

اثر تجویز خوراکی عصاره زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی پارامترهای بیوشیمیایی میگوی پاشفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

ناصر شهرکی^۱، محمد رضا ایمانپور^۱، پریا اکبری^{۲*}، رقیه صفری^۱، ولی الله جعفری^۱

*paria.akbary@gmail.com

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

چکیده

این مطالعه، به منظور ارزیابی اثر عصاره زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (کیموتریپسین، تریپسین، پروتئاز، لپاز و آمیلاز) و برخی پارامترهای بیوشیمیایی (آلکالین فسفاتاز، پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین و لیزوزیم) میگوی پاشفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شد. تعداد ۶۰۰ پست لارو میگو (با وزن اولیه 0.07 ± 0.06 گرم) به طور تصادفی در ۱۲ مخزن فایبرگلاس در ۴ تیمار با تراکم ۵۰ میگو در هر تانک توزیع شدند. میگوهای گروه شاهد با غذای پایه بدون عصاره زنجبیل تغذیه شدند. میگوهای سایر گروه‌ها با غذاهای پایه حاوی $0.5/1.0$ و $0.5/1.5$ گرم بر کیلوگرم غذا تغذیه شدند. رژیم‌های غذایی به میزان ۱۰ درصد وزن زنده بدن میگو به مدت ۸ هفته مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، لپاز و پروتئاز و میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در گروه $0.5/1.0$ و $0.5/1.5$ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد و $0.5/1.5$ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا افزایش یافت ($p < 0.05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز (1.35 ± 0.05 واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و لپاز (0.09 ± 0.01 واحد بر میلی‌گرم پروتئین) در گروه ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سطوح $0.5/1.0$ و $0.5/1.5$ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا جهت افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در جیره غذایی میگوی پاشفید غربی توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: میگوی پاشفید غربی، زنجبیل، سیستم ایمنی غیر اختصاصی، فعالیت آنزیم گوارشی

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش سریع جمعیت، گوشت میگو به عنوان یکی از منابع مهم تامین پروتئین در برنامه غذایی انسان محسوب می‌شود. در صنعت پرورش میگو، میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) به دلیل رشد سریع، قابلیت تراکم‌پذیری بالا، قابلیت تحمل شوری بالا و دمای کم و مقاومت نسبتاً بالا به عوامل بیماری‌زا در مقایسه با میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) مورد توجه قرار گرفته است (Briggs et al., 2004).

این صنعت در کشور، به علت بروز بیماری‌های مختلف از جمله بیماری ویروسی لکه سفید و بیماری‌های باکتریایی مختلف دچار خسارات زیادی شده و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم و باقی ماندن در بافت موجود، مشکلات زیست محیطی متعددی را ایجاد نموده است (Esiobu et al., 2002).

یکی از روش‌های ایده‌آل برای کنترل بیماری‌ها در آبی‌پروری تقویت سیستم مکانیسم دفاعی با اجرای اقدامات پیشگیرانه و تحریک سیستم ایمنی است (Kumar et al., 2013). محرک‌های ایمنی، مواد شیمیایی و دارویی فعال هستند که مکانیسم‌های دفاعی یا پاسخ ایمنی را افزایش داده و منجر به مقاومت میگو در برابر بیماری‌ها می‌شوند. از آنجایی که شیوع بیماری، به صورت دوره‌ای و قابل پیش‌بینی است. در نتیجه، می‌توان از محرک‌های ایمنی استفاده نمود و از این طریق با افزایش مکانیسم دفاع غیر اختصاصی، از تلفات بیماری جلوگیری کرد (Citarasu, 2010).

گیاهان دارویی با داشتن مزیت‌هایی از جمله عوارض جانبی کم، سهولت دسترسی، خطر کمتر برای محیط و جانور همواره به عنوان جایگزین مناسب برای داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (نجفی و همکاران، ۱۳۹۷؛ شمسانی مهرجان و همکاران، ۱۳۹۹). لذا، از داروهای گیاهی و چاشنی‌ها به عنوان افزودنی غذایی درجیره آبزیان به جای محصولات شیمیایی استفاده می‌شود (Haghighi and Rohani, 2013). همچنین افزودنی‌های مختلف گیاهی بر ترشح آنزیم‌های گوارشی

موثر هستند و عملکرد جانوری را با تحریک ترشحات رودهای و تولیدات آنزیمی آمیلاز، لیپاز و پروتئاز بهبود می‌بخشند که منجر به افزایش قابلیت هضم و دسترسی منابع غذایی می‌شود (Citarasu, 2010); ضیایی نژاد و همکاران، ۱۳۹۷).

