

بررسی عملکرد رشد و میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئازی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با سطوح مختلف پروتئین تک‌یاخته

عباس زمانی^{۱*}، مریم خواجهوی^۱

*a.zamani@malayeru.ac.ir

۱- گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

در مطالعه حاضر، تأثیر جایگزینی آرد ماهی با پروتئین تک یاخته باکتریایی بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های پروتئازی (پپسین، تریپسین و پروتئاز قلیایی) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (وزن متوسط: $51 \pm 2/55$ گرم) برای مدت ۶ هفته بررسی شد. پنج جیره آزمایشی با سطوح جایگزینی صفر (A)، ۲۵ (B)، ۵۰ (C)، ۷۵ (D) و ۱۰۰٪ (E) آرد ماهی همسان از نظر پروتئین و انرژی با پروتئین تک سلولی تهیه گردید. بررسی شاخص‌های افزایش وزن بدن، نرخ رشد نسبی، نسبت کارایی پروتئین، نسبت کارایی چربی و نسبت کارایی غذا نشان داد این شاخص‌ها در جیره آزمایشی C به طور معنی‌داری بالاتر از سایر تیمارها بودند ($p < 0/05$). ضریب تبدیل غذایی در جیره آزمایشی C و E به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار را نشان داد و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها مشاهده گردید ($p < 0/05$). میزان نرخ بقاء در جیره‌های آزمایشی ۱۰۰٪ بود. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و پروتئاز قلیایی ضمامم پیلوریک و روده در ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی C مشاهده شد که نسبت به جیره‌های غذایی D و E اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). هم‌چنین بالاترین فعالیت آنزیم پپسین معده در جیره C مشاهده شد که با سایر جیره‌ها به استثناء جیره B دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0/05$). براساس نتایج حاصل از عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های پپسین، تریپسین و پروتئاز قلیایی جیره حاوی ۵۰٪ پروتئین تک یاخته نسبت به سایر جیره‌ها می‌تواند برای رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مناسب باشد.

واژگان کلیدی: آرد ماهی، پروتئین تک یاخته، پروتئاز، شاخص‌های رشد، *Oncorhynchus mykiss*

*نویسنده مسئول

مقدمه

در دهه‌های اخیر، صنعت پرورش ماهی در بسیاری از کشورها بمنظور تامین بخشی از پروتئین حیوانی رشد قابل توجهی کرده است بطوریکه میزان تولید آن از ۳۰ میلیون تن در سال ۲۰۰۶ به ۵۴ میلیون تن در سال ۲۰۱۶ رسیده و پیش‌بینی می‌گردد. این میزان در سال ۲۰۳۰ به ۷۴ میلیون تن افزایش یابد (SOFIA, 2018). این در حالی است که آرد ماهی به عنوان ماده اصلی در جیره غذایی ماهیان گوشتخوار به میزان ۸۰-۳٪ استفاده می‌شود و ارزیابی‌ها نشان می‌دهد میزان استفاده از آن در سال ۲۰۳۰ در حدود ۷/۶ میلیون تن باشد (Tacon and Metian, 2008; AES, 2013). استفاده از آرد ماهی در سال‌های اخیر بدلیل کاهش ذخایر آبیان، قیمت بالا، مشکلات زیست محیطی و ورود فسفر به منابع آبی درحال کاهش بوده و از سویی، با توجه به اینکه بیش از نیمی از هزینه‌های پرورش صرف تغذیه می‌شود این امر خود باعث ایجاد رقابت شدید در منابع محدود آرد ماهی شده است (Olsen and Hasan, 2012). بر اساس گزارش Tacon و همکاران (۲۰۱۱) پیش‌بینی می‌شود در دهه آینده میانگین استفاده از آرد ماهی در غذای میگو از ۱۶ به ۸٪، ماهیان دریایی از ۲۶ به ۱۲٪، ماهیان آزاد از ۲۲ به ۱۲٪ و برای کپورماهیان و تیلاپیا از ۳ به ۱٪ کاهش یابد که در مجموع ۷٪ کاهش را در حجم پودر ماهی مصرفی بدنال خواهد داشت. لذا، تلاش‌ها جهت یافتن جایگزین مناسبی به جای آرد ماهی جهت تامین نیاز صنعت تولید خوراک ماهیان برای تداوم رشد و توسعه صنعت آبی‌پروری در سال‌های آینده و همچنین حفظ منابع دریایی اجتناب ناپذیر است. گیاهان به عنوان یک منبع پروتئین ثابت و ارزان قیمت نسبت به آرد ماهی می‌توانند به طور گسترده در ترکیب با آرد ماهی در جیره‌های غذایی استفاده شوند. اما تحقیقات نشان می‌دهد استفاده از این منابع مانند کنجاله سویا و غیره دارای اشکالاتی از جمله وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای (شامل بازدارنده‌های پروتئاز، هموگلوبین، اسید فیتیک و پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای)، تداخل در عملکرد ویتامین‌ها و محدودیت کاربرد در غذای ماهیان گوشتخوار می‌باشد که استفاده آنها را به جیره غذایی محدود می‌نماید (Gatlin et al., 2010; Kroghdahl et al., 2007). یکی از منابع پروتئینی ایمن و پایدار که می‌تواند وابستگی به منابع جانوری و گیاهی را در تغذیه دام، طیور و آبیان کاهش دهد، استفاده از پروتئین

