پروتئاز پوشش‌دار در جیره فیل‌ماهی، فعالیت تریپسین در روده ماهیان را به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش داد. در مطالعه Kumari و همکاران (۲۰۱۳) نیز استفاده از آنزیم تریپسین در دو شکل پوشش‌دار و بدون پوشش فعالیت پروتئازی روده را نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد. در این مطالعه در تیمارهایی که از آنزیم پوشش‌دار استفاده شد میزان فعالیت پروتئازی روده به طور

معنی‌داری بالاتر از تیماری بود که از آنزیم به شکل عریان استفاده شد. بین تیمارهایی که از مقادیر مختلف آنزیم تریپسین پوشش‌دار به عنوان مکمل آنزیمی استفاده شد اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فعالیت پروتئازی روده مشاهده نشد (Kumari et al., 2013). Lin و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند استفاده از مولتی آنزیم حاوی پروتئاز طبیعی در جیره تیلاپیای هیبرید باعث افزایش فعالیت پروتئاز روده و پانکراس شد، 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 مکمل پروتئازی آکواگرو 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 آکواگرو در جیره‌های حاوی آرد ماهی کم، فعالیت پروتئاز پانکراس میگو پاسفید غربی را افزایش داد و به سطح جیره‌های با آرد ماهی زیاد رساند، اما در فعالیت پروتئاز روده تغییری مشاهده نشد. در مطالعه Song و همکاران (۲۰۱۶) نیز فعالیت تریپسین در هپاتوپانکراس میگو پاسفید غربی با افزایش سطح آنزیم پروتئاز باکتریایی در جیره‌های حاوی آرد ماهی کم، افزایش یافت، اما این افزایش کمتر از جیره حاوی آرد ماهی زیاد بود. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد استفاده از مکمل پروتئازی در جیره آبزیان می‌تواند سبب افزایش فعالیت پروتئازی اندام‌های آن‌ها شود، نتایجی که در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد.

به طور کلی پژوهش حاضر نشان داد استفاده از مکمل آنزیمی پروتئاز پوشش داده شده با کیتوزان در جیره غذایی فیل‌ماهی کارایی جیره را افزایش داد و سبب بهبود فاکتورهای رشد شد. مطالعه حاضر استفاده از غلظت ۰/۰۱ درصد پروتئاز پوشش‌دار در جیره فیل‌ماهی را توصیه می‌کند. هر چند ممکن است استفاده از مقادیر بالاتر این آنزیم و یا روش‌های به کارگیری دیگر دارای تاثیرات بهتری باشند، اما تایید آن نیازمند پژوهش‌های تکمیلی خواهد بود. از سوی دیگر استفاده از مکمل پروتئازی پوشش‌دار به بقای ماهیان لطمه‌ای وارد نکرد و اثرات جانبی در بر نداشت. انجام مطالعات بیشتر در زمینه ایمن بودن این مکمل برای فیل‌ماهی می‌تواند در آینده صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت و پرسنل مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان به ویژه 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 به عمل می‌آید.

منابع

حسینی‌فرد س.م.، قبادی ش.، خدابخش ا. و رازقی منصور م. ۱۳۹۲. تاثیر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آرد سویا همراه با مکمل آنزیمی آویزایم بر شاخص‌های هماتولوژی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله دامپزشکی ایران، ۹(۳): ۵۴-۴۳.

خسروانی‌زاده ع.، سوداگر م.، صالحی ح.، عالیشاهی ع.ر. و جعفری م. ۱۳۹۶. استفاده از آنزیم تریپسین در جیره غذایی فیل ماهی (*Huso huso*) و اثرات آن بر رشد، ترکیب بدن، برخی فاکتورهای بیوشیمیایی خون و فعالیت تریپسین روده. فصلنامه محیط زیست جانوری، ۹(۳): ۲۱۸-۲۱۱.