زنجبیل با نام علمی *Zingiber officinale* یکی از گیاهان دارویی است که در آسیای میانی، چین، هند و پاکستان رشد می‌کند و به عنوان ادویه و دارو برای برخی بیماری‌ها در طب سنتی استفاده می‌شود (Zhang et al., 2009).

ریشه زنجبیل حاوی ترکیبات متعددی مانند جینجرول (gingerol) شاگول‌ها (shogaols)، جینجردیون (gingerdiones) و جینجردیول (gingerdiols) است که دارای فعالیت بیولوژیک نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و دارویی است (Zhang et al., 2009). جینجرول‌ها از جمله ترکیبات زنجبیل است که محرک اشتها و ضد تهوع می‌باشند (Talpur et al., 2013). همچنین زنجبیل در ماهی و میگو به عنوان عامل موثر تعدیل کننده ایمنی شناخته شده است (Talpur, 2014). عصاره زنجبیل علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی، منجر به افزایش شیره گوارشی و تسهیل هضم سریع مواد غذایی بخصوص چربی‌ها می‌شود (Venkatramalingam et al., 2007).

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه اثر گیاه زنجبیل بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگو از جمله زنجبیل بر میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) (Venkatramalingam et al., 2007)، بر رشد ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) (اکبری و نگهداری جعفر بیگی، ۱۳۹۵) بر سیستم ایمنی میگوی دراز آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) (El-Desouky et al., 2012) صورت گرفته است. برای مثال، Chang و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی اثر ایمنی‌زایی زینجرون (zingerone) ماده موثره (فعال) زنجبیل با ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی در میگوی پاسفید غربی نشان دادند که استفاده از زینجرون در جیره غذایی، منجر به افزایش رشد و بهبود سطح آنزیم لیزوزیم و

و ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط غذایی حاصل اضافه شد. سپس ترکیب غذایی حاصل، با استفاده از دستگاه چرخ گوشت (National, Japan) با سایز مش ۱ میلی متر به صورت پلت غذایی درآمد. سپس در مجاورت دمای اتاق خشک و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

جدول ۱: ترکیب (گرم بر کیلوگرم رژیم) آنالیز تقریبی (درصد غذا) از رژیم شاهد

Table 1: Composition (g/kg diet) approximate analysis (% food) of the control diet

عناصر غذایی	گرم بر کیلوگرم غذا
پودر ماهی	۳۰۰
پودر سویا	۸۰
پودر گندم	۷۰
پودر اسکوئید	۳۵۰
پودر میگو	۱۰۰
مخمر	۲۰
روغن ماهی	۳۰
لستین سویا	۴۰
ویتامین ها و مواد معدنی ^A	۲۰
ترکیب تقریبی	درصد
پروتئین	۲۶/۷
چربی	۹/۷
رطوبت	۸/۳
خاکستر	۱۰/۸
فیبر	۰/۹
عصاره فاقد ازت	۴۳/۶

^A ویتامین ها و مواد معدنی: ویتامین ها: ویتامین A ۳۰۰۰ آنگستروم بر گرم، ویتامین D ۲۵۰۰ آنگستروم بر گرم ویتامین E ۵۰۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. مواد معدنی: ۲۰۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سولفات مس، ۴۰۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سولفات روی، ۱۵۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم، ۲۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سولفات کبالت، ۱ میلی گرم بر کیلوگرم آهن، ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سلنیم

میگو و طراحی آزمایش

این تحقیق در اردیبهشت ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات آبهای دور چابهار به مدت ۸ هفته انجام گرفت. ۶۰۰ پست لارو

مقاومت میگو در برابر باکتری (*Vibrio alginolyticus*) شد. همچنین Rahimi Yadkoori و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی سطوح مختلف عصاره زنجبیل (۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) بر میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز ماهی بنی *Mesopotamichthys sharpeyi* نشان دادند که استفاده از سطح ۱ درصد عصاره زنجبیل منجر به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز شد. از آنجایی که تاکنون مطالعه اندکی در زمینه اثر عصاره زنجبیل بر فعالیت آنزیم های گوارشی و سیستم ایمنی غیر اختصاصی میگوی پاسبید غربی صورت نگرفته است.

لذا این تحقیق، به بررسی اثر عصاره زنجبیل بر فعالیت آنزیم های گوارشی (کیموتریپسین، تریپسین، آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) و برخی پارامترهای بیوشیمیایی (پروتئین تام، آلبومین، آلکالین فسفاتاز، گلوبولین و لیزوزیم) میگوی پاسبید غربی به مدت ۸ هفته پرداخته است.