تک یاخته (SCP)^۱ است که از میکروارگانیسم‌هایی نظیر مخمرها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تولید و جهت تهیه غذا به جای منابع پروتئینی رایج استفاده می‌شود (Sultana et al., 2018). در واقع، SCP را تولید زیست توده سلولی از طریق کشت بر ضایعات صنعتی و کشاورزی مانند ضایعات سلولزی، آب پنیر و ملاس با کمک میکروارگانیسم‌ها تعریف کرد (بی‌بی‌کم و همکاران، ۱۳۸۹، Faust, Nasser et al., 2011; 1987). البته اشکالاتی نیز در استفاده از آنها وجود دارد که می‌توان به قابلیت پائین هضم دیواره سلولی و میزان بالای اسید نوکلئیک بویژه ترکیبات پورین اشاره نمود که می‌توان با کمک فرآوری آنزیمی و حذف دیواره سلولی برطرف نمود (Alvarez and Enriquez, 1988). ارزیابی توانایی گوارش مواد غذایی از مهمترین عوامل در فرآیند جایگزینی پودر ماهی می‌باشد. لذا، مطالعه توزیع آنزیم‌های گوارشی و فعالیت آنها می‌تواند در حل این مشکل موثر باشد (Deguara et al., 2003; Trejo-Escamilla et al., 2017). یکی از این منابع پروتئین تک یاخته، IPL 68 (Intraco PL 68) می‌باشد که از تخمیر مواد خام گیاهی مانند چغندر قند، ملاس نیشکر و گلوکز گندم توسط باکتری غیر GMO^۲ و با استفاده از مونسدیم ال-اسید گلوتامیک تولید می‌شود و حاوی ۶۸٪ پروتئین با پروفایل اسید آمینه‌ای مناسب بویژه ترئونین، ایزولوسین و والین است. از دیگر ویژگی‌های آن می‌توان به رنگ قهوه‌ای مطلوب و بوی آن اشاره نمود که شبیه پودر ماهی است و از نظر هزینه مقرون به صرفه است و قابلیت دسترسی بالایی دارد. یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی در ایران ماهی قزل آلاي رنگین کمان می‌باشد که بر اساس سالنامه آماری سازمان شیلات ایران (۱۳۹۶) میزان تولید آن ۱۶۵۷۸۷ تن در سال ۱۳۹۵ بوده است که ۴۴٪ از کل ماهیان پرورشی ایران را تشکیل می‌دهد. لذا، یافتن جایگزین مناسب برای آرد ماهی در تهیه جیره غذایی این گونه بخصوص برای مراحل اولیه رشد به دلیل نیاز پروتئینی بالا ضروری می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق دستیابی به یک جیره غذایی مناسب با جایگزینی پروتئین IPL 68 به جای آرد ماهی و ارزیابی تأثیر آن بر روند رشد و فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در بچه ماهی قزل آلاي رنگین کمان می‌باشد که نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در افزایش ظرفیت تولید و کاهش هزینه پرورش دهندگان موثر باشد.

^۱-Single cell protein^۲-Genetically Modified Organism

مواد و روش کار

شرایط پرورش

بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط $2/51 \pm 0/55$ گرم از کارگاه قزل‌سما واقع در شهرستان نهاوند تهیه شده و در مدت زمان ۶۰ دقیقه و با استفاده از کیسه حمل به آزمایشگاه گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر منتقل شدند. سپس بچه ماهیان در ۱۵ عدد آکواریوم با حجم تقریبی ۴۰ لیتر توزیع شدند که در هر آکواریوم ۱۵ عدد بچه ماهی رهاسازی گردید. بعد از طی دوره سازگاری به مدت ۲ هفته با غذای تجاری و حصول اطمینان از سلامتی بچه ماهیان، تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی آزمایشی تهیه شده به مدت ۶ هفته بر اساس ۴٪ وزن بدن با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی انجام گرفت (موحد راد و همکاران، ۱۳۹۷). غذادهی روزانه در ۳ نوبت و در ساعات ۸، ۱۳ و ۱۹ در حد سیری و بصورت دستی انجام شد. شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب به صورت روزانه طی دوره آزمایش اندازه گیری گردید که به طور میانگین دمای آب $14 \pm 0/5$ °C، pH $8/2 \pm 0/1$ ، شوری کمتر از ۱ g/L و اکسیژن محلول mg/L $9/5 \pm 0/1$ بود. در این مدت مدفوع و غذای بجای مانده در محیط پرورشی ۳۰ دقیقه بعد از اتمام غذادهی روزانه سیفون شده و آب آکواریوم‌ها نیز روزانه تا ۹۰٪ تعویض گردید. در انتهای دوره از هر آکواریوم ۷ عدد ماهی جهت تعیین فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مابقی نیز جهت تعیین شاخص‌های رشد نمونه برداری شدند.

ساخت جیره‌های آزمایشی

جیره غذایی جهت بررسی اثرات جایگزینی IPL 68 در ۵ تیمار شامل جیره شاهد A (۱۰۰ درصد آرد ماهی؛ صفر درصد IPL 68)، جیره B (۷۵ درصد آرد ماهی؛ ۲۵ درصد IPL 68)، جیره C (۵۰ درصد آرد ماهی؛ ۵۰ درصد IPL 68)، جیره D (۲۵ درصد آرد ماهی؛ ۷۵ درصد IPL 68) و جیره E (صفر درصد آرد ماهی؛ ۱۰۰ درصد IPL 68) مورد مطالعه قرار گرفت. فرمولاسیون جیره‌های آزمایشی با کمک نرم افزار Aquafeed و بر اساس نیازهای غذایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (NRC, 1993) انجام شد تا جیره‌ها از نظر میزان پروتئین، چربی و انرژی همسان باشند. جهت تهیه جیره‌های آزمایشی ابتدا اقلام غذایی (مانند آرد گندم به عنوان منبع اصلی نشاسته) بر اساس جدول ۱ تهیه شده و بعد از الک کردن و آسیاب نمودن بصورت کاملاً پودری آماده شدند. سپس اقلام غذایی بر

اساس مقادیر مورد نیاز توسط ترازو توزین و با یکدیگر مخلوط شدند و به آنها آب اضافه شد. خمیر حاصله بوسیله چرخ گوشت با اندازه چشمه ۲ میلی‌متر پلت شده و برای خشک کردن بمدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا در دمای اتاق قرارگرفت و پلت‌های خشک شده در کیسه‌های پلاستیکی و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

شاخص‌های رشد

در پایان آزمایش غذادهی ماهیان به مدت ۴۸ ساعت قطع گردید و ماهیان بعد از خروج از هر آکواریوم برای بررسی شاخص‌های رشد با استفاده از سوزن قطع نخاع شدند (زمانی و همکاران، ۱۳۸۵). شاخص‌های افزایش وزن بدن (BWG)^۱، نرخ رشد نسبی (RGR)^۲، ضریب تبدیل غذایی (FCR)^۳، نرخ بقاء (SR)^۴، نسبت کارایی پروتئین (PER)^۵، نسبت کارایی چربی (LER)^۶ و نسبت کارایی غذا (FER)^۷ با استفاده از روابط ذیل محاسبه شد (Hamza et al., 2008).

وزن اولیه - وزن ثانویه = (BWG) افزایش وزن بدن

(وزن اولیه / وزن اولیه - وزن) { (RGR) نرخ رشد نسبی $\times 100$

(تعداد اولیه ماهیان / تعداد نهایی ماهیان) = (SR) نرخ بقاء $\times 100$

مقدار غذای خشک مصرف = (FCR) ضریب تبدیل غذایی
مقدار افزایش وزن بدن / شده

/ مقدار افزایش وزن بدن = (PER) نسبت کارایی پروتئین
مقدار پروتئین خام مصرفی

مقدار / مقدار افزایش وزن بدن = (LER) نسبت کارایی چربی
چربی خام مصرفی

مقدار / مقدار افزایش وزن بدن = (FER) نسبت کارایی غذا
غذای خشک مصرفی

¹ - Body Weight Gain

² - Relative Growth Rate

³ - Feed Conversion Ratio

⁴ - Survival Rate

⁵ - Protein Efficiency Ratio

⁶ - Lipid Efficiency Ratio

⁷ - Feed Efficiency Ratio

جدول ۱: اجزا و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی جهت تغذیه بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*O. mykiss*).

