آنتوژنی فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک (پپسین، تریپسین و کیمو تریپسین) ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) از زمان تخم‌گشایی تا روز ۵۰ پس از تخم‌گشایی

ندا قاسمی[۱]، فرزانه نوری[۲*]، احمد ایمانی[۱]، رسول شهروز[۳]

*f.noori@urmia.ac.ir

۱ -گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران
۲-گروه بیولوژی و تکثیر و پرورش، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری ، دانشگاه ارومیه، ایران
۳- گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

مطالعه حاضر به آنتوژنی فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک (پپسین، تریپسین و کیمو تریپسین) ماهی ازون برون می‌پردازد. نمونه‌هایی از لارو ماهی ازون برون بصورت تصادفی از زمان تخم‌گشایی تا ۵۰ روزگی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین تهیه شد. در لاروهای یک روزه ماهی ازون برون فعالیت پپسینی سنجش شد و فعالیت این آنزیم از روز هشتم پس از تفریخ بویژه همزمان با انتقال از تغذیه درونی به بیرونی یک افزایش ناگهانی داشت (p <۰/۰۵). میزان فعالیت تریپسین یک روز پس از تخم‌گشایی ۰/۰۴ U.mg protein^{-1} بوده و در روز هشتم پس از تخم‌گشایی به حداکثر رسید (p<۰/۰۵) و از روز دهم تا پنجاهم پس از تفریخ فعالیت کاهشی داشت. در کل روند فعالیت تریپسین کاهشی بود (p<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در یک روز پس از تخم‌گشایی تعیین گردید (۰/۰۳ U.mg protein^{-1}، p<۰/۰۵). بعد از آن روند کاهشی داشت. به این معنا که در روزهای ۱۵ و ۳۱ پس از تخم‌گشایی کمی افزایش یافت و مجدد به روند کاهشی خود تا روز پنجاهم ادامه داد (p<۰/۰۵). همبستگی پیرسون نشان داد که ارتباط میان میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین مثبت بود، اما این همبستگی میان آنزیم‌های فوق و پپسین منفی بود (p<۰/۰۵). این یافته نمایانگر افزایش غالبیت پروتئاز اسیدی در گوارش پروتئین نسبت به انواع قلیایی طی بلوغ دستگاه گوارش ماهی ازون برون می‌باشد. نتیجه آن که توسعه معده در گونه‌های ماهی دارای معده فعال به مفهوم شروع هضم اسیدی، پیشی‌گرفتن گوارش خارج سلولی و کارآمدتر شدن استفاده از منابع پروتئین موجود در رژیم/جیره‌های غذایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: دستگاه گوارش، لارو ازون برون، آنزیم‌های پروتئولیتیک، ماهیان خاویاری، *Acipenser stellatus*

*نویسنده مسئول

مقدمه

در دریای خزر ۱۰۰ گونه و زیرگونه مختلف از ماهیان شناسایی شده است. با این وجود بیشترین توجه و دقت همیشه به تاسماهیان معطوف بوده است. از خانواده تاسماهیان دو جنس *Huso* با یک گونه به نام فیل ماهی (بلوگا) و جنس *Acipenser* با ۵ گونه (۴ گونه دریایی و یک گونه رودخانه‌ای) در این بوم‌سازگان آبی وجود دارند (شریعتی، ۱۳۷۸). ماهیان خاویاری بدلیل ارزش اقتصادی و غذایی خاویار آنها یکی از مهمترین گروه ماهیان محسوب می‌شوند. کاهش میزان صید از منابع آبی موجب افزایش تلاش جهت توسعه صنعت پرورش ماهیان خاویاری در سرتاسر جهان و بویژه ایران شده است و انتظار می‌رود توجه مسئولان و سرمایه گذاران بخش خصوصی بیش از پیش به صنعت تکثیر و پرورش مصنوعی این آبزیان ارزشمند معطوف گردد (نصری چاری و همکاران، ۱۳۷۲). البته، توسعه صنعت آبزی‌پروری و پرورش گونه‌های مختلف ماهی و سخت پوستان بی‌شک در گرو دستیابی به فناوری‌های تولید غذای مناسب حاصل شده است (Sorgeloos and Leger, 1992).

آگاهی در مورد تمایز دستگاه گوارش و غده‌های ضمیمه در طول مراحل تکاملی لاروی برای پی بردن به مکانیسم گوارش و فیزیولوژی جذب مواد غذایی و همزمان‌سازی مراحل فیزیولوژیکی تکامل با شیوه‌های تغذیه ای و پروتکل های پرورشی امری ضروری می‌باشد (Furne *et al*., 2001). بنابراین یکی از مشخصه‌های اصلی پایان مرحله لاروی، تکمیل و کارآمد شدن دستگاه گوارش می‌باشد. در نتیجه از مراحل تکاملی ماهیان سبب فائق آمدن بر برخی مشکلات تفریخ گاه‌های ماهیان و جایگزینی غذای زنده با جیره های مصنوعی می شود (Cahu *et al*., 1998). البته آنتوژنی دستگاه گوارش لارو ماهیان در طول ۲۵ سال گذشته مورد مطالعه قرار گرفته و بررسی‌های انجام شده بیشتر در ارتباط با آزاد ماهیان و ماهیان دریایی بوده است. اکثر مطالعات انجام شده روی آنتوژنی و تغییرات مورفوآناتومیکی و بافت شناسی دستگاه گوارشی لارو ماهیان با تجهیزات میکروسکوپی و سنجش فعالیت آنزیم‌های گوناگون گوارشی_ترشحی از لوزالمعده، معده و روده بوسیله خاصیت بیوشیمیایی متمرکز شده‌اند. البته به تازگی با استفاده از فنون زیست شناسی-مولکولی به بررسی داخلی اجزاء دستگاه گوارشی، بیان ژن‌ها در تکامل لارو ماهیان و کارایی دستگاه گوارش در طول مرحله آنتوژنی اولیه پرداخته شده است (Holt, 2011). بدین ترتیب، مطالعه دستگاه گوارش لارو ماهیان به دلیل حساسیت بالا نسبت به تغذیه و فراهم آوردن انرژی مورد نیاز برای نگهداری، شنا، رشد و به منظور حفظ بقاء و انتقال به مرحله جوانی باید با دقت بیشتری صورت پذیرد (Holt, 2011).