مواد و روش ها

تهیه عصاره آبی زنجبیل و رژیم های غذایی آزمایشی

گیاه زنجبیل از بازار سنتی شهر شیراز خریداری و به وسیله مرکز هرباریوم دانشگاه شیراز مورد تأیید قرار گرفت. سپس با آب شسته شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک و بوسیله دستگاه آسیاب کاملاً به حالت پودر تبدیل شدند. بر طبق روش Choi و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییر عصاره زنجبیل تهیه شد. ابتدا ۳۰ گرم از پودر زنجبیل با ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۴ ساعت جوشانده شد. سپس با دور ۱۸۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سپس به منظور تغلیظ، مایع رویی از تبخیر کننده چرخشی در خلاء با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۴۵ استفاده شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده به عنوان مکمل غذایی نگهداری شد. به منظور تهیه ۴ رژیم غذایی آزمایشی عصاره زنجبیل در ۴ سطح ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۱/۵ گرم بر کیلوگرم غذا با عناصر غذایی غذای شاهد (جدول ۱) مخلوط شد و سپس روغن

در بافر سرد تریس مانیتول (مانیتول ۵۰ میلی مولار، بافر تریس اسید کلریدریک در pH=7) و با ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار هموزنیزه و در دور ۹۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی جهت سنجش آنزیم‌ها و پارامترهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت (Cahu *et al.*, 1999).

برای تعیین فعالیت آنزیم تریپسین از روش Worthington (۱۹۹۱) که بر مبنای سوبسترای N-بنزوئیل-L-آرژنین اتیل استر است که این سوبسترا تحت تاثیر آنزیم تریپسین تجزیه و به N-بنزوئیل-L-آرژنین تبدیل می‌شود. این سنجش در طول موج ۲۵۳ نانومتر صورت گرفت. واحد فعالیت آنزیم تریپسین بر حسب تغییر میزان جذب، به دنبال شکستن سوبسترا در مدت ۱ دقیقه محاسبه شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین از روش Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) در طول موج ۲۵۶ نانومتر از سوبسترای بنزوئیل-L-تیروزین اتیل استر استفاده شد. برای تعیین فعالیت آنزیم آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا و طول موج ۵۴۰ نانومتر استفاده گردید (Worthington, 1991). در این واکنش نشاسته تحت تاثیر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که میزان مالتوز در واحد زمان در حضور معرف رنگی دی نیتروسالسیلیک اسید و با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز سنجیده می‌شود. برای سنجش آنزیم لیپاز از روش Worthington (۱۹۹۱) استفاده گردید. در این روش از امولسیون روغن زیتون به عنوان سوبسترا استفاده گردید. سوبسترا تحت تاثیر آنزیم لیپاز تجزیه و به دی گلیسرید و اسید چرب تبدیل می‌شود. یک واحد آنزیم مقداری از آنزیم است که یک میلی اکسی والان اسید چرب را از یک مول تری گلیسرید در مدت یک ساعت هیدرولیز می‌کند. فعالیت پروتئاز کل بر اساس روش Worthington (۱۹۹۱) با سوبسترا کازئین و در طول موج ۲۶۵ نانومتر صورت گرفت. جهت سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش Walter و Schutt (۱۹۷۴) و از طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. در این روش پارانیترو فنیل فسفات به

میگوی پاسبید غربی (با میانگین وزنی $1/06 \pm 0/7$ گرم) از مرکز تکثیر خصوصی واقع در کنارک تهیه و در دو مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری مرکز به مدت ۲ هفته به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی رهاسازی شدند. روزانه یک سوم آب در هر مخزن مورد تعویض قرار گرفت و مواد دفعی در هر مخزن بوسیله سیفون خارج شد. پس از دو هفته سازگاری، میگوها به صورت تصادفی در ۴ گروه (با سه تکرار برای هر گروه) با تراکم ۵۰ عدد در هر مخزن توزیع شدند. میگوهای گروه شاهد با غذای بدون عصاره زنجبیل تغذیه شدند و میگوهای سایر گروه‌ها با سطوح ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مورد تغذیه قرار گرفتند. در طول دوره ۸ هفته‌ای آزمایش، میگوها به میزان ۱۰ درصد وزن بدن از رژیم‌های غذایی تغذیه شدند. هر دو هفته یک بار وزن همه میگوهای هر مخزن مورد ارزیابی قرار گرفت تا میزان غذا متناسب با وزن واقعی بدن تنظیم گردد. رژیم غذایی روزانه طی سه وعده (۸ صبح، ۱۳ بعد از ظهر و ۱۷ بعد از ظهر) در دسترس میگوها قرار گرفت. در طول دوره آزمایش، میانگین شوری آب (۳۷ گرم در لیتر)، اکسیژن آب ($7/5 \pm 0/65$ میلی‌گرم بر لیتر)، pH ($8 \pm 0/2$)، دما ($28/4 \pm 0/7$ درجه سانتی‌گراد) و آمونیاک ($0/1 \pm 0/03$ میلی‌گرم بر لیتر) برای پرورش میگو ثابت باقی ماند.