Table 1: Ingredients and proximate composition of experimental diets for feeding rainbow trout (*O. mykiss*) fry.

E	D	C	B	A	اجزای جیره (گرم در کیلوگرم غذا)
۰	۱۲۵	۲۵۰	۳۷۵	۵۰۰	پودر ماهی
۵۰۰	۳۷۵	۲۵۰	۱۲۵	۰	^۱ IPL-68
۶۴/۸	۶۴/۸	۶۴/۸	۶۴/۸	۶۴/۸	آکوپرو ^۲
۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	امپریال ^۳
۵۰/۸	۶۰/۶	۷۰/۴	۸۰/۲	۹۰	گلو تن ذرت
۱۴۰	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۳	۱۳۰	آرد گندم
۱۷/۶	۲۸/۲	۳۸/۸	۴۹/۴	۶۰	پودر گوشت و استخوان
۳۸	۲۶	۲۰	۲۰	۲۰	روغن سویا
۱۰۰	۱۰۰	۹۳	۸۲	۷۰	روغن ماهی
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	مکمل معدنی ^۴
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	مکمل ویتامینی ^۵
۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	آنتی اکسیدان
۵	۵	۵	۵	۵	ضد قارچ
۲۳/۶	۱۷/۲	۹/۸	۵/۴	۰	پرکننده
ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی (درصد)					
۵/۰۰	۴/۸۳	۴/۹۱	۴/۴۱	۴/۵۰	رطوبت
۴۵/۴۴	۴۵/۵۱	۴۵/۴۷	۴۵/۷۲	۴۵/۶۸	پروتئین کل
۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	۲۱/۵۰	چربی کل
۷/۶۸	۷/۷۳	۷/۸۷	۷/۹۱	۸/۰۲	خاکستر
۲۰/۳۸	۲۰/۴۳	۲۰/۲۵	۲۰/۴۶	۲۰/۳۰	کربوهیدرات
۵/۴۳	۵/۴۴	۵/۴۳	۵/۴۵	۵/۴۴	انرژی ناخالص (kcal/g)

۱- IPL-68 (Intraco pl-68) (تولید شده در شرکت Intraco بلژیک): نوعی محصول تهیه شده از زیست توده باکتریایی کشته شده که از اسید مونو سدیم - آل گلو تامیک با استفاده از تخمیر میکروبی مواد خام گیاهی مانند ملاس چغندر قند، نیشکر و یا قند میوه تهیه می‌شود و حاوی ۱۰ درصد رطوبت، ۶۸ درصد پروتئین، ۳/۲۵ درصد چربی، ۱ درصد فیبر خام و ۱۰ درصد خاکستر می‌باشد.

۲- آکوپرو (تولید شده در شرکت یسنا مهر): سویای فرآوری شده. میزان پروتئین ۱ درصد، انرژی قابل متابولیسم ۲۸۷۰ kcal/kg، رطوبت ۱۲ درصد، خاکستر ۷ درصد، چربی ۲/۸ درصد، فیبر خام ۴ درصد، نشاسته ۵ درصد و قند ۹ درصد است.

۳- امپریال (تولید شده در شرکت کارگیل آمریکا): منبعی با میزان پروتئین ثابت و خلوص بالاست که از ذرت تهیه شده است. میزان پروتئین ۷۵ درصد، چربی خام ۲ درصد، حداکثر فیبر خام ۱ درصد، نشاسته ۱ درصد، انرژی قابل متابولیسم ۳/۳۵ kcal/g است.

۴- مکمل معدنی (میلی گرم/کیلوگرم): KCl : ۲۰۰ میلی گرم، KI : ۶۰ میلی گرم، $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: ۷ میلی گرم، $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: ۱۴ میلی گرم، $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۴۰۰ میلی گرم، $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۲۰۰ میلی گرم، $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۸۰ میلی گرم، $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: ۶۵ میلی گرم، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: ۳۰۰۰ میلی گرم، $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۲۰۰۰۰ میلی گرم، NaCl : ۱۳۶ میلی گرم و Zeolite : ۵۸۴۰ میلی گرم و کریر تا ۱ کیلوگرم است.

۵- مکمل ویتامینی حاوی تیامین (۱۲ میلی گرم)، ریبوفلاوین (۵ میلی گرم)، پیرودوکسین (۶ میلی گرم)، سیانوکوبالامین (۰/۰۵ میلی گرم) نمک منادیون (K_3) (۵ میلی گرم)، اینوزیتول (۱۰۰ میلی گرم)، پانتوتینیک اسید (۳۰ میلی گرم)، فولیک اسید (۲ میلی گرم)، بیوتین (۰/۰۶ میلی گرم)، رتینول استات (۲۵ میلی گرم)، D3- کوله کلسیفرول (۵ میلی گرم)، آلفا- توکوفرول (۴۰ میلی گرم)، آسکوربیک اسید (۵۰۰ میلی گرم)، نیاسین (۳۵ میلی گرم)، اتوکسی کوئین (۱۵۰ میلی گرم) و کریر تا ۱۰۰۰ میلی گرم است.

پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت بر حسب درصد ماده خشک است و محاسبه کربوهیدرات بر حسب رابطه (پروتئین + چربی + خاکستر + رطوبت) - ۱۰۰ و محاسبه انرژی ناخالص بر حسب کیلوکالری بر گرم جیره از رابطه حاصل ضرب مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۵/۶۵ kcal) و چربی (۹/۴۵ kcal) و کربوهیدرات (۴/۱۱ kcal) تعیین گردید (NRC, 1993).

ترکیب شیمیایی جیره غذایی

ترکیب شیمیایی جیره غذایی شامل رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر طبق روش استاندارد انجام شد (AOAC, 2005). میزان رطوبت با استفاده از دستگاه آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، میزان پروتئین خام با روش کج‌لدال، میزان چربی خام با استفاده از روش Bligh و Dyer (۱۹۵۹) با دستگاه سوکسله و میزان خاکستر نیز در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید.