همانند اکثر گونه‌های ماهیان، دستگاه گوارش لارو ماهیان خاویاری نیز در مرحله تخم‌گشایی تکامل یافته نیست و باید قبل از شروع تغذیه خارجی، دستخوش تغییراتی به منظور کسب آمادگی جهت هضم و جذب غذا گردد (Buddington, 1991). لاروها پس از تخم‌گشایی از نظر تغذیه ای وابسته به کیسه زرده هستند و با اتمام آن، باید برای تامین انرژی و رشد، تغذیه خارجی را شروع کنند (Gisbert *et al*., 1998). لوله گوارش ماهیان خاویاری، هنگام شروع تغذیه خارجی نسبتا تکامل یافته است و مشابه ماهیان جوان و بالغ می باشد (Dettlaff *et al*., 2012; Gawlicka *et al*., 1995). برخلاف ماهیان استخوانی، ماهیان خاویاری تکوین هولوبلاستیک دارند و در آنها کیسه زرده مستقیماً در تشکیل سیستم گوارش ماهی شرکت می‌کند (Gawlicka *et al*., 1995). در مطالعه آنتوژنی دستگاه گوارش ماهی قره برون، مشخص شد که لوله گوارش ماهیان در ابتدا دارای ساختار ساده و مملوء از زرده بود. معده، در روز هفتم پس از تخم‌گشائی، شامل دو بخش غده ای و غیر غده ای، شکل گرفت (خیاط زاده و همکاران، ۱۳۸۸). در فیل‌ماهی سه روز پس از تفریخ در دیواره لوله گوارش شیاری مورب در قسمت پشتی- خلفی کیسه زرده ایجاد شده و لوله گوارش به دو ناحیه معده و روده میانی تقسیم گردید و همزمان دریچه‌های اسپیرال تمایز یافتند (جرجانی و همکاران، ۱۳۹۱). در بررسی دستگاه گوارش لارو فیل‌ماهی مشخص شد که در زمان شروع تغذیه خارجی دارای غدد معدی فعال بود و برخلاف فعالیت پپسین، آنزیم‌های تریپسین و

کیموتریپسین پس از جذب زرده کاهش یافت، که نشان از اهمیت این آنزیم‌ها در مراحل جذب زرده می‌باشد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز طی روزهای هفتم تا چهاردهم نشان از تکامل روده در زمان آغاز تغذیه خارجی لارو فیل ماهی می‌باشد (Asgari *et al*., 2013). روند شکل‌گیری، تکامل و عملکرد دستگاه گوارش لارو ماهی خاویاری سفید (*Acipenser transmontanus*) با شروع تغذیه خارجی پیشرفت قابل ملاحظه‌ای داشت. همچنین با شروع تغذیه فعال افزایش ظرفیت گوارشی رخ داد. دو روز پس از تغذیه خارجی در غشاء نوار مسواکی روده فعالیت آلکالین فسفاتاز، آمینوترانسفراز M، دی پپتیدیل پپتیداز IV و فعالیت گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز افزایش یافت، که نشان دهنده اهمیت این بخش از روده برای هضم پروتئین و جذب مواد غذایی است. پیشرفت عملکرد قسمت پیلوریک روده در روز چهارم اتفاق افتاد که با افزایش فعالیت غشاء نوار مسواکی و آنزیم‌های سیتوپلاسمی مانند استیل کولین استراز، دی پپتیداز II، β- گالاکتو پپتیداز همزمان بود. فعالیت ضعیف اگزوپپتیدازها و آلکالین فسفاتاز در روده قدامی نشان داد که این بخش از روده ممکن است نسبت به قسمت پیلوریک روده مارپیچ در جذب مواد مغذی اهمیت کمتری داشته باشد. تفاوت کمی و کیفی مشاهده شده در فعالیت آنزیمی بخش‌های مختلف روده، حاکی از درجه بالایی از تخصص یافتگی هر بخش برای گوارش و جذب مواد مغذی بود (Gawlicka *et al*., 1995).