نمونه‌برداری و سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای بیوشیمیایی

در پایان دوره آزمایش، میگوها ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند تا دستگاه گوارش آن‌ها از مواد غذایی بخوبی تخلیه شود. پس از نمونه‌برداری (۶ عدد میگو از هر تیمار) بسرعت در مجاورت یخ قرار گرفتند تا به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی کالبدگشایی آنها صورت گیرد. روده ۶ عدد میگو از هر تیمار برای سنجش آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای بیوشیمیایی جمع‌آوری شد (Kuz'mina *et al.*, 2011).

ابتدا نمونه‌ها با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. سپس با نسبت ۳۰:۱ (وزنی به حجمی)

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA انجام گرفت نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون کالموگراف اسمیرنوف با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ و جهت مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد استفاده شد. و جهت محاسبات آماری از نرم افزار Excel ویرایش ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج

فعالیت آنزیم‌های گوارشی

فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسبید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره زنجبیل بعد از ۸ هفته در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز و آمیلاز در میگوهای تغذیه شده با ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). از نظر میزان کیموتریپسین و تریپسین بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز در میگوهای تغذیه شده با ۰/۵ و ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را از این نظر نشان ندادند ($p > 0.05$).

عنوان سوبسترا در حضور بافر دی اتانول آمین آماده شد. برای رقیق سازی نمونه از آب مقطر سرد استفاده گردید. یک واحد فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلیایی برابر یک میکرومول پارانیتروفنیل که در مدت ۱ دقیقه و به ازای ۱ میلی‌گرم پروتئین محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آزاد می‌شود.

برای تعیین میزان فعالیت لیزوزیم از روش Ellis (۱۹۹۰) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۵ میکرولیتر نمونه با ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سترات با اسیدیته ۵/۸ در میکروپلیت تخت ۹۶ خانه ای الیزا مخلوط گردید و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های ۰ و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت سرم با توجه به منحنی استاندارد مربوط به لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما تعیین گردید. پروتئین تام به‌روش بیوره (Wootton, 1964) در طول موج ۵۴۰ نانومتر، آلبومین به روش بروموکرزول سبز (Wootton, 1964) در طول موج ۶۳۰ نانومتر و از کسر پروتئین تام و آلبومین گلوبولین محاسبه شد (Kumar et al., 2005).

جدول ۲: فعالیت آنزیم گوارشی میگوی پاسبید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی آزمایشی بعد از ۸ هفته

Table 2: Digestive enzyme activity of *Litopenaeus vannamei* fed on experimental diets after 8 weeks

رژیم‌های آزمایشی				پروتئین
عصاره جلبک (میلی‌گرم بر کیلوگرم)				آنزیم گوارشی (واحد بر میلی‌گرم)
۱/۵	۱	۰/۵	۰	
۰/۱۲ ± ۰	۰/۱۲ ± ۰	۰/۱۲ ± ۰	۰/۱۲ ± ۰/۰۴	کیموتریپسین
۰/۱۵ ± ۰/۰۲	۰/۱۵ ± ۰	۰/۱۵ ± ۰	۰/۱۵ ± ۰/۰۲	تریپسین
۱/۰۳ ± ۰/۰۲ ^b	۱/۲۳ ± ۰/۰۲ ^a	۱/۲۲ ± ۰/۰۴ ^a	۱/۰۱ ± ۰/۰۳ ^b	پروتئاز
۰/۰۱ ± ۰ ^c	۰/۰۹ ± ۰ ^a	۰/۰۵ ± ۰ ^b	۰/۰۱ ± ۰ ^c	لیپاز
۰/۷۲ ± ۰/۰۱ ^c	۱/۳۹ ± ۰/۰۵ ^a	۱/۲۶ ± ۰/۲۲ ^b	۰/۷۲ ± ۰/۰۳ ^c	آمیلاز

مقادیر (میانگین ± خطای معیار، شش تکرار) با حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$)

پارامترهای بیوشیمیایی

پارامترهای بیوشیمیایی میگوی پاسبید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی آزمایشی حاوی سطوح مختلف عصاره زنجبیل بعد از ۸ هفته در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان پروتئین تام، آلومین، لیزوزیم و گلوبولین در میگوهای تغذیه شده با سطوح ۰/۵ و ۱/۰ گرم عصاره

زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد از این نظر نشان دادند ($p < 0/05$). بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز در میگوی تغذیه شده با ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$).