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، ۸(۱): ۲۰۶ - ۲۰۱.

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، ۳(۲): ۲۲-۱۱.

مرتضوی تبریزی 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، ۵(۱): ۵۵-۴۹.

Ashraf-Rather M., Sharma R., Gupta S., Ferosekhan S., Ramya V.L. and Jadhao S.B. 2013. Chitosan-nanoconjugated hormone nanoparticles for sustained surge of gonadotropins and enhanced reproductive output in female fish. Plos One, 8(2): 1–10.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

Alishahi A., Mirvaghefi A., Tehrani M.R., Farahmand H., Koshio S., Dorkoosh F.A. and Elsabee M.Z. 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate Polymers, 86: 142–146.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis. AOAC, USA. 532P.

Campbell C.A., Forrest J. and Muscgrove C. 1994. High-strength pancreatic enzyme supplements and large-bowel stricture in cystic fibrosis. The Lancet, 343: 109–110.

Campbell G.L. and Bedford M.R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. Canadian Journal of Animal Science, 72: 449–466.

Carter C.G. 1998. Fish meal replacement in aquaculture feeds for Atlantic salmon. Fisheries and Research Development Corporation, Canberra, Australia. 130P.

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, 25(1): 37–46.

Carvalho G., Alves T. and Freire D. 2000. l-DOPA production by immobilized tyrosinase. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84: 791–800.

Cetinus S. and Oztop H. 2003. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. Enzyme and Microbial Technology, 32: 889–894.

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, 33(4): 726–731.

Dabrowska H., Grudniewski H. and Dabrowski K. 1979. Artificial diets for common carp: Effect of the addition of enzyme extracts. The Progressive Fish-Culturist, 41(4): 196–200.

Dabrowski K. and Glogowski J. 1977. A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. Aquaculture, 12: 349–360.

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, 171: 181–191.

Denstadli V., Storebakken T., Svihus B. and Skrede A. 2007. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in cold water. Aquaculture, 269: 414–426.

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, 30: 335–339.

Drew M., Racz V., Gauthier R. and Thiessen D. 2005. Effect of adding protease to coextruded flax: Pea or canola: Pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Feed Science and Technology, 119: 117–128.

Erlanger B.F., Kokowski N. and Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archive Biochemistry and Biophysics, 95: 271–278.

Fan C.L., Han X.Y., Xu Z.R., Wang L.J. and Shi L.R. 2009. Effects of beta-glucanase and xylanase supplementation on gastrointestinal digestive enzyme activities of weaned piglets fed a barley-based diet. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 93: 271–276.

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, 38: 1274–1282.

Furne M., Garcia-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*). Comparative Biochemistry and Physiology, 149: 420–425.

Gamze D. and Senay A. 2007. Immobilization of pepsinon chitosan beads. Food Chemistry, 100: 964–971.

Garcia-Ruiz A.I., Garcia-Palomares J., Garcia-Rebollar P., Chamorro S., Carabano R. and De Blas C. 2006. Effect of protein source and enzyme supplementation on ileal protein digestibility and fattening performance in rabbits. Spanish Journal of Agricultural Research, 4: 297–303.

Gavhane Yogeshkumar N., Gurav Atul S. and Yadav Adhikrao V. 2013. Chitosan and its applications: A review of literature. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 4(1): 312–331.

Ghanem A. and Skonberg D. 2002. Effect of preparation method on the capture and release of biologically active molecules in chitosan gel beads. Journal of Applied Polymer Science, 84: 405–413.

Ghazi S., Rooke J. and Galbraith H. 2003. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease

and a-galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. British Poultry Science, 44: 410–418.

Ghazi S., Rooke J., Galbraith H. and Bedford M. 2002. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. British Poultry Science, 43: 70–77.

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, 20: 249–254.

