

Effects of adding porcine trypsin enzyme supplement to the diet of common carp (*Cyprinus carpio*) on growth, body composition, blood biochemical indices, and intestinal enzyme activity

Khosravanizadeh, A.^{1*}, Rahdari, A.A.¹, Khandan Barani, H.¹

1- Department of Aquatic sciences, Hamoun International Wetland Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

Received: 5 January 2025

Accepted: 14 March 2025

Abstract

Introduction: The global surge in population has intensified the demand for protein sources, particularly from aquaculture. While fish farming has seen significant growth, challenges such as resource constraints and escalating production costs persist. This study was designed to evaluate the efficacy of dietary supplementation with porcine trypsin enzyme in enhancing growth performance and improving digestive system functionality in common carp (*Cyprinus carpio*).

Materials and Methods: A total of 120 common carp, averaging 15.45 ± 0.12 g in initial body weight, were randomly allocated into four experimental groups. The fish were fed dietary regimens containing varying levels of trypsin (0.01%, 0.02%, and 0.04%) over a period of eight weeks. Subsequently, various growth parameters, blood biochemical indices, and intestinal enzyme activity were measured.

Results and Discussion: The results demonstrated that the inclusion of trypsin in the diet significantly enhanced growth performance, leading to increased body weight and improved feed conversion ratio ($p < 0/05$). The optimal concentration of trypsin was determined to be 0.02%. While dietary supplementation with the enzyme did not significantly affect the proximate composition of the fish ($p > 0/05$), it led to a slight increase in trypsin activity in the intestine ($p > 0/05$). Finally, the blood biochemical parameters, including glucose, total protein, albumin, globulin, and blood urea nitrogen, did not exhibit significant differences among the various treatment groups ($p > 0/05$).

Conclusion: The findings of this study demonstrated that dietary supplementation with trypsin can effectively enhance the growth performance of common carp. Furthermore, it may serve as a sustainable strategy for optimizing aquaculture production and reducing feed costs.

Keywords: Growth, Feed Conversion Ratio, Trypsin, Protein, Digestion, Gastrointestinal System

* *Corresponding Author: khosravani.ali@uoz.ac.ir*

"مقاله پژوهشی"

اثرات افزودن مکمل آنزیمی تریپسین خوکی به جیره کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بر رشد، ترکیبات لاشه، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت آنزیمی روده

علی خسروانی زاده^{۱*}، عبدالعلی راهداری^۱، هاشم خندان بارانی^۱

۱- گروه علوم آبزیان، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

چکیده

این مطالعه باهدف بررسی اثربخشی مکمل آنزیمی تریپسین خوکی در جیره غذایی ماهی کپور معمولی جهت بهبود رشد ماهی و ارتقا عملکرد دستگاه گوارش انجام شد. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن (۱۵/۴۵±۰/۱۲) گرم به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. ماهیان با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف تریپسین (۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد) به مدت هشت هفته تغذیه شدند و پارامترهای مختلف رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت آنزیمی روده در آن‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که استفاده از تریپسین در جیره به‌طور قابل توجهی عملکرد رشد را بهبود می‌بخشد و به افزایش وزن بدن و بهبود ضریب تبدیل غذایی منجر می‌شود ($p < 0/05$). غلظت بهینه تریپسین ۰/۰۲ درصد تعیین شد. درحالی‌که مکمل‌سازی جیره با آنزیم تأثیر قابل توجهی بر ترکیب شیمیایی بدن ماهی نداشت ($p > 0/05$)، منجر به افزایش جزئی فعالیت تریپسین در روده شد ($p > 0/05$). پارامترهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، پروتئین کل، آلومین، گلوبولین و نیتروژن اوره‌ای خون در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که مکمل‌سازی جیره غذایی با تریپسین می‌تواند به‌طور مؤثری عملکرد رشد ماهی کپور معمولی را بهبود بخشد ($p < 0/05$) و به‌عنوان یک استراتژی پایدار برای بهینه‌سازی تولید آبزیان و کاهش هزینه‌های خوراک برجسته شود.