جدول ۳: پارامترهای بیوشیمیایی از میگوی پاسبید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی آزمایشی بعد از ۸ هفته
Table 3: Biochemical parameters of *Litopenaeus vannamei* fed with experimental diets after 8 weeks

رژیم‌های آزمایشی				پارامترهای بیوشیمیایی
عصاره جلبک (میلی‌گرم بر کیلوگرم)				
۱/۵	۱	۰/۵	*	
۵/۴۷ ± ۰/۳۴ ^c	۱۲/۰۳ ± ۱/۴۰ ^a	۱۰/۰۵ ± ۳/۳ ^b	۵/۵۰ ± ۰/۶۶ ^c	آلکالین فسفاتاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)
۴/۱۹ ± ۰/۳۲ ^c	۵/۶۰ ± ۰/۲۵ ^a	۵/۵۸ ± ۰/۲۳ ^a	۴/۶۸ ± ۰/۰۳ ^b	پروتئین تام (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۲/۵۹ ± ۰/۱۴ ^b	۲/۹۱ ± ۰/۰۲ ^a	۲/۸۹ ± ۰/۰۵ ^a	۲/۵۶ ± ۰/۱۱ ^b	گلوبولین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱/۵۳ ± ۰/۰۱ ^c	۲/۶۷ ± ۰/۰۳ ^a	۲/۷۰ ± ۰/۰۱ ^a	۲/۱۱ ± ۰/۰۴ ^b	آلومین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۲۰/۱۳ ± ۰/۴۵ ^{bc}	۲۰/۳۲ ± ۱/۰۸ ^a	۲۰/۲۳ ± ۰/۳۲ ^{ab}	۲۰ ± ۱/۰۳ ^c	لیزوزیم (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

مقادیر (میانگین ± خطای معیار، شش تکرار) با حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0/05$)

بحث

حضور و میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند به عنوان شاخص مهمی در ارزیابی پذیرش غذا، ظرفیت گوارش و میزان نیازهای جانوران آبی مورد استفاده قرار گیرد (ضیایی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۷).

در این تحقیق، بیشترین فعالیت آنزیم لپاز و آمیلاز در میگوهای تغذیه شده با ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم آمیلاز و پروتئاز در اثر مصرف آرتیمیای غنی شده با ۲۵ درصد زنجبیل در جیره غذایی میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) همسو با نتایج حاضر، گزارش شده است (Venkataramalingam et al., 2007). مشابه با تحقیق حاضر، Rahimi Yadkooori و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف عصاره زنجبیل (۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) در جیره غذایی ماهی بنی (*M. sharpeyi*) منجر به افزایش فعالیت آمیلاز شد. می‌توان گفت که ترکیبات فعال زیستی در زنجبیل منجر به تحریک فعالیت دستگاه گوارش، کاهش زمان عبور غذا از

دستگاه گوارش و جذب سریع مواد غذایی می‌گردد (Khan et al., 2012). همچنین مکمل‌های غذایی نقش مهمی در تولید آنزیم‌های گوارشی برون‌زا دارند که مسئول جذب مواد مغذی هستند و موجب تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی درون‌زا دستگاه گوارش می‌شوند (Zhou et al., 2009).

مواد تریپسین و کیموتریپسین از مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌باشند که مسئول هضم پروتئین در دستگاه گوارش میگوها و ماهیان شناخته شده‌اند (اکبری و نگهداری جعفریگی، ۱۳۹۵; Sainz et al., 2009). اگرچه زنجبیل حاوی مواد محرک هضم، نظیر پروتئاز تیول، کامفن (camphene)، جینجر (gingiber) و جینجرول (gingerol) می‌باشد که سبب افزایش فعالیت تریپسین می‌گردد ولی در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین در بین گروه‌های تغذیه شده با عصاره زنجبیل اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند که با نتایج حاصل از تحقیق Rahimi Yadkooori و همکاران (۲۰۱۵) در این زمینه همخوانی داشت در