Haberer B., Schulz E. and Flachowsky G. 1997. Effects of b-glucanase and xylanase supplementation in pigs fed a diet rich in nonstarch polysaccharides: Disappearance and disappearance rate of nutrients including the nonstarch polysaccharides in stomach and small intestine. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 78: 95–103.

Hideo K. and Atsuhito H. 1991. Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents. Enzyme and Microbial Technology, 13: 584–588.

Hong L., Haiying W., Changhu X. and Mei Y. 2002. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. Enzyme and Microbial Technology, 31: 588–592.

Hung S.S.O., Lutes P.B. and Storebakken T. 1989. Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub-yearling at different feeding rates. Aquaculture, 80: 147–153.

Ibrahim A., Seema S., Hua Z., Barry A. and Steven H. 2002. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. Biomaterials, 23: 3637–3644.

Jianmin W., Mingming L. and Jiayin Z. 2006. Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. International Journal of Biological Macromolecules, 39: 185–191.

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, 148: 313–122.

Kolkovski S., Tandler A., Kissel G. and Gertler A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation growth survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, *Sparidae linnaeus*) larvae. Fish Physiology and Biochemistry, 12: 203–209.

Kumar M. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers, 46:1–27.

Kumari R., Gupta S., Singh A.R., Ferosekhan S., Kothari D.C., Kumar Pal A. and Jadhao S.B. 2013. Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-like enzyme in fish gastrointestinal tract. Plos One, 8(9): 1–12.

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, 20(3): 1–7.

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, 21(4): 1–10.

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

Lindberg J.C. and Doroshov S.I. 1986. Effect of diet switch between natural and prepared foods on growth and survival of white sturgeon juveniles. Transactions of the American Fisheries Society, 115: 166–171.

Liu L., Su J., Zhang T., Liang X.F. and Luo Y. 2013. Apparent digestibility of nutrients in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diet supplemented with graded levels of neutral phytase using pretreatment and spraying methods. Aquaculture Nutrition, 19: 91–99.

Martino A., Pifferi G. and Spagna G. 1995. Immobilization of β-glucosidase from a commercial preparation. Process Biochemistry, 31: 287–293.

Masumoto T., Tamura B. and Shimeno S. 2001. Effects of phytase on bioavailability of phosphorus in soybean meal-based diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 67: 1075–1080.

Maugle P.D., Deshimaru O., Katayama T., Nagatani T. and Simpson K.L. 1983. Effect of microencapsulated amylase and bovine trypsin dietary supplements on growth and metabolism of shrimp. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 49: 1421–1427.

Miller D.R., Granzin B.C., Elliot R. and Norton B.W. 2007. Effects of an exogenous enzyme, Roxazyme® G2 Liquid, on milk production in pasture fed dairy cows. Animal

Feed Science and Technology, 145: 194–208.

Min-Liang G., Yong-Ming J., Zhong-Liang M. and Yan-Li L. 1996. Hydrolytic characteristics of chitosan-immobilized as neutral proteinase to soybean protein. Food Chemistry, 55: 313–377.

Nie G., Hua X., Wang J., Ming H., Song D. and Zhou H. 2009. The influences of xylanase added in wheat basal diet on intestinal microflora of *Oreochromis niloticus*. Journal of Fisheries of China, 33: 805–812.

Noda T., Furuta S. and Suda I. 2001. Sweet potato β-amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose. Carbohydrate Polymers, 44: 189–195.

O'-Doherty J.V. and Forde S. 1999. The effect of protease and alpha-galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for growing and finishing pigs. Irish Journal of Agricultural and Food Research, 38: 217–226.

Oades P.J., Bush A., Ong P.S. and Brereton R.J. 1994. High-strength pancreatic enzyme supplements and large-bowel stricture in cystic fibrosis. Lancet, 343: 109–110.

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, 254: 466–475.

Oxenboll K., Pontoppidan K. and Fru-Nji F. 2011. Use of a protease in poultry feed offers promising environmental benefits. International Journal of Poultry Science, 10: 842–848.