کلمات کلیدی: رشد، ضریب تبدیل، تریپسین، پروتئین، هضم، دستگاه گوارش

مقدمه

افزایش بی‌سابقه جمعیت جهانی در سال‌های اخیر و نیاز به تأمین غذا و به‌خصوص پروتئین برای این جمعیت عظیم دغدغه مهمی برای جامعه جهانی به حساب می‌آید (Kumar *et al.*, 2023; Saeed *et al.*, 2023). پیش‌بینی‌های صورت گرفته در این زمینه گواه آن است که این چالش در سال‌های آتی جدی‌تر نیز خواهد شد (Wilfart *et al.*, 2013; Helmy *et al.*, 2022). تأمین و تولید فرآورده‌های آبزیان به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین منابع تأمین پروتئین انسان‌ها در سال‌های اخیر رشد چشمگیری داشته به‌نحوی که در ۷۰ سال گذشته ۱۹۵ میلیون تن افزایش تولید در این بخش قابل مشاهده است (FAO, 2022; Zhao *et al.*, 2022).

در ایران نیز هم‌زمان با دیگر نقاط جهان در سال‌های اخیر توجه به تولیدات آبی‌پروری به‌عنوان جایگزینی برای کاهش صید از دریاها به‌شدت مورد اقبال قرار گرفته و در فاصله سال‌های ۱۳۷۹ تا ۱۴۰۲ حدود ۶۳۹۹۳۶ تن افزایش تولید در این بخش گزارش شده است (Statistical Yearbook of Iranian Fisheries, 2024)؛ اما علی‌رغم افزایش میزان تولیدات آبی‌پروری در یک دهه گذشته در نرخ رشد و توسعه این صنعت حدود ۴/۹ درصد کاهش مشاهده می‌شود (FAO, 2022)، که ضرورت بازنگری در مدیریت منابع و اصلاح و بهبود شیوه‌های تولید را می‌طلبد. از همین رو تحقیق و توسعه در مورد انواع شیوه‌های مدیریتی که باهدف غلبه بر محدودیت منابع و نهاده‌های تولید به کار گرفته می‌شوند و زمینه افزایش تولیدات و سوددهی اقتصادی بهتر را فراهم می‌کنند ضرورت دارد (David *et al.*, 2021).

با توجه به اینکه هزینه‌های مربوط به تهیه جیره در فعالیت‌های آبی‌پروری بین ۳۰ تا ۶۰ درصد هزینه‌های تولید را در برمی‌گیرد، مدیریت تغذیه می‌تواند در تحقق اهداف ذکرشده اثرگذاری ویژه‌ای داشته باشد (Khosravanizadeh *et al.*, 2017). در دو دهه گذشته توجه به استفاده از مکمل‌هایی که کارایی آبزیان در هضم جیره‌ها را ارتقا می‌دهند معطوف شده است. از آنجا که آنزیم‌ها در فرآیند هضم و جذب خوراک کلیدی‌ترین نقش را ایفا می‌کنند بهره‌گیری از مکمل‌های آنزیمی در جیره‌های غذایی موضوع تحقیقات متعددی در جهان شده است (Bedford and Partridge, 2010). در این تحقیقات از انواع آنزیم‌های طبیعی و سنتتیک در خوراک آبزیان استفاده شده است، به‌طوری که می‌توان به آنزیم‌های هضم‌کننده کربوهیدرات‌ها نظیر آمیلاز (Kumar *et al.*, 2006) فیتاز (Asadi *et al.*, 2012; Ghadirzadeh *et al.*, 2025)، آنزیم‌های هضم‌کننده چربی‌ها نظیر لیپاز (Özcan and Taşbozan, 2022)، آنزیم‌های هضم پروتئین‌ها نظیر تریپسین (Khosravanizadeh *et al.*, 2017) و همچنین مخلوطی از چند نوع آنزیم مختلف (Shi *et al.*, 2016) اشاره کرد. همچنین علاوه بر عصاره آنزیم‌های طبیعی استخراج شده از جانداران (Dabrowska *et al.*, 1979) و آنزیم‌های سنتتیک، بهره‌گیری از آنزیم‌های موجود در بدن انواع غذاهای زنده، آنزیم‌های گیاهی (Patil and Singh, 2014) و آنزیم‌های میکروبی (Farhangi and Carter, 2007) نیز در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است.

نظر به اینکه گران‌ترین بخش جیره بخش پروتئین آن به حساب می‌آید، در دو دهه گذشته مطالعات گوناگونی با تمرکز بر بهره‌گیری از انواع آنزیم‌های

برای مدت ۱۵ روز با شرایط محیط آزمایشگاه سازگار شدند. (Khosravanizadeh *et al.*, 2017).