آلکالین فسفاتاز نیز به عنوان شاخص مهمی در جذب مواد غذایی شناخته شده است و نقش مهمی در تجزیه و معدنی نمودن (مینرالیزه) استخوان‌های آبی، انتقال فسفات و هیدرولیز پروتئین فسفریله شده دارد (Silva et al., 2010). در مطالعه حاضر استفاده از سطوح ۰/۵ و ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌دار میزان آلکالین فسفاتاز روده نسبت به گروه شاهد و ۱/۵ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا شد و بیشترین میزان آلکالین فسفاتاز در میگوی پاسبید غربی تغذیه شده با ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا مشاهده شد. Rahimi Yadkoori و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی سطوح مختلف عصاره زنجبیل (۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) بر میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز روده ماهی بنی *Mesopotamichthys sharpeyi* نشان دادند که استفاده از سطح ۱ درصد عصاره زنجبیل منجر به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز شد که با نتایج این تحقیق در این زمینه همخوانی داشت. می‌توان گفت که عصاره زنجبیل با افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز روده، می‌تواند نقش مهمی در افزایش جذب مواد مغذی ضروری، توسعه و تکامل روده و در نهایت رشد بهتر ارگانسیم‌ها داشته باشد (Nya and Austin, 2011).

در کل می‌توان گفت که استفاده از سطوح ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا منجر به بهبود فعالیت آنزیم‌های لیپاز، پروتئاز و آمیلاز و همچنین بهبود سیستم ایمنی غیر اختصاصی اعم از پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین و لیزوزیم و بهبود جذب مواد مغذی ضروری با افزایش آلکالین فسفاتاز شد. لذا استفاده از سطح ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا در جیره غذایی میگوهای پاسبید غربی به منظور بهبود هضم و جذب مواد غذایی ضروری و افزایش سیستم ایمنی غیر اختصاصی توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیلات چابهار که امکانات این پژوهش را فراهم

حالی که نتیجه این مطالعه با تحقیق انجام شده Venkataramalingam و همکاران (۲۰۰۷) همخوانی نداشت که می‌توان دلیل عدم مغایرت نتایج را به نوع گونه میگو و روش عصاره‌گیری و میزان غلظت عصاره نسبت داد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پروتئین تام، گلوبولین، آلبومین و لیزوزیم میگوی پاسبید غربی پس از ۸ هفته تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی عصاره زنجبیل در مطالعه حاضر نشان داد که بکارگیری ۰/۵ و ۱ گرم عصاره زنجبیل بر کیلوگرم غذا سهم بسزایی در افزایش این پارامترها داشتند و با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. همسو با نتایج این تحقیق، Dugensi و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که بیشترین میزان پروتئین پلاسما، در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با سطح ۱ درصد عصاره آبی زنجبیل مشاهده شد. همچنین Talpur و همکاران (۲۰۱۳) با افزودن زنجبیل به جیره ماهی باس دریایی (*Lates calcarifer*) افزایش معنی‌دار پروتئین تام و آلبومین را در تیمارهای آزمایشی حاوی پودر زنجبیل به‌ویژه سطح ۱۰ گرم زنجبیل مشاهده کردند که با نتایج این تحقیق همخوانی داشتند. می‌توان گفت افزایش سطح پروتئین، آلبومین، گلوبولین و آنزیم‌های لیزوزیم به عنوان عامل مهمی در سیستم ایمنی ذاتی و غیر اختصاصی ماهی و میگو شناخته شده‌اند (Magnadóttir, 2006; Awad and Awaad, 2017). همچنین Chang و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی اثر ایمنی‌زایی زینجرون (zingerone) ماده موثره (فعال) زنجبیل با ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی در میگوی سفید غربی نشان دادند که استفاده از زینجرون در جیره غذایی، منجر به افزایش رشد و بهبود سطح آنزیم لیزوزیم و مقاومت میگو در برابر باکتری *Vibrio alginolyticus* شد. می‌توان گفت که دلیل این موضوع، در ارتباط با ترکیبات فعال زیستی موجود در گیاهان دارویی مانند پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و ساپونین است که نقش مهمی در مقاومت موجودات آبی در برابر عفونت‌های باکتریایی و افزایش ایمنی بازی می‌کند (Xie et al., 2008).