تهیه عصاره آنزیمی، سنجش فعالیت آنزیم و پروتئین محلول

در این آزمایش برای تهیه عصاره آنزیمی، ابتدا کالبد شکافی جهت جداسازی معده، روده و ضمائم پیلوریک در حضور یخ انجام شد. سپس نمونه‌های معده، روده و ضمائم پیلوریک هر کدام با ترازو با دقت ۰/۰۱ به طور جداگانه وزن شد و با بافر ۵۰ میلی مولار تریس- HCl، pH = ۸/۰ (حاوی ۱۰ میلی مولار CaCl_2 و ۵/۰ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۲۰ (وزن به حجم) مخلوط شد و با استفاده از دستگاه هموژنایزر (مدل Hand Held WT130) عمل همگن‌سازی در حضور یخ به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm انجام شد. بعد از همگن‌سازی، مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی جهت سنجش فعالیت آنزیم و پروتئین محلول انتخاب گردید (Nayak et al., 2003). برای سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی از کازئین ۱ درصد به عنوان سوبسترا استفاده شد و میزان جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد (Walter, 1984). فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از سوبسترای BAPNA^۱ سنجش گردید و جذب پارا نیتروآنیلید رهاسازی شده در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت گردید (Erlanger et al., 1961). فعالیت آنزیم پپسین با استفاده از سوبسترای هموگلوبین و با روش Anson (۱۹۳۸) سنجش شد و میزان جذب تیروزین رهاسازی شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. در تمام سنجش‌ها برای نمونه شاهد از آب مقطر به جای نمونه آنزیمی استفاده گردید و قرائت نوری نمونه‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. جهت تعیین فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد مطالعه، میزان پروتئین محلول در معده، روده و ضمائم پیلوریک با روش Lowry و

همکاران (۱۹۵۱) سنجش گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱ mg/ml به عنوان استاندارد استفاده گردید.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید. از آزمون‌های کولموگروف اسمیرنوف و Levene بترتیب برای بررسی نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها استفاده شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین شاخص‌های رشد و فعالیت‌های آنزیمی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. میزان بهینه IPL 68 در جیره غذایی ماهی قزل آلا رنگین کمان بر مبنای شاخص افزایش وزن بدن با روش نمودار خط شکسته (Broken-line) تحت نرم‌افزار Graph pad prism تعیین گردید.

نتایج

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد در جدول ۲ ارائه شده است. تاثیر IPL-68 بر وزن نهایی و میزان افزایش وزن بدن نشان داد بترتیب بیشترین و کمترین آنها مربوط به جیره C و E بود، بطوریکه در جیره C نسبت به سایر جیره‌های آزمایشی افزایش معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$). همچنین با افزایش درصد جایگزینی تا ۵۰ درصد (جیره C) شاخص نرخ رشد نسبی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$)، ولی با افزایش جایگزینی تا سطوح ۷۵ درصد (جیره D) و ۱۰۰ درصد (جیره E) کاهش معنی‌داری در میزان آن مشاهده شد ($p < 0/05$). میزان ضریب تبدیل غذایی با افزایش جایگزینی تا ۵۰ درصد کاهش معنی‌داری یافت، ولی با افزایش تا سطوح ۷۵ و ۱۰۰ درصد میزان آن افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). بیش‌ترین میزان کارایی چربی و پروتئین در جیره C و کمترین میزان آن در جیره E مشاهده گردید که بین جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/05$). بیشترین و کمترین میزان نسبت کارایی غذا بترتیب مربوط به جیره‌های آزمایشی C و E بود و بین جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$). میزان نرخ بقاء در ماهیان تحت آزمایش با افزایش جایگزینی IPL-68 اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با جیره شاهد نشان نداد ($p > 0/05$).

^۱ -Na-Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide hydrochloride

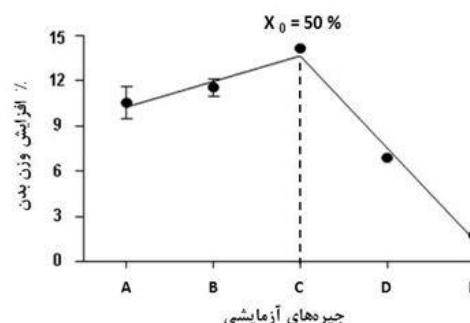
جدول ۲: شاخص‌های رشد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشیTable 2: Growth performance of rainbow trout (*O. mykiss*) fry fed with experimental diets.

شاخص‌های رشد					جیره
					E D C B A
وزن اولیه ماهی (گرم)	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵	۲/۵۱±۰/۵۵
وزن ثانویه ماهی (گرم)	۴/۲۹±۰/۱۳ ^e	۹/۴۲±۰/۲۶ ^d	۱۶/۶۸±۰/۲۸ ^a	۱۴/۳۶±۰/۵۷ ^b	۱۳/۰۵±۱/۰۴ ^c
افزایش وزن بدن (گرم)	۱/۷۸±۰/۱۳ ^e	۶/۹۱±۰/۲۶ ^d	۱۴/۱۷±۰/۲۸ ^a	۱۱/۸۵±۰/۵۷ ^b	۱۰/۵۵±۱/۰۴ ^c
نرخ رشد نسبی	۷۱/۰۴±۴/۸۱ ^e	۲۷۵/۴۳±۱۰/۳۹ ^d	۵۶۴/۸۰±۱۱/۲۳ ^a	۴۷۲/۱۱±۲۲/۸۲ ^b	۴۲۰/۱۸±۴۱/۷۸ ^c
ضریب تبدیل غذایی	۲/۰۷±۰/۲۷ ^a	۱/۱۹±۰/۰۶ ^b	۰/۷۶±۰/۰۱ ^d	۰/۸۹±۰/۰۴ ^c	۰/۹۴±۰/۰۱ ^c
نرخ بقا	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a	۱۰۰ ^a
نسبت کارایی غذا	۰/۴۸±۰/۰۶ ^d	۰/۸۴±۰/۰۴ ^c	۱/۳۱±۰/۰۱ ^a	۱/۱۱±۰/۰۵ ^b	۱/۰۶±۰/۰۶ ^b
نسبت کارایی چربی	۰/۰۸±۰/۰۰۵ ^e	۰/۳۲±۰/۰۱۲ ^d	۰/۶۶±۰/۰۱۳ ^a	۰/۵۵±۰/۰۲۶ ^b	۰/۴۹±۰/۰۴۸ ^c
نسبت کارایی پروتئین	۰/۰۴±۰/۰۰۳ ^e	۰/۱۵±۰/۰۰۶ ^d	۰/۳۱±۰/۰۰۶ ^a	۰/۲۶±۰/۰۰۱ ^b	۰/۲۳±۰/۰۴۸ ^c

حروف کوچک غیر مشترک در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد. (Mn ± SD, n = ۳, α = ۰/۰۵)