جهت انجام این مطالعه از جیره غذایی شرکت سامدانه (گمیشان، ایران) که دربردارنده ۳۵ درصد پروتئین، ۷ درصد فیبر، ۷ درصد چربی و ۱۰ درصد خاکستر بود استفاده شد. در جیره‌های غذایی تیمارهای مختلف، مکمل تریپسین خوکی (EC: 3.4.21.4)، ساخت شرکت سیگما آلدریچ (T4799; USA) در مقادیر صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد استفاده شد (این غلظت‌ها بر اساس مطالعاتی که قبلاً انجام شده بود، انتخاب شد (Kumari *et al.*, 2013; Khosravanizadeh *et al.*, 2013) (جدول ۱). جهت حل نمودن آنزیم از بافری بر پایه سدیم فسفات با میزان اسیدیته ۷/۶ کمک گرفته شد (Khosravanizadeh *et al.*, 2020). آنزیم محلول در بافر بر روی جیره‌ها بر اساس درصدهای ذکر شده در بالا اسپری شد (در مورد جیره شاهد جهت یکسان بودن تمام شرایط بافر بدون آنزیم بر روی جیره این گروه اسپری گردید). به منظور ممانعت از آب‌شویی در جیره‌های تهیه شده، در ادامه بر روی جیره‌های تمام تیمارهای آزمایش مقدار ثابتی از پودر ژلاتین حل شده در آب، اسپری شد (Adelian *et al.*, 2016).

مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در یک دوره ۸ هفته‌ای صورت گرفت. در ابتدای دوره ماهیان به شکل انفرادی زیست‌سنجی شدند و طول و وزن آن‌ها ثبت شد. ماهیان به شکل تصادفی در گروه‌های ۴ گانه (هر گروه آزمایش دارای ۳ تکرار با ۱۰ عدد ماهی بود) توزیع شدند. دمای آب و میزان اسیدیته با کمک دستگاه pH متر (pH Meter L2012, Labtron Co., Iran) و غلظت اکسیژن محلول آب مخازن به کمک

پروتئاز در انواع گونه‌های ماهیان و سخت‌پوستان انجام شده است (Khosravanizadeh *et al.*, 2017)؛ Kakavand *et al.*, 2019؛ Khosravanizadeh *et al.*, 2019؛ Kolkovski *et al.*, 1997؛ Kumari *et al.*, 2025؛ 2013؛ Yousefian *et al.*, 2013؛ Sharma *et al.*, 2013؛ استفاده از این آنزیم‌ها عمدتاً به منظور بهبود استفاده از پروتئین جیره، ارتقای ضریب تبدیل جیره‌هایی که پروتئین کمتری دارند، کاهش هزینه‌های تولید جیره، وسعت بخشیدن به دامنه مواد اولیه مورد استفاده در جیره، غلبه بر عوامل ضد- مغذی و ناسازگار اقلام جیره، کاهش هدررفت مواد مغذی در آب، افزایش بازده اقتصادی، کاهش آلاینده‌های آب، کاهش تولید پساب، کاهش هزینه‌های دفع پساب و کاهش آسیب به محیط‌زیست بوده است. در مطالعه حاضر نیز، نظر به ثبت اثرات مثبت مکمل آنزیمی تریپسین بر پارامترهای مختلف رشد در گونه‌های مختلف آبزیان و اهمیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در توسعه پایدار آبی‌پروری در ایران، بررسی اثرات افزودن این آنزیم پروتئازی به جیره ماهی کپور معمولی بر پارامترهای رشد و شاخص‌های خونی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای اجرای آزمایش ۱۲۰ ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن (۱۲/۴۵±۰/۱۲) (گرم) از مزرعه خصوصی در شهرستان زابل تهیه و به سالن محل اجرای تحقیق در پژوهشگاه تالاب بین‌المللی هامون پژوهشگاه زابل انتقال داده شد. ماهیان پس از انتقال و ضدعفونی در تانک‌هایی با حجم ۲۰۰۰ لیتر، محتوی ۱۵۰۰ لیتر آب و دارای سیستم هوادهی

دستگاه اکسی متر (Hanna AZ 8401, IRAN)

به صورت روزانه سنجش و ثبت گردید.