- Briggs, M., Smith, S.F., Subasinghe, R. and Phillips, M., 2004.** Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and Pacific. Food and agriculture organization of the United Nations regional office for Asia and Pacific, FAO, Bangkok, Thailand. 88 P.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P. and Le Gall, M.M., 1999.** Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus abrax* larvae. *Aquaculture*, 171(1-2): 109–119. Doi: 10.1016/S0044-8486(98)00428-1.
- Chang, Y., Liu, C., Wu., Chiang, C., Lian, J. and Hsieh, S., 2012.** Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(2): 284-290. Doi: 10.1016/j.fsi.2011.11.017.
- Choi, Y.H., Lee, B.J. and Nam, T.J., 2015.** Effect of dietary inclusion of *Pyropia yezoensis* extract on biochemical and immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 435: 347-353. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.010.
- Citarasu, T., 2010.** Herbal biomedicines a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18: 403–414. Doi: org/10.1007/s10499-009-9253-7
- آوردند و کارشناسان محترم آزمایشگاه تخصصی پاتوبیولوژی صدف چابهار تشکر و قدردانی می‌گردد.
- ### منابع
- اکبری، پ. و نگهداری جعفر بیگی، ی.، ۱۳۹۵. اثر سطوح مختلف مکمل گیاهی بیوهربال (حاوی پودر زنجبیل و رازیانه) بر رشد، تغذیه و ترکیب شیمیایی لاشه کفال ماهی. نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی، ۱۲: ۱۰-۱۸. Doi: 10.22034/VJ.2016.106292
- شمسایی مهرجان، م.، حسینی شکرابی، س.پ.، محبوب زردست، م. و محمدی، ن.، ۱۳۹۹. تأثیر مکمل غذایی پودر فلفل قرمز تند (*Capsicum annuum*) بر شاخص‌های رشد، میزان بقاء، فراسنجه‌های خونی و برخی از پاسخ‌های ایمنی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۱): ۱۳۱-۱۴۰. Doi:10.22092/ISFJ.2019.120988
- ضیایی‌نژاد، س.، لاوت، د. و آبرومند، ع.، ۱۳۹۷. بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی سفید غربی در مراحل زیستی مختلف. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۴(۴): ۳۷۳-۳۷۹. Doi: 10.29252/nbr.4.4.373
- نجفی، ز.، اورجی، ح.، یگانه، س. و کرامت امیر کلابی، ع.ص.، ۱۳۹۷. تأثیر عصاره‌ی الکلی یونجه (*Medicago sativa*) بر عملکرد رشد، مصرف غذا، ترکیب بدن و برخی از فراسنجه‌های سرمی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۵): ۱-۹. Doi:10.22092/ISFJ.2018.10220
- Awad, E. and Awaad, A., 2017.** Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 67: 40-54. Doi: 10.1016/j.fsi.2017.05.034

- Dugenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003.** Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1): 99-106. Doi: 10.1016/S0378-741(03)00182-X
- El-Desouky, H., El-Asely, A., Shaheen, A.A. and Abbass, A., 2012.** Effects of *Zingiber officinalis* and *Cyanodon dactylon* on the Growth Performance and Immune Parameters of *Macrobrachium rosenbergii*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(3): 301-307. Doi:10.5829/idosi.wjfm.2012.04.03.62120.
- Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., (ed) *Techniques in Fish Immunology*, (Eds). SOS Publication, Fair Haven, USA, pp.101-103.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95(2): 271-278. Doi: 10.1016/0003-9861(61)90145-X.
- Esiobu, N., Armenta, L. and Ike, J., 2002.** Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research*, 12(2): 133-144. Doi: 10.1080/09603120220129292.
- Haghighi, M. and Sharif Rohani, M., 2013.** The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Medicinal plant and Herbal Therapy Research*, 1: 8-12.
- Khan, R.U., Naz, S., Nikousefat, Z., Tufarelli, V., Javdani, M., Qureshi, M.S. and Laudadio, V., 2012.** Potential applications of ginger (*Zingiber officinale*) in poultry diets. *World's Poultry Science Journal*, 68(2): 245-252. Doi: 10.1017/S004393391200030X.
- Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Choudhury, D., Yengkokpam, S. and Mukherjee, S.C., 2005.** Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *Labeo rohita* juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(4): 331-344. Doi: 10.1016/j.fsi.2005.03.001.
- Kumar, P.N.J., Jyothsana, S., Reddy, M.H. and Sreevani, S., 2013.** Effect of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus rhamnosus* incorporated probiotic diet on growth pattern and enzymes in *Penaeus vannamei*. *International journal of Life Science and Pharma Research*, 3(4): 6-11.
- Kuz'mina, V.V., Skvortsova, E.G., Zolotareva, G.V. and Sheptitskiy, V.A., 2011.** Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish. *Fish Physiology Biochemistry*, 37(3): 345-353. Doi: 10.1007/s10695-010-9426-3
- Magnadóttir, B., 2006.** Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish*