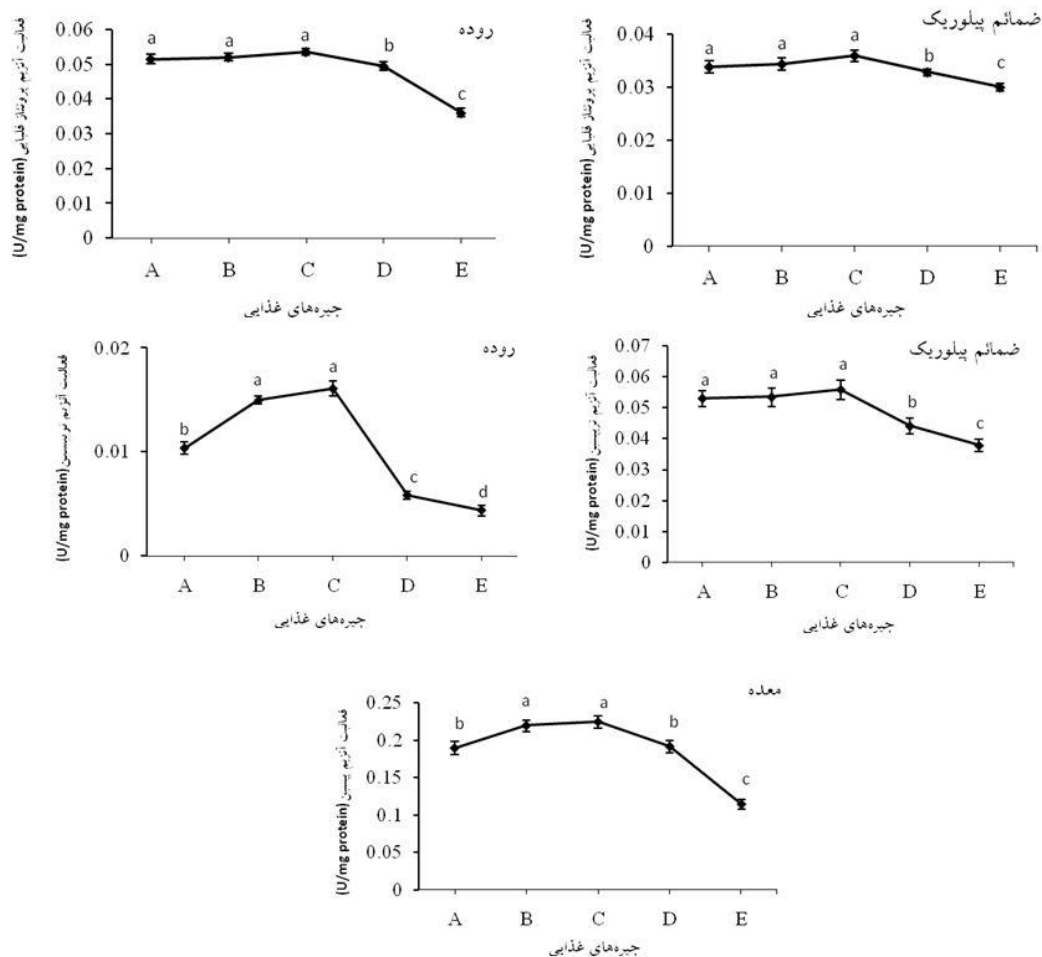
نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در معده، ضمام پیلوریک و روده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در شکل ۲ نشان داده شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پپسین در معده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی C و کمترین آن در ماهیان تغذیه شده با جیره E مشاهده شد بطوریکه میزان فعالیت آن در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی B اختلاف معنی‌داری نداشت، ولی با سایر جیره‌ها این اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/05$). بالاترین میزان فعالیت آنزیم پروتئاز قلیایی در ضمام پیلوریک و روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی C مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با جیره‌های A و B مشاهده نشد در حالیکه با جیره D و E اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). فعالیت آنزیم تریپسین در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی نشان داد بیشترین میزان آن در ضمام پیلوریک و روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی C بود بطوریکه در ضمام پیلوریک با جیره‌های A و B اختلاف معنی‌داری نداشت ولی با جیره‌های D و E اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$). همچنین میزان فعالیت آنزیم تریپسین روده در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی C اختلاف معنی‌داری را با جیره B نداشت ($p > 0/05$) ولی با سایر جیره‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($p < 0/05$).

میزان بهینه جایگزینی آرد ماهی بوسیله IPL-68 در جیره غذایی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر مبنای افزایش وزن بدن بر اساس نمودار خط شکسته (broken-line) حدود ۵۰ درصد برآورد گردید (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار خط شکسته افزایش وزن بدن برای بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با سطوح مختلف IPL-68. X0 نقطه تلاقی دو خط می‌باشد که حد بهینه جایگزینی را نشان می‌دهد.

Figure 1: Broken line curve of body weight gain for rainbow trout (*O. mykiss*) fry fed with different levels of IPL-68. X0 is the point of intersection of the two lines represents the optimal replacement.



شکل ۲: فعالیت آنزیم های پروتئازی (پروتئاز قلیایی، تریپسین و پپسین) در ضمامم پیلوریک، روده و معده بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*O. mykiss*) تغذیه شده با جیره های آزمایشی. حروف کوچک غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار در فعالیت آنزیم می باشد (میانگین ۳ تکرار $\pm$ انحراف معیار : $p < 0.05$).

Figure 2: Protease enzymes activity (alkaline protease, trypsin and pepsin) from pyloric caeca, intestine and stomach in rainbow trout (*O. mykiss*) fry fed with experimental diets. Different lower case indicates a significant difference in enzyme activity ($Mn \pm Sd$, $n=3$, $p<0.05$).

داشت. میزان پروتئین تک یاخته در بین انواع میکروارگانیسم ها متغیر بوده بطوریکه در مخمرها ۵۵-۵۰ درصد، باکتریها ۸۲-۸۰ درصد و در جلبکها ۷۳-۴۵ درصد تخمین زده می شود که نسبت به منابع گیاهی مانند سویا بالاتر و از ترکیب اسید آمینه مناسبی برخوردار می باشد و حاوی ۳ درصد چربی، ۶ درصد فیبر، ۱۲ درصد خاکستر، ۲۰-۱۲ درصد نوکلئوتید و ۱۹ KJ/g انرژی هستند (Oliva-Teles *et al.*, 2015; Wadhwa and Bakshi, 2016). بر اساس مطالعه Oliva-Teles و همکاران

بحث

استفاده از IPL 68 به عنوان یک منبع پروتئین باکتریایی در جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان نشان داد که جایگزینی تا سطح ۵۰ درصد به جای آرد ماهی شاخص های رشد شامل افزایش وزن بدن، نرخ رشد نسبی، نرخ بقاء، ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی پروتئین، نسبت کارایی چربی و نسبت کارایی غذا را به طور معنی داری افزایش داد ولی جایگزینی بیش از ۵۰ درصد کاهش معنی داری بر شاخص های مذکور