تغییر اساسی در تکامل ساختار گوارشی در طول مرحله اول زندگی ماهیان به وسیله تکمیل ترشح آنزیم های گوارشی مختلف و سطوح فعالیت شان اتفاق می افتد و تمایز سیستم هضمی (کانال ابتدایی و اندام‌های وابسته) در طول دوره تغذیه درونی رخ می دهد. مطالعات زیادی در خصوص بررسی تکامل دستگاه گوارش و آنزیم های هضمی لارو ماهیان دریایی منتشر شده است (Ribeiro *et al*., 1999; Gisbert *et al*., 2004). ولی مطالعات محدودی در رابطه با فعالیت آنزیم های گوارشی در لارو ماهیان آب شیرین وجود دارد. اکثر ماهیان استخوانی در طول مراحل لاروی فاقد معده هستند و گوارش غذا در لاروها عمدتا توسط آنزیم های پروتئاز قلیایی از جمله تریپسین انجام می شود (Hjelmeland and Jorgensen 1985). در طول تغذیه درونی فعالیت آنزیم پروتئاز لوزالمعده اگر چه پایین است، ولی در برخی گونه‌های ماهیان آب شیرین مشاهده شده است (Chong *et al*., 2002).

بنابر ضرورت بررسی مربوط به چگونگی تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی طی مراحل اولیه زندگی، مطالعه حال حاضر به بررسی روند تکاملی دستگاه گوارش از نظر فعالیت‌های آنزیمی در مراحل اولیه رشد ماهی ازون برون (لارو و بچه ماهی) پرداخته است. از این طریق زمان تغییر ساختارهای گوارشی از تغذیه داخلی به تغذیه خارجی مشخص می‌گردد و می‌توان از آن به عنوان معیاری جهت ارزیابی مدیریت تغذیه‌ای کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری سود جست.

مواد و روش کار

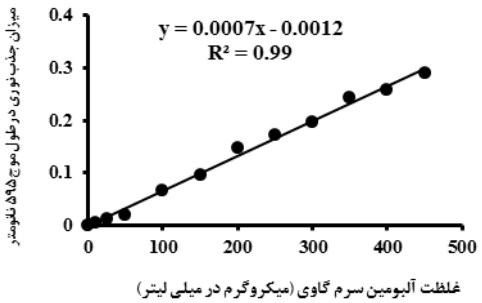
نمونه برداری از لاروها و بچه ماهیان

لاروها از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی (رشت) تهیه شدند. نمونه‌برداری جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پپسین، تریپسین و کیموتریسین) بصورت کاملا تصادفی و در روز های ۱، ۴، ۸، ۱۰، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۹، ۳۱، ۳۴، ۳۷، ۴۰، ۴۳، ۴۷ و۵۰ پس از تخم‌گشایی انجام شد. ماهیان با استفاده غلظت بالای پودر گل میخک کشته و به کمک ازت مایع منجمد (Snap freeze) شدند. در نهایت برای نگهداری بلند مدت به فریز ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند. در هر مرحله تقریبا ۱۵-۱۰ قطعه لارو بصورت تصادفی به کمک ساچوک صید شد.

بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی

جهت تهیه عصاره آنزیمی، نمونه‌ها به آزمایشگاه بیوشیمی گروه آبزی‌پروری پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه منتقل شده و به نسبت وزنی ۱:۵ در محلول اسید کلریدریک ۱ میلی مولار، توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT1300Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه همگن

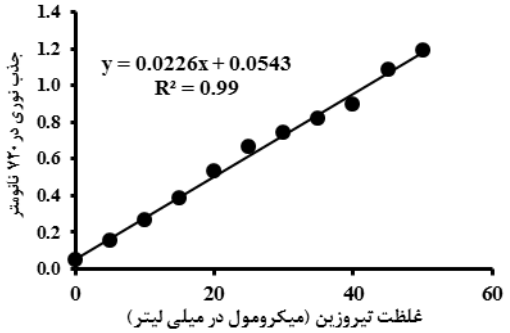
گردیدند (Rungraungsak – Torrrissen, 2007) و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (مدل Z36HK) در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول رویی، جهت سنجش پروتئین محلول و فعالیت آنزیمی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Lemieux *et al*., 1999). پروتئین محلول در عصاره آنزیمی به روش Bradford (1976) سنجیده شد. به طور خلاصه، از آلبومین سرم گاوی، Bovine serum Albumin (BSA) به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. جهت سنجش پروتئین محلول ابتدا منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف BSA (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰µg/ml) تهیه شد (شکل۱). میزان جذب نوری استاندارد و همچنین نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.



شکل ۱: منحنی استاندار BSA. محور X: غلظت پروتئین BSA ($\mu g\ ml^{-1}$)، محور Y: جذب نوری

Figure 1: BSA standard curve. X: BSA protein (µg mg^{-1}) and Y: Optical Density.

فعالیت آنزیم پپسین با استفاده از روش Rungruangsak and Utne (1981) سنجش شد. به طور خلاصه، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲۰۰ میکرولیتر کازئین ۱ درصد (در HCl ۶۰ میلی مولار) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. واکنش با اضافه کردن یک میلی لیتر Trichloroacetic acid (TCA) پنج درصد متوقف شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در ادامه محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و با یک میلی لیتر NaOH ۰/۵ مولار و ۰/۳میلی لیتر معرف Folin-Ciocalteu مخلوط و در نهایت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۲ میزان جذب نوری در طول موج ۷۲۰ نانومتر قرائت و با منحنی استاندارد تیروزین (شکل ۲) مقایسه شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پپسین به صورت میکرومول تیروزین/ ساعت/ میلی گرم پروتئین بیان شد.



شکل ۲: منحنی استاندارد تیروزین. محور X: غلظت تیروزین ($\mu mole.ml^{-1}$)، محور Y: جذب نوری

Figure 2: Tyrosin standard curve. X: Tyrosin ($\mu mole.ml^{-1}$) and Y: Optical Density.

فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از محلول ۱ میلی مولار benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) به عنوان سوبسترا سنجش شد (Erlanger *et al*., 1961). در ابتدا میزان ۴۳/۵ میلی گرم BAPNA در یک میلی لیتر Dimethylsulphoxide (DMSO) حل شد و با محلول بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار(pH=۷/۵) حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. درادامه، ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱/۲۵ میلی لیتر محلول سوبسترابه مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شده و سپس واکنش با اضافه نمودن ۱ میلی لیتر اسید استیک ۳۰٪ متوقف و میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت آنزیمی به کمک رابطه ذیل محاسبه شد.

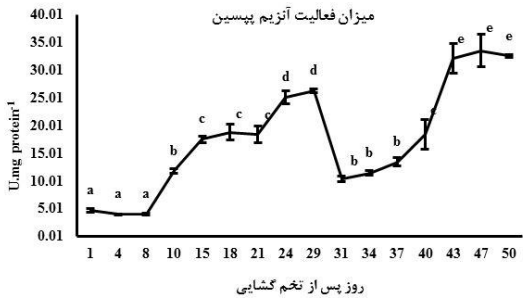
$$\text{فعالیت اختصاصی آنزیم } (\text{U. mg protein}^{-1}) = \frac{\text{میلی‌لیتر مخلوط واکنش} \times ۱۰۰۰ \times \text{میزان جذب نوری در طول موج } ۴۱۰ \text{ nm}}{\text{میلی‌گرم پروتئین در مخلوط واکنش} \times ۸۸۰۰}$$

میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین با استفاده از محلول ۰/۱ میلی مولار Succinyl-$(Ala)_2$-Pro-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA) در ۰/۱ محلول بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار (بعنوان سوبسترا) سنجش شد (Erlanger *et al*., 1961). مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۰/۵۹ میلی لیتر محلول سوبسترا و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه انکوباسیون شد و بلافاصله میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت و میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین با استفاده از رابطه مذکور جهت محاسبه میزان آنزیم تریپسین، محاسبه شد.

داده‌های حاصل از سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو ماهیان با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفت. البته پیش از انجام آنالیزها، نرمال بودن داده ها و یکنواختی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولموگروف-اسمیروف و لون بررسی شد. همچنین از آزمون میانگین توکی برای بررسی تفاوت‌های معنی‌دار میان روزهای نمونه برداری استفاده شد. تمام آنالیزها در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ صورت پذیرفت و سطح خطای نوع اول در آزمون ها ۰/۰۵ انتخاب شد. نتایج حاصل به صورت Mean±SE ارائه شدند. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل (نسخه ۲۰۱۰)، استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی در روزهای مختلف نمونه برداری تفاوت معنی داری با یکدیگر داشتند. آنزیم پپسین تا ۸ روز پس از تخم‌گشایی (dph) تغییر فعالیتی نداشت. بعد از آن فعالیت این آنزیم تا ۲۹ روز پس از تخم‌گشایی از روند افزایشی برخوردار بود و در ۳۱ روز پس از تخم‌گشایی کاهش و مجدد افزایش داشت. بیشترین فعالیت این آنزیم در روزهای ۴۳- ۴۷ و۵۰ روز پس از تخم‌گشایی بود ($p<۰/۰۵$، شکل ۳).



شکل ۳: روند تغییرات فعالیت آنزیم پپسین ماهی ازون برون در روزهای مختلف نمونه برداری تا ۵۰ روز پس از تخم گشایی. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵ درصد هستند.

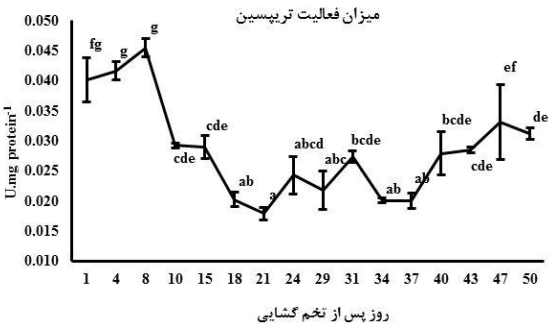
Figure 3: The changes in pepsin enzyme activity in *A. stellatus* during different days of experiment until 50 days post hatch. Values with different superscript letter indicate significant difference (p >0.05).

در ۱ روز پس از تخم‌گشایی میزان فعالیت آنزیم تریپسین $U.mg\ protein^{-1}$ ۰/۰۴ بود و میزان فعالیت آن تا ۸ روز پس از تخم‌گشایی روندی افزایشی داشت و به حداکثر میزان فعالیت خود رسید. پس از آن از ۱۰ روز پس از تخم‌گشایی تا ۵۰ روزگی فعالیت کاهشی داشت. البته در ۳۱ روز پس از تخم‌گشایی و ۴۷ روز پس از تخم‌گشایی میزان فعالیت آن تا حدی افزایش نشان داد، ولی مجددا کاهش یافت. در کل روند فعالیت تریپسین یک فرایند کاهشی بود ($p<۰/۰۵$، شکل ۴).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در همان ابتدا یعنی روز نخست پس از تخم‌گشایی، $U.mg\ protein^{-1}$ ۰/۰۳، بود.بعد از آن از یک روند کاهشی همراه با نوسان برخوردار بود، به این معنا که در ۱۵روز پس از تخم‌گشایی و همچنین ۳۱ روز پس از تخم‌گشایی میزان فعالیت آن کمی افزایش یافت و مجدد به روند کاهشی خود تا ۵۰ روز پس از تخم‌گشایی ادامه داد ($p<۰/۰۵$، شکل ۵).