- Immunology*, 20(2): 137–151.
Doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006.
- Nya, E.J. and Austin, B., 2011.** Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(3): 845-850.
Doi:10.1016/j.fsi.2011.01.008.
- Rahimi Yadkoori, N., Zanguee, N., Mousavi, S.M. and Zakeri, M., 2015.** Effects of Ginger (*Zingiber officinale*) extract on digestive enzymes and liver activity of *Mesopotamichthys sharpeyi* fingerlings. *Journal of the Persian Gulf*, 6(19): 1-10.
- Sainz Hernandez, J.C. and Cordova Murueta, J.H., 2009.** Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 290(3-4): 190-195. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.034.
- Silva, F.C.P., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J.L., Le Gall, M.M., Kaushik, S. and Gatesoupe, F.J., 2010.** Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306(1-4): 233-237. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.018.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. and Ambok Blong, A., 2013.** Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* roscoe) on immune response of asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 400-401: 46-52.
Doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.043.
- Talpur, A.D., 2014.** *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 420–421: 71–78.
Doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.10.039.
- Venkataramalingam, K., Godwin, C.J. and Citarasu, T., 2007.** *Zingiber officinalis*, an herbal appetizer in the tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius) larviculture. *Aquaculture Nutrition*, 13(6): 439-443. Doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00495.x.
- Walter, K. and Schutt, C., 1974.** Alkaline phosphatase in serum (continuous assay). In: Bergmeyer, H.U., (Ed), *Methods of Enzymatic Analysis*, (2nd ed), Academic press, New York, NY, pp. 860-864
- Wootton, L.I., 1964.** *Micro-analysis in medical biochemistry in micrometer*, 4th.ed, Churchill press; London UK. pp.264-267.
- Worthington C.C., 1991.** *Worthington manual related Biochemical*. 3th ed, Freehold, New Jersey, 85 P.
- Xie, J., Liu, B., Zhou, Q., Su, Y., He, Y., Pan, L., Ge, X. and Xu, P., 2008.** Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian. *Aquaculture*,

281(1-4): 5-11. Doi:
10.1016/j.aquaculture.2008.03.038.

Zhang, G.F., Yang, Z.B., Wang, Y., Yang, W.R., Jiang, S.Z. and Gai, G.S., 2009. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens.

Poultry Science, 8(10): 2159–2166.
Doi:10.3382/ps.2009-00165.

Zhou, X.X., Wang, Y. and Li, W.F., 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287(3-4): 349–353.
Doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.046.

Effect of dietary administration of a *Zingiber officinale* extract on digestive enzyme activity and some biochemical parameters of western whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Shahaki N.¹; Imanpour M.R.¹; Akbary P.²; Safari R.¹; Jafari V.¹

paria.akbary@gmail.com

- 1- Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Fisheries and Aquaculture group, Gorgan, Iran
- 2- Chabahar Maritime University, Department of Marine Sciences, Fisheries Division, Chabahar, Iran

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of *Zingiber officinale* extract (ZE) on digestive enzyme activity (chymotrypsin, trypsin, protease, amylase, and lipase) and some biochemical parameters (alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP), albumin (ALB), globulin (GLU) and lysozyme) of *Litopenaeus vannamei* shrimp. A total of 600 post larvae shrimps (initial weight, 1.06 ± 0.7 g) were randomly distributed into 12 fiberglass tanks representing four treatments at a rate of 50 shrimp in each tank. The control shrimp group (ZE0) was fed a ZE free basal diet. Other groups were fed the basal diet supplemented with 0.5 (ZE 0.5), 1.0 (ZE1) and 1.5 (ZE 1.5) g kg⁻¹ diet. Results revealed that activity of protease, amylase, and lipase and value of TP, ALB and GLU of the shrimp have significantly increased ($p < 0.05$) in the ZE0.5 and ZE1 groups compared with the ZE1.5 group and control group. The highest amylase (1.35 ± 0.5 U mg⁻¹protein) and lipase (0.09 ± 0 U mg⁻¹protein) activity was observed in the ZE1 group. It can be concluded that use of *Z. officinale* ZE0.5 and ZE1 kg⁻¹ diets could suggest for increasing digestive enzyme activity and some biochemical parameters of *L. vannamei*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Zingiber officinale*, Non-specific immunity, Digestive enzyme activity

*Corresponding author