پروتئین، ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن بدن اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ولی درصد بقاء در ماهیان تغذیه شده با ۱۰ درصد به طور معنی‌داری بالاتر از گروه تغذیه شده با کنجاله سویا بود. این محققین پیشنهاد نمودند افزایش وزن پائین بدن در ماهیان تغذیه شده با این منبع پروتئینی می‌تواند عمدتاً به دلیل مصرف کمتر غذا باشد که می‌توان با افزایش قابلیت خوش خوراکی غذا از طریق مواد افزودنی سطوح بالاتری از آن را در جیره استفاده نمود. Askbrandt و Kiessling (۱۹۹۳) کاهش میزان مصرف غذا و وزن بدن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی ۴ درصد پروتئین باکتری *Corynebacterium glutamicum* مشاهده کردند ولی مطالعاتی نیز نشان می‌دهد استفاده از پروتئین باکتریایی در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی آزاد اقیانوس اطلس تاثیری بر میزان مصرف غذا نداشته است. (Aas et al., 2006 a, b). احتمالاً نوع باکتری، فرایند تهیه پروتئین مانند محیط کشت و همچنین اقلام غذایی مختلف مورد استفاده در آزمایش‌ها می‌تواند بر میزان مصرف غذا تأثیرگذار باشد (Overland et al., 2013; Hardy et al., 2018). برای مثال، Aas و همکاران (۲۰۰۶ b) از پروتئین باکتری تا سطح ۲۷ درصد در جیره غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده نمودند و کاهش در وزن بدن ماهیان تغذیه شده مشاهده نشد بطوریکه جیره شاهد و جیره حاوی پروتئین باکتری بترتیب حاوی ۶۳/۵ و ۴۰/۷ درصد پودر ماهی بودند. در حالیکه در مطالعه Kaushik و Luquet (۱۹۸۰) که از جیره حاوی ۳۵ درصد پروتئین باکتری استفاده کردند، کاهش در وزن ماهیان مشاهده شد و جیره شاهد حاوی ۳۵ درصد پودر ماهی بود. در مطالعه حاضر، میزان بقاء در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی پودر ماهی و پروتئین IPL اختلاف معنی‌داری نداشت و ۱۰۰ درصد بود. مطالعات نشان می‌دهند استفاده از منابع پروتئین میکروبی از طریق کاهش آماس معده و روده میزان بقاء را در ماهیان تغذیه شده افزایش می‌دهد (Banerjee et al., 2000; Romarheim et al., 2011; Laranja et al., 2014).

نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در مطالعه حاضر نشان داد با افزایش جایگزینی IPL 65 به جای پودر ماهی تا سطح درصد ۵۰ میزان فعالیت افزایش یافت ولی در سطح بالاتر از ۵۰ درصد کاهش فعالیت مشاهده شد. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند منابع میکروبی می‌توانند در دستگاه گوارش کلونیزه شده و به بهبود عملکرد گوارش و فیزیولوژی روده کمک

(۲۰۱۵) منابع پروتئینی میکروبی می‌توانند تا سطوح ۵۵-۳۰ درصد آرد ماهی در جیره‌ها استفاده شوند. از مهمترین عواملی که استفاده از پروتئین تک یاخته بویژه نوع باکتریایی را به عنوان منبع پروتئینی در جیره‌های غذایی محدود می‌کند، میزان بالای اسید نوکلئیک و محدودیت اسیدهای آمینه گوگردی مانند متیونین و سیستئین است (Kurbanoglu, 2001; Dhevendran et al., 2013; Feedipedia, 2015). نتایج مطالعه آلبوغیش و همکاران (۱۳۹۴) در استفاده از مخمر نانویی و سویا به جای پودر ماهی در جیره غذایی بچه ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) نشان داد افزایش جایگزینی تا میزان ۱۰۰ درصد باعث بهبود نرخ بقاء و افزایش وزن بدن گردید ولی میزان ضریب تبدیل غذایی و کارایی پروتئین بترتیب افزایش و کاهش یافت. Dharmaraj و Dhevendran (۲۰۱۴) پروتئین تهیه شده از باکتری استرپتومایسیس را در جیره غذایی ماهی دم شمشیری (*Xiphophorus helleri*) استفاده نموده و نتایج مطالعه آنها نشان داد ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ درصد پروتئین باکتری افزایش معنی‌داری بر شاخص‌های نسبت کارایی غذا، وزن نهایی و نرخ رشد ویژه در مقایسه با گروه شاهد داشتند. همچنین در ماهی تیلپیا (*Oreochromis mossambicus*) تغذیه شده با پروتئین تک یاخته حاصل از گیاه آزولا میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی بهتری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید (Manju and Dhevendran, 2002). De و همکاران (۲۰۱۸) پروتئین حاصل از تخمیر اقلام گیاهی در حضور باکتری باسیلوس را در جیره غذایی بچه ماهیان کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) به جای آرد ماهی بررسی نموده و یافته‌ها نشان داد جایگزینی تا سطح ۷۵ درصد تاثیر منفی بر شاخص‌های نرخ رشد، ضریب تبدیل غذایی، کارایی پروتئین و درصد بقاء نداشت. Manuel و Edoghotu (۲۰۱۷) از پروتئین حاصل از مخمر آبجو به جای آرد ماهی در سطوح ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ درصد در جیره غذایی گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) استفاده کرده و نتایج نشان داد میزان نرخ رشد ویژه و پروتئین بدن در ماهیان تغذیه شده با پروتئین میکروبی در سطح ۶۰ درصد نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. Hardy و همکاران (۲۰۱۸) از پروتئین تک یاخته تولید شده توسط باکتری *Methylobacterium extorquens* در سطوح ۵ و ۱۰ درصد به جای کنجاله سویا در جیره غذایی ماهی انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کردند و بررسی نشان داد بین شاخص‌های نرخ رشد ویژه، نسبت کارایی

نمایند (Merrifield et al., 2010; Nayak, 2010). استفاده از نوکلئوتید در جیره‌های غذایی می‌تواند منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند پپسین و همچنین فعالیت سوکروز مخاط روده شود که بر اساس مطالعات مذکور پیشین، پروتئین باکتریایی حاوی نوکلئوتید است (Li et al., 2007). آنزیم‌های گوارشی کارایی استفاده از غذا را افزایش داده و شناسایی آنها می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه ظرفیت گوارش ماهیان جهت هیدرولیز پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌های اقلام غذایی فراهم نماید بطوریکه بتوان توانایی یک گونه را در استفاده از مواد مغذی مختلف بر اساس الگوی آنزیم‌های گوارشی آن پیش‌بینی نمود (Lemieux et al., 1999). در مطالعه Wache و همکاران (۲۰۰۶) اثرات تغذیه‌ای مخمر *Saccharomyces cerevisiae* بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی بررسی شده و نتایج نشان داد فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، گلوتامیل ترنس پپتیداز و لوسین آمینو پپتیداز بعد از گذشت ۲۰ روز از غذادهی افزایش یافته بود. تغذیه ماهی آزاد اقیانوس اطلس با ۳ مخمر *Candida* *Kluyveromyces marxianus* و *Saccharomyces cerevisiae* بعنوان منبع پروتئین منجر به افزایش سلول‌های اپیتلیال و در نهایت افزایش وزن دستگاه گوارش گردید که این امر می‌تواند با افزایش ترشح مخاط روده و بهبود عملکرد دفاعی آن از طریق تعدیل بار میکروبی و حفاظت در برابر عفونت باکتریایی باشد (Overland et al., 2013). در مطالعه Patra و Tewary (۲۰۱۱) از مخمر نانوائی در تغذیه ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) استفاده شده و نتایج نشان داد میزان فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در ماهیان تغذیه شده افزایش یافته بود. Heidarieh و همکاران (۲۰۱۲) استفاده از *Saccharomyces cerevisiae* در تغذیه بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان بررسی نموده و نتایج آنها نشان داد ماهیان تغذیه شده با پروتئین مذکور باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم تریپسین شده است. بنظر می‌رسد غذای حاوی پروتئین تک یاخته از طریق تعدیل فعالیت آنزیمی به عملکرد رشد ماهیان کمک می‌نماید.