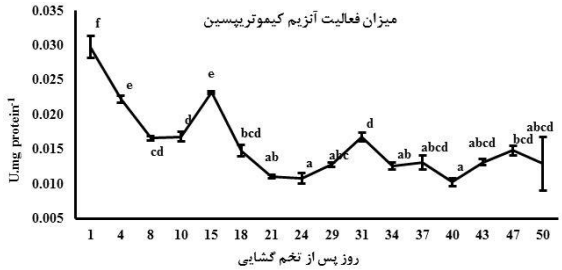
در بررسی همبستگی میزان فعالیت مختلف گوارشی طی مدت زمان نمونه برداری مشخص گردید که فعالیت آنزیم

تریپسین با فعالیت آنزیم کیموتریپسین دارای همبستگی مثبت معنی دار (۰/۵۴۶، p=۰/۰۰) و فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین با فعالیت آنزیم پپسین دارای همبستگی معنی دار منفی (بترتیب ۰/۲۷۴-، p=۰/۰۲۸ و ۰/۴۹۸-، p=۰/۰۰) بود (جدول ۱).



شکل ۴: روند تغییرات فعالیت آنزیم تریپسین ماهی ازون برون در روزهای مختلف نمونه برداری تا ۵۰ روز پس از تخم گشایی. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دا در سطح ۵ درصد هستند.

Figure 4: The changes in trypsin enzyme activity in *A. stellatus* during different days of experiment until 50 days post hatch. Values with different superscript letter indicate significant difference (p >0.05).



شکل ۵: روند تغییرات فعالیت آنزیم کیموتریپسین ماهی ازون برون در روزهای مختلف نمونه برداری تا ۵۰ روز پس از تخم گشایی. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دا در سطح ۵ درصد هستند.

Figure 5: The changes in chymotrypsin enzyme activity in *A. stellatus* during different days of experiment until 50 days post hatch. Values with different superscript letter indicate significant deference (p >0.05).

جدول ۱: همبستگی پیرسون فعالیت آنزیم‌های مختلف گوارشی ماهی ازون برون از زمان تخم گشایی تا ۵۰ روز پس از گشایی

Table 1: Pearson correlation of different digestive enzymes activity in *A. stellatus* from hatching day to 50 days post hatch

		کیموتریپسین	پپسین
تریپسین	ضریب پیرسون	۰/۵۴۶**	-۰/۲۷۴*
	p-value (دو دامنه)	۰/۰۰۰	۰/۰۲۸
	تعداد	۶۴	۶۴
کیموتریپسین	ضریب پیرسون		-۰/۴۹۸**
	p-value (دو دامنه)		۰/۰۰۰
	تعداد		۶۴

** معنی داری در سطح یک درصد، * معنی داری در سطح پنج درصد
** Significancy at 0.01 and * Significancy at 0.05

بحث

فعالیت آنزیم‌های گوارشی بخش مهمی در تحریک و شروع فرآیندهای مرتبط با رشد موجودات زنده محسوب می‌شوند (زمانی و همکاران، ۱۳۸۶; ایمانی و همکاران، ۱۳۸۸). بر کسی پوشیده نیست که توانایی رشد و تکامل لارو نه تنها بر کمیت و کیفیت غذای مورد استفاده وابسته است، بلکه تابع وضعیت عملکردی دستگاه گوارش آن نیز می‌باشد. چه بسا که بلوغ دستگاه گوارش از نظر عملکردی سرانجام در ظرفیت گوارشی حیوان اثر می‌گذارد (Wold *et al.*, 2007). بررسی تغییرات آنتوژنیک فعالیت آنزیم‌های گوارشی برای درک بهتر توانایی‌های تغذیه‌ای لاروهای جوان (Diaz *et al.*, 1997) و بهینه سازی پروتکل‌های تغذیه‌ای و پرورشی (Lazo *et al.*,2011; Cahu and Zambonino-Infante, 1997) و همگام سازی وضعیت فیزیولوژی لارو از نظر ظرفیت گوارش با پروتکل تغذیه و فرآیند شروع تغذیه خارجی اهمیت بسزایی دارد (Noori *et al.*, 2012; Asgari *et al.*, 2013).

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تریپسین و کیموتریپسین در زمان تخم‌گشایی بچه ماهی ازون برون