Patil D. and Singh H. 2014. Effect of papain supplemented diet on growth and survival of post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 1(6): 176–179.

Pifferi P., Bonora V., Spagna G. and Tramontini M. 1993. Immobilization of catalase on macromolecular supports activated with acid dyes. Process Biochemistry, 28: 29–38.

Polgar L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. Cellular and Molecular Life Sciences, 62(19-20): 2161–2172.

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

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, 3: 1–9.

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, 47(5): 1–11.

Stevens J.C., Maguiness K.M., Hollingsworth J., Heilman D.K. and Chong S.K. 1998. Pancreatic enzyme supplementation in cystic fibrosis patients before and after fibrosing colonopathy. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 26: 80–84.

Tacon A.G.J. 1990. Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. Argent Laboratories Press, USA. 454P.

Tzonka G., Katya G., Aneliya G., Olya S. and Nevena M. 2007. Poly (acrylonitrile) chitosan composite membranes for urease immobilization. Journal of Biotechnology, 127: 674–680.

Wang F., Yang Y.H., Han Z.Z., Dong H.W., Yang C.H. and Zou Z.Y. 2009. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture International, 17: 143–157.

Yu B., Wu S., Liu C., Gauthier R. and Chiou P.W. 2007. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. Animal Feed Science and Technology, 134: 283–294.

Yuqing M. and Swee N. 2000. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. Analyst, 125: 1591–1594.

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, 23: 187–92.

Zhang J.J., Li X.Q., Leng X.J., Han Z.Y. and Zhang F.G. 2012. Effects of supplemental protease on growth and intestinal tissue structure in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Dalian Ocean University, 27(6): 534–538.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 7, No. 1, Spring 2019

Research Paper

Utilizing encapsulated protease supplement in the diet and its effects on growth, body composition, some blood biochemical factors and activity of intestinal trypsin of beluga (*Huso huso*)

Ali Khosravanizadeh[1,2], Mohammad Soudagar[3]*, Hasan Salehi[4], Alireza Alishahi[5], Seyed Mahdi Jafari[6]

Received: November 2017 Accepted: February 2018

Abstract

In this study, for enhancing the efficacy of exogenous protease, a chitosan nanoparticles (0.25%) nanoencapsulation-based delivery system was developed. An experiment was conducted for 45 days to evaluate nanoencapsulated protease (NCP) (0.01% and 0.02%) along with 0.25% chitosan nanoparticles against a control diet on growth, hepato-somatic index, body composition, blood biochemical factors and activity of intestinal protease of beluga (*Huso huso*) with mean body weight 10.2±0.3. In different treatments, CF were not significantly different (P>0.05), but WGP, SGR, PER and hepato-somatic index were significantly higher in NCP groups than other groups (P<0.05). The best FCR was in NCP groups and it was significantly lower than other groups (P<0.05). The highest body protein was observed in 0.01% NCP group and it was significantly higher than control group (P<0.05). No difference was observed in blood glucose (G), albumin (A) and A/G ratio (P>0.05). Blood total protein and globulin were significantly higher in NCP groups compared to the control group (P<0.05). Blood BUN was significantly higher in 0.02% NCP group compared to control group (P<0.05). The highest activity of intestinal trypsin was observed in 0.01% NCP group (P<0.05). The result of this study showed that the supplementation of nanoencapsulated trypsin to feeds could improve the growth performance of beluga by increasing activities of digestive enzymes.

Key words: *Growth Factors, Blood Biochemical Factors, Beluga,* Huso huso, *Protease Supplement.*

1- Ph.D. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Fisheries, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- Professor in Departments of Socio-Economics Studies Scientific, Iranian Fisheries Science Research Institute, Tehran, Iran.
5- Associate Professor in Department of Seafood Science and Technology, Faculty of Fisheries and Environmental Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
6- Associate Professor in Department of Food Material and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: sudagar_m@yahoo.com