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، جیره آزمایشی C بیشترین میزان شاخص‌های رشد شامل افزایش وزن بدن، نرخ رشد نسبی، نسبت کارایی پروتئین، نسبت کارایی چربی و نسبت کارایی غذا را داشت و پایین‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی نیز در جیره آزمایشی C مشاهده شد. بیشترین میزان

فعالیت آنزیم‌های تریپسین و پروتئاز قلیایی از ضمائم پیلوریک و روده و آنزیم پپسین معده در ماهیان تغذیه شده با جیره آزمایشی C مشاهده شد که نسبت به جیره‌های غذایی حاوی ۷۵ و ۱۰۰ درصد IPL68 اختلاف معنی‌داری نشان داد.

منابع

آلبوغیش، م.، محمدی آذر، ح.، یآوری، ذاکری، م.، ۱۳۹۴. اثر جایگزینی پودر ماهی با کنجاله سویا و مخمر نانوائی بر عملکرد رشد و تغذیه ماهیان جوان بنی *Mesopotamichthys sharpeyi*. مجله پژوهش‌های جانوری، ۲۸(۲): ۱۴۵-۱۳۶.

بی‌بی‌کم، ص.، عابدیان، ع.، یونسی، ح.، ۱۳۸۹. تولید پروتئین تک‌یاخته با استفاده از کشت باکتری *Lactobacillus acidophilus* و قارچ *Aspergillus niger* از پساب کارخانه آرد ماهی کیلکا (استیک‌واتر). مجله علمی شیلات ایران، ۱۹(۴): ۳۲-۲۱.

زمانی، ع.، حاجی مرادلو، ع.، مدنی، ر.، جوهری، ع.، کلباسی، م.ر.، فرهنگی، م.، ۱۳۸۵. مقایسه فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی در معده، ضمائم پیلوریک و روده ماهیان دیپلوئید و تریپلوئید ماده قزل آلائی رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۱۵(۲): ۳۶-۲۹.

سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۶. سالنامه آماری شیلاتی ایران، معاونت طرح و برنامه، سازمان شیلات ایران، تهران، ۶۴ ص. موحد راد، ف.، حاجی مرادلو، ع.، زمانی، ع.، کلنگی، ح.، ۱۳۹۷. بررسی اثر جایگزینی پودر ماهی با آکوپرو (کنجاله سویای فرآوری شده) بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۲): ۵۹-۴۷.

Aas, T. S., Grisdale-Helland, B., Terjesen, B. F. and Helland, S. J., 2006 a. Improved growth and nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing a bacterial protein meal. *Aquaculture*, 259: 365-376. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.05.032

- Aas, T. S., Hatlen, B., Grisdale-Helland, B., Terjesen, B. F., Bakke-McKellep, A. M. and Helland, S. J., 2006 b. Effects of diets containing a bacterial protein meal on growth and feed utilisation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261: 357–368. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.07.033
- AES (Agriculture and Environmental Services), 2013. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. World Bank Report Number 83177-GLB.Pp 102. <http://www.fao.org/3/i3640e/i3640e.pdf>
- Alvarez, R. and Enriquez, A., 1988. Nucleic acid reduction in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29 (2–3): 208–210. DOI:10.1007/BF01982903
- Anson, M.L., 1938. The estimation of Pepsin, Trypsin, Papain and Cathepsin with Hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22: 79–89. DOI: 10.1085/jgp.22.1.79
- AOAC., 2005. Official Method 950.89 Horwitz, W., Latimer, G. (Eds). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Banerjee, S., Azad, S. A., Vikineswary, S., Selvaraj, O. S. and Mukherjee, T. K., 2000. Phototrophic bacteria as fish feed supplement. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 13: 991–994. DOI:10.5713/ajas.2000.991
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911–917. DOI: 10.1139/o59-099
- De, D., Ghoshal, T.K., Biswas, G., Mukherjee, S., Kumar, S., Anand, P.S.S., Raja, R.A. and Vijayan, K.K., 2018. Evaluation of growth performance in *Mugil cephalus* L. juveniles fed diets incorporated with fermented plant feedstuffs replacing fishmeal or diets supplemented with fish gut bacteria. *Journal of Food Processing and Technology*, 9(4): 728 – 736. DOI: 10.4172/2157-7110.1000728
- Deguara, S., Jauncey, K. and Agius, C., 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*, 62:1033–1043. DOI:10.1046/j.1095-8649.2003.00094.x
- Dharmaraj, S. and Dhevendaran, K., 2014. Effect of Actinobacteria as a single cell protein on growth performance of *Xiphophorus helleri*. *International Journal of Aquatic Biology*, 3(1):19–24. DOI: 10.22034/ijab.v3i1.42
- Dhevendaran, K., Karthikeyan, S. and VedhaHari, B.N., 2013. Microbial single cell protein (scp) for the growth and food conversion efficiency of selected ornamental fish, *Xyphophorus helleri*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 166–169.
- Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archive Biochemistry Biophysics*, 95: 271–278.
- Faust, U., 1987. Production of microbial biomass. In: *Fundamentals of Biotechnology*. VCH Publishers, Weinheim, pp. 601–622.
- Feedipedia., 2015. Single cell protein. Animal Feed Resources Information System, —INRA CIRADAFZ and FAO© 2012–2015.
- Gatlin III, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Kroghdahl, A., Nelson, R. and Overturf, K., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38(6): 551–579. DOI:10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x