(*A. stellatuus*) قابل مشاهده بود، این یافته می‌تواند به این مفهوم باشد که در حقیقت کنترل فرآیند تولید آنزیم-ها توسط مکانیسم‌های ژنتیکی صورت می‌گیرد (Buddington and Diamond, 1989) و متاثر از عوامل تغذیه‌ای بیرونی نیست (Cahu and Infante, 1994; Lazo *et al*., 2000). طی مراحل لاروی، هضم پروتئین عمدتا به وسیله پروتئازهای قلیایی مانند تریپسین و کیموتریپسین به همراه پروتئازهای سیتوزولی روده انجام می‌شود (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). این دو پروتئاز قلیایی (تریپسین و کیموتریپسین) در ماهیان خاویاری (Asgari *et al*., 2013) و ماهیان استخوانی دریایی و آب شیرین در زمان تخم‌گشایی شناسایی شدند (Darias *et al*., 2007; Pradhan *et al*., 2013; Uscanga-Martínez *et al*., 2011). در ماهی *Coregonus polan* در زمان شروع تغذیه فعال میزان فعالیت آنزیم پپسین بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (Dabrowski, 1982). در تاسماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fulvescens*) نیز از ۱۸-۱۴ روز بعد از تخم گشایی و همزمان با تغییر در شیوه تغذیه آبزی فعالیت آنزیم‌های پپسین، آلفا آمیلاز و لیپاز افزایش یافت (Buddington, 1985). در ماهی *Diplodus sargus* نیز با شروع غذادهی در ۵ روزگی فعالیت آنزیم‌های پپسین، پروتئاز قلیایی، آلفا آمیلاز، لیپاز و فسفاتاز قلیایی دچار تغییر قابل ملاحظه‌ای شدند (Cara *et al*.,2003). در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) نیز در زمان شروع تغذیه خارجی فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین افزایش یافت (Lauff and Hufer, 1984). در ماهی *Scophthamus maximus* نیز با شروع غذادهی در ۳روزگی فعالیت آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین و فسفاتاز قلیایی افزایش نشان داد (Cousin *et al*., 1987). در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) با شروع مصرف غذای خارجی فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین و لیپاز افزایش یافت (Gisbert *et al*., 1999). در ماهی *Solea solea* در زمان شروع تغذیه خارجی فعالیت آنزیم آمیلاز افزایش داشت (Cousin *et al*., 1987). در ماهی *Sparus aurata* نیز در زمان غذادهی افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی مشاهده شد (Sarasquete *et al*.,1993).

قبل از جذب زرده، آنزیم تریپسین از بیشترین میزان فعالیت برخوردار است (Galaviz *et al*., 2011). در این مطالعه نیز از اولین روز تفریخ تا ۸ روزگی فعالیت تریپسین مشاهده شد که در ۸ روزگی بیشترین فعالیت را داشت و بعد از آن در ۱۰ روزگی همزمان با اتمام کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی از یک روند کاهشی برخوردار بود. چنین روند فعالیتی در *Huso huso* (Asgari *et al*., 2013) و *Acipenser persicus* (Babaei *et al*., 2011) نیز گزارش داده شد ولی در لارو کفشک ماهی سنگالی(*Soleo senegalensis*) (Ribeiro *et al*., 1999)، شاه ماهی دم زرد (*Seriola lalandi*) (Chen *et al*.,2006)، *Atractoscion nobilis* (Galaviz *et al*.,2011) و *Pagrus pagrus* (Suzer *et al*., 2007) نتایج متفاوتی از فعالیت آنزیم تریپسین گزارش داده شد، به شکلی که ازیک روند افزایشی با شیب نسبتاً تند برخوردار بود. دستگاه گوارش گونه‌های مختلف ماهیان از نظر ریخت شناسی و عملکردی از تنوع زیادی برخوردار است. این امر به دلیل تنوع رده‌بندی آنها، عادات غذایی مختلف و همچنین اندازه و شکل بدنی خاص هر یک از گونه ها می باشد (Abdulhadi, 2005). به علاوه تنوع سلول‌های ترشحی در لوله گوارشی ممکن است مربوط به تغییرات شرایط محیطی و تغذیه‌ای باشد که به نوبه خود سبب تغییرات عملکردی دستگاه گوارش می‌گردد (Domeneghini *et al*., 1999). فعالیت کیموتریپسین نیز یک روند کاهشی را نشان داد و در ابتدای تفریخ در بالاترین میزان فعالیت خود بود. روند مشابهی در لارو *A. persicus* (Babaei *et al*., 2011) گزارش شده است. روند فعالیت این آنزیم با نتایج گزارش شده برای فیل‌ماهی متفاوت بود (Asgari *et al*., 2013). همچنین در ابتدای تفریخ در ماهی *Atractoscion nobilis* فعالیت ضعیف کیموتریپسین مشاهده شد، اما بیشینه فعالیت آن در ۱۸ روزگی گزارش شد (Galaviz *et al*.,2011).

آنزیم پپسین یک آنزیم معدی است که توسط این اندام ترشح می‌شود و بررسی‌ها در ماهیان مختلف از

جمله *Diplodus sargus* نشان داد که با رشد لارو و تکامل بیشتر دستگاه گوارش، میزان فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد (Cara *et al*.,2003). این شکل از بروز فعالیت آنزیم پپسین در دیگر ماهیان خاویاری از جمله لارو *H. huso*، *A. transmontanus*، *A. fulvescens* و *A. gueldenstaedti* نیز مشاهده شده است (Kopylenko *et al*.,1984; Asgari *et al*., 2013). در مطالعه حاضر نیز افزایش فعالیت آنزیم پپسین در ماهی ازون برون ۱۰ روز پس از تفریخ و همزمان با اتمام کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی قابل مشاهده بود و روند افزایشی را در پیش گرفت. افزایش فعالیت پپسین با کاهش ناگهانی فعالیت تریپسین و کیموتریپسین بعد از اتمام کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی همبستگی منفی داشت. چنین روندی در *A. persicus* با یک حرکت آهسته پیش رونده انتقال فعالیت نسبی از پروتئازهای قلیایی (تریپسین و کیموتریپسین) به اسیدی (پپسین) در طول رشد و توسعه لارو همزمان با شروع تغذیه خارجی در ۹ روزگی مشاهده شد (Babaei *et al*., 2011)، که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت. می توان چنین نتیجه-گیری کرد که توسعه معده در ماهیان خاویاری و همچنین سایر گونه‌های ماهی دارای معده فعال به مفهوم شروع هضم اسیدی، تقویت گوارش خارج سلولی و کارآمدتر شدن استفاده از منابع پروتئین موجود در رژیم/جیره‌های غذایی می‌باشد.

منابع

ایمانی، ا.، یزدان پرست، ر.، فرهنگی، م.، بختیاری، م.، مجازی امیری، ب و سلجوقی، ظ.ش.، ۱۳۸۸. بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در طی دوره محرومیت غذایی و غذادهی مجدد. مجله علوم و فنون دریایی، ۸(۳ و ۴): ۲۸.

جرجانی، س.، حاجی مرادلو، ع.، قلیچی، ا.، مخدومی، ن،م.، کاظمی، ر.، ۱۳۹۱. ساختار میکروسکوپی روده فیل ماهی (*Huso huso*). از مرحله تفریخ تا زمان رهاسازی به دریا. مجله علوم و فنون دریایی، ۱۱(۲): ۴۵-۳۶.

خیاط زاده، ج.، خوش نگاه، ث .، فاطمی، ف .، سعادت فر، ز و شاهسونی ،د.، ۱۳۸۸. بررسی هیستولوژیک و هیستوشیمیایی لوله گوارش (روده و معده) ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) در بازه زمانی ۲ هفته پس از تخم گشایی (Hatching). مجله زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار , دوره ۴، شماره ۱: ۳۱- ۲۱.

زمانی، ع.، حاجی مرادلو، ع.، مدنی، ر.، فرهنگی، م.، ویلکی، ا.س.، ۱۳۸۶. اندازه گیری و مقایسه سطح فعالیت برخی آنزیمهای گوارشی در لارو ماهی آزاد دریای خزر و ماهی قزل آلای رنگین کمان در مرحله شروع تغذیه خارجی. مجله علمی شیلات ایران، ۱۶(۳): ۸۰-۷۳.

شریعتی، ا.، ۱۳۷۸.ماهیان دریای خزر و حوضه آبریز آن (ترجمه) کازانچف، صفحه ۳۳۰.

نصری چاری، ع.، ۱۳۷۲. بررسی مقایسه‌ای پارامترهای مرفوبیولوژیک پالباش و قره‌برون سواحا جنوبی دریای خزر در جهت نظریه استقلال قره‌برون به عنوان گونه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، ۱۳۱ صفحه.

Abdulhadi, H.A., 2005. Some Comparative Histological Studies on Alimentary Tract of Tilapia Fish (*Tilapia Spilurus*) And Sea Bream (*Mylio cuvieri*). Egyptian Journal of Aquatic Research, 31: 387-397.

Asgari, R., Rafiee, G., Eagderi, S., Noori, F., Agh, N., Poorbagher, H. and Gisbert, E., 2013. Ontogeny of the digestive enzyme activities in hatchery produced Beluga (*Huso huso*). Aquaculture, 416:33-40. DOI: 10.1111/anu.12113.

Babaei, S.S., Kenari, A.A., Nazari, R. and Gisbert, E., 2011. Developmental Changes of Digestive Enzymes in Persian Sturgeon

(*Acipenser Persicus*) During Larval Ontogeny. Aquaculture, 318(1):138-144. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.04.032.

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(1-2): 248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Buddington, R.K., 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, Acipenser fulvescens, during early development. Journal of Fish Biology, 26(6):715-723. DOI:10.1111/j.1095-8649.1985.tb04311.x

Buddington, R.K. and Diamond, J.M., 1989. Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. Annual Review of Physiology, 51(1):601-617. DOI:10.1146/annurev.ph.51.030189.003125

Buddington, R.K., 1991. Ontogenic development of sturgeons: selected physiological examples, In: Williot, P. (Ed.), Proc. of the First Int. Symp. on the Sturgeon. CEMAGREF, Bordeaux, pp. 53-63.

Cahu, C.L. and Infante, J.Z., 1994. Early weaning of sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 109(2):213-222. DOI: 10.4194/1303-2712-v11_3_22.

Cahu, C.L. and Zambonino Infante, J.L., 1997. Is the digestive capacity of fish larvae sufficient for compound diet feeding? Aquaculture International. 5:151-160. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00699-8.

Cahu, C., **Infante, J.Z., Escaffre, A.M., Bergot, P. and Kaushik, S., 1998.** Preliminary results on sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae rearing with compound diet from Feeding. Comparison with carp (Cyprinus carpio) larvae. Aquaculture, 169(1): 1-7. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)003160

Cara, J.B., Moyano, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C. and Yúfera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. Journal of Fish Biology, 63(1):48-58. DOI:10.1046/j.1095-8649.2003.00120.x

Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. and Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture, 260(1): 264-271. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.06.021

Chong, A. S. C., Hashim, R., Lee, C. Y. and Ali, B. A., 2002. Partial characterization and activities of proteases form the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture 203:321-333. DOI:10.3390/fishes2010004.

Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F. and Gabaudan, J., 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. Journal of Fish Biology, 30(1):15-33. DOI:10.1111/j.1095-8649.1987.tb05728.x.

Dabrowski, K., 1983. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. Environmental Biology of Fishes, 7(1): 73-76. DOI:10.1007/BF00011827.