- Hamza, N., Mhetli, M., Khemis, I. B., Cahu, C. and Kestemont, P., 2008.** Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture*, 275(1): 274-282. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.01.014
- Hardy, R.W., Patro, B., Pujol-Baxley, C., Marx, C.J. and Feinberg, L., 2018.** Partial replacement of soybean meal with *Methylobacterium extorquens* single-cell protein in feeds for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 49(6): 2218-2224. DOI:10.1111/are.13678
- Heidarieh, M., Mirvaghefi, A.R., Akbari, M., Sheikhzadeh, N., Kamyabi-Moghaddam, Z., Askari, H. and Shahbazfar, A.A., 2012.** Evaluations of Hilyses™, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, enzymatic activities and gastrointestinal structure. *Aquaculture Nutrition*, 19(3): 343-348. DOI:10.1111/j.1365-2095.2012.00973.x
- Kaushik, S.J. and Luquet, P., 1980.** Influence of bacterial protein incorporation and of sulphur amino acid supplementation to such diets on growth of rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson. *Aquaculture*, 19: 163-175. DOI:10.1016/0044-8486(80)90017-4
- Kiessling, A. and Askbrandt, S., 1993.** Nutritive value of two bacterial strains of single-cell protein for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 109: 119-130. DOI:10.1016/0044-8486(93)
- Krogdahl, A., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S. and Bakke, A.M., 2010.** Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41(3): 333-344. DOI:10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x
- Kurbanoglu, E.B., 2001.** Production of single-cell protein from ram horn hydrolysate. *Turkish Journal of Biology*, 25(4): 371-377.
- Laranja, J. L. Q., Ludevese-Pascual, G. L., Amar, E. C., Sorgeloos, P., Bossier, P., and De Schryver, P., 2014.** Poly-b-hydroxybutyrate (PHB) accumulating *Bacillus* spp. improve the survival, growth and robustness of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) postlarvae. *Veterinary Microbiology*, 173: 310-317. DOI:10.1016/j.vetmic.2014.08.011
- 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
- Li, P., Lawrence, A. L., Castille, F. L. and Gatlin, D. M., 2007.** Preliminary evaluation of a purified nucleotide mixture as a dietary supplement for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 38: 887-890. DOI:10.1111/j.1365-2109.2007.01761.x
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Manju, K.G. and Dhevendaran, K., 2002.** Influence of *Azolla* sp. incorporated feeds on the growth, conversion efficiency and gut flora of *O. mossambicus*. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 17 (3): 221-230.
- Manuel, B.F.G. and Edoghotu, J. A., 2017.** Wheat Bran Grown Brewer's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as Feed for *Clarias gariepinus* Fingerlings: Carcass Analysis and

- Growth Performance. *Journal of Natural Sciences Research*, 7(2): 75-80.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bogwald, J., Castex, M. and Ringo, E., 2010.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18. DOI:10.1016/j.aquaculture.2010.02.007
- Nasseri, A., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. and Ghasemi, Y., 2011.** Single cell protein: production and process. *American Journal of Food Technology*, 6(2): 103-116. DOI:10.3923/ajft.2011.103.116
- Nayak, J., Viswanathan Nair, P., Ammu, K. and Mathew, S., 2003.** Lipase activity in different tissues of four species of fish: rohu (*Labeo rohita* Hamilton), oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus), mullet (*Liza subviridis* Valenciennes) and Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta* Cuvier). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(11): 1139-1142. DOI:10.1002/jsfa.1515
- Nayak, S.K., 2010.** Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish and shellfish immunology*, 29(1) 2-14. h DOI:10.1016/j.fsi.2010.02.017
- NRC (National Research Council), 1993.** Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington DC, USA.
- Oliva-Teles, A., Enes, P. and Peres, H., 2015.** Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. In *Feed and feeding practices in aquaculture* (pp. 203-233). Woodhead Publishing.
- Olsen, R.L. and Hasan, M.R., 2012.** A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science and Technology*, 27(2):120-128. DOI:10.1016/j.tifs.2012.06.003
- Overland, M., Karlsson, A., Mydland, L.T., Romarheim, O.H. and Skrede, A., 2013.** Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 402-403:1-7.
- Romarheim, O. H., Overland, M., Mydland, L. T., Skrede, A. and Landsverk, T., 2011.** Bacteria grown on natural gas prevents soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon. *The Journal of Nutrition*, 141: 124-130. DOI:10.3945/jn.110.128900
- SOFIA., 2018.** The State of the World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and aquaculture Department, Rome.227P.
- Sultana, S., Ali, M.E. and Ahamad, M.N.U., 2018.** Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. In *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods* (pp. 215-239). Wood head Publishing.
- Tacon, A.G.J. and Metian, M., 2008.** Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trend and future prospects. *Aquaculture*, 285: 146-152. DOI:10.1016/j.aquaculture.2008.08.015Get
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R. and Metian, M., 2011.** Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: Trends and prospects. In: *FAO fisheries technical paper*, Vol. 564. Rome: FAO
- Tewary, A. and Patra, B.C., 2011.** Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth promoter and immunomodulator in *Labeo rohita* (Ham.). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 2(1):1-7. DOI:10.4172/2155-9546.1000109

- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M.A., Flores-Ibarra, M., Alvarez Gonzalez, C.A. and Lopez, L.M., 2017.** Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*, 48(8): 4038-4057. DOI:10.1111/are.13225
- Wache, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbe, L. and Quentel, C., 2006.** Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258(1-4): 470-478. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.04.002
- Wadhwa, M. and Bakshi, M.P.S., 2016.** Application of waste-derived proteins in the animal feed industry. In *Protein Byproducts* (pp. 161-192). Academic press.
- Walter, H.E., 1984.** Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. Ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim. 270-277.

Assessment of growth performance and proteolytic enzymes activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry fed by different levels of single cell protein

Zamani A.^{1*}; Khajavi M.¹

*a.zamani@malayeru.ac.ir

1- Fisheries Department, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran.

Abstract

The present study was conducted to evaluate the effect of fish meal replacement with single cell protein on growth performance and proteolytic enzymes activity of pepsin, trypsin and alkaline protease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry (weight: 2.51 ± 0.55 g) for 6 weeks. Five experimental diets were prepared with replacement levels of 0 (A), with 25% (B), 50% (C), 75% (D) and 100% (E) of fish meal with microbial protein as isonitrogenous and isoenergetic. Parameters of body weight gain, relative growth rate, protein, lipid and feed efficiency ratio in diet C were significantly the higher than other treatments ($p < 0.05$), while feed conversion ratio was shown the highest and the lowest values in diet C and E, respectively, with a significant difference than those from other treatments ($p < 0.05$). The survival rate was 100 % in the diets. The highest activity of trypsin and alkaline protease enzymes from pyloric caeca and intestine was observed in diet C, which showed a significant difference compared to D and E diets ($p < 0.05$). Also, pepsin had significantly the highest activity in C diet than that from other diets exception for B diet ($p < 0.05$). The findings of growth performance and pepsin, trypsin and alkaline protease activity were revealed the diet containing 50% single cell protein could be appropriate for rainbow trout growth.

Keywords: Fish meal, Single cell protein, Protease, Growth performance, *Oncorhynchus mykiss*

*Corresponding author