Darias, M.J., Murray, H.M., Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yúfera, M. and Martínez-Rodríguez, G., 2007. Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. Aquaculture, 270(1):369-378. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.04.045.

Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S. and Schmalhausen, O.I., 2012. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Springer Science and Business Media.

Diaz, M., **Moyano, F.J., Garc|a-Carreno L.F., Alarcon, F.J. and Sarasquete, M.C., 1997**. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. Aquaculture International 5, 461-471. DOI.10.1023/A:1018340929705.

Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G. and Mascarello, F., 1999. Morphological and histochemical peculiarities of the gut in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. European Journal of Histochemistry, 43(2):135-145. DOI:10.1046/j.1439-0426.2002.00384.x.

Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 95:271–278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.

Furne´ M., Hidalgo M.C., Lopez A., Garcia-Gallego M., Morales A.E. and Kolkovski, S. 2001. Digestive Enzymes in Fish Larvae and Juveniles, Implications and Applications to Formulated Diets. Aquaculture. 200:181– 201. DOI.101016/S0044-8486(01)00700-1.

Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A. and López, L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. Aquaculture, 318(1):162-168. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011. 05.014

Gawlicka, A., Teh, S.J., Hung, S.S.O., Hinton, D.E. and De La Noüe, J., 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. Fish Physiology and Biochemistry, 14(5): 357-371.

Gisbert, E., Rodriguez, A., Castelló-Orvay, F. and Williot, P., 1998. A Histological Study of the Development of the Digestive Tract of Siberian Sturgeon (*Acipenser Baeri*) During Early Ontogeny. Aquaculture, 167(3-4):195-209. **DOI**: 10.1016/S0044-8486(98)00312-3

Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P. and Castelló-Orvay, F., 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. Journal of Fish Biology, 55(3):596-616. DOI:10.1111/j.1095-8649.1999.tb00702.x

Gisbert, E., R.H. Piedrahita and Conklin, D.E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture, 232:455-470. DOI:10.1016/S0044-8486(03)00457-5.

Hjelmeland, K. and Jorgensen, T. 1985. Evalution of radioimmunoassay as a method to quantify of maturing Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.). Journal of Food Biochemistry, 31:726–747.

Holt, G.J., 2011. Larval Fish Nutrition. John Wiley and Sons. DOI:10.1002/9780470959862.

Kopylenko, L.R., Mitskevich, L.G., Vaitman, G.A. and Mosolov, V.V., 1984. Proteinases in the spawn of sturgeon. Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia, 20:373-377.

Lauff, M. and Hofer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture, 37(4):335-346. DOI:10.1016/0044-8486(84)90298-9

Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, c., Arnold, C.R., 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Scianops ocellatus*). Aquaculture 188:339-351. DOI:10.1016/S0044-8486(00)00339-2.

Lazo, J.P., Darias, M.J. and Gisbert, E., 2011. Ontogeny of the digestive tract. Larval Fish Nutrition, pp.3-46. DOI:10.1002/9780470959862.ch1.

Lemieux, H., Blier, P. and 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. DOI: 10.1023/A:1007791019523.

Noori, F., Van sttapen, G. and Sorgeloos, P., 2012. Preliminary study on the activity of protease enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) larvae in response to different diets: effects on growth and survival. Aquaculture Research 43(2):198-207. DOI:10.1111/j.1365-2109.2011.02816.x

Pradhan, P.K., Jena, J., Mitra, G., Sood, N. and Gisbert, E., 2013. Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish Ompok bimaculatus (Bloch) larvae. Aquaculture, 372:62-69. DOI:10.1016/j.aquaculture.2012.10.024.

Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. and Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of Solea senegalensis, Kaup 1858. Aquaculture, 179(1):465-473. DOI:10.1016/S0044-8486(99)00180-5.

Rungruangsak, K. and Utne, F., 1981. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture 22:67–79 DOI:10.1016/0044-8486(81)90134-4.

Rungraungsak- Torrissen, K., 2007. Digestive efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon

(*Salmo salar* L.) fed with krill meal as an alternative protein source. Journal of Food Biochemistry, 31:509-540. DOI:10.1111/j.1745-4514.2007.00127.x

Sarasquete, M.C., Polo, A. and De Canales, M.G., 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. The Histochemical Journal, 25(6):430-437.

Sorgeloos, P. and Leger. P., 1992. Improved larviculturc outputs of marine fish; shrimp and prawn. Journal of the World Aquaculture Society. 23:251-264. DOI:10.1111/j.1749-7345.1992.tb00788.x

Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, Ş., Fırat, K. and Alpbaz, A. 2007. Digestive enzyme activities in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, 148: 470–477. DOI:10.1016/j.cbpa.2007.06.418.

Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Alvarez-González, C.A., Moyano, F.J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G.E., Márquez-Couturier, G., Contreras-Sánchez, W.M., Arias-Rodríguez, L. and Indy, J.R., 2011. Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook Petenia splendida. Fish physiology and biochemistry, 37(3):667-680. DOI:10.1007/s10695-011-9467-2.

Wold, P-A., Hoehne-Reitan, K., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L, Rainuzzo, J. and Kjørsvik, E., 2007. Phospholipids vs. neutral lipids: Effects on digestive enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. Aquaculture, 272:502-513. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.06.034.

Zambonino-Infante, J. and Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 130(4):477-487. DOI:10.1016/S1532-0456(01)00274-5.