جدول ۱: جیره‌های مورد استفاده برای تغذیه تیمارهای مختلف

Table 1: Diets used for feeding different treatments

Treatments	Experimental diets
Group 1 (Control)	Basic diet without trypsin
Group 2 (0.01 Trypsin)	Basic diet + 0.01% porcine trypsin
Group 3 (0.02 Trypsin)	Basic diet + 0.02% porcine trypsin
Group 4 (0.04 Trypsin)	Basic diet + 0.04% porcine trypsin

داده‌های به دست آمده از زیست‌سنجی‌ها و همچنین مقدار پروتئین موجود در خوراک و تعیین میزان پروتئین لاشه، پارامترهای رشد نظیر درصد افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی، نرخ رشد ویژه و نرخ بازده پروتئین بر اساس رابطه‌های زیر محاسبه شد (Tacon, 1990).

تغذیه ماهیان در هر تیمار با استفاده از جیره‌های اختصاصی تهیه شده، به مقدار روزانه ۳ درصد از وزن بدن در دو نوبت (ساعت ۹ و ساعت ۱۸) انجام شد. با تکرار زیست‌سنجی ماهیان به فاصله هر دو هفته یک بار، میزان غذای روزانه توزیع شده در هر تانک تصحیح و مجدداً تنظیم می‌شد. در انتهای دوره آزمایش با کمک

$CF = 100 \times \text{طول} / \text{وزن تر} = \text{ضریب چاقی}$

$BWI = (W2 - W1) / W1 \times 100$ درصد افزایش وزن بدن

$SGR = ((\ln W2 - \ln W1) / \text{روز}) \times 100$ دوره پرورش به روز / نرخ رشد ویژه

افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = FCR ضریب تبدیل غذایی

پروتئین مصرفی (گرم) / وزن تولید شده (گرم) = PER نرخ بازده پروتئین

در روابط فوق $W1$ مقدار وزن اولیه و $W2$ مقدار وزن نهایی ماهیان بر اساس گرم است.

در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. تعیین میزان تقریبی رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر در لاشه ماهیان بر اساس دستورالعمل‌های AOAC (۲۰۰۵) صورت گرفت. رطوبت لاشه ماهیان با کمک آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت حذف و با محاسبه اختلاف وزن حاصل از قبل و بعد حضور نمونه در آون

در انتهای دوره آزمایش کل لاشه ۳ ماهی از هر تکرار برای تعیین مقدار تقریبی ترکیبات شیمیایی ماهیان، مورد استفاده قرار گرفت؛ برای این منظور قبل از انجام نمونه برداری غذایی به مدت ۲۴ ساعت قطع و پس از اطمینان از دفع بخش عمده محتویات دستگاه گوارش ماهیان، نمونه‌ها تهیه شد. ماهیان برداشته شده از هر تیمار، زیست‌سنجی شدند و تا زمان انجام آزمایش‌ها

تعیین شد. تعیین پروتئین خام لاشه با سنجش میزان ازت نمونه‌ها در سه مرحله هضم، تقطیر و تیتراسیون با استفاده از دستگاه Kjeldtherm (VAP 40, Gerhardt, Germany) و ضرب مقدار ازت به دست آمده از هر یک گرم ماده خشک در عدد ۶/۲۵ انجام شد. سنجش میزان چربی خام در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سوکسله (SE 416, Gerhardt, Germany) و حلال اتر صورت گرفت. مقدار خاکستر نمونه‌ها پس از سوزاندن آن‌ها در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد کوره الکتریکی، توسط ترازوی دیجیتال تعیین شد (AOAC, 2005).

در انتهای هشتمین هفته آزمایش، از ماهیان هر یک از تیمارها خون‌گیری به عمل آمد. برای این منظور از ۲۴ ساعت قبل از عملیات خون‌گیری، غذادهی به ماهیان قطع شد. پیش از خون‌گیری ماهیان به شیوه غوطه‌وری در حمام ۷۵ قسمت در میلیون اسانس میخک بیهوش شدند، سپس از محل شریان دمی، در انتهای باله مخروطی هر یک از ماهیان با کمک سرنگ استریل ۱/۵ سی‌سی خون گرفته و پس از خارج کردن سوزن در تیوب‌های استریل تخلیه شد. با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (Hettich D-7200, Tuttlingen) به مدت ۱۰ دقیقه (۳۰۰۰ دور در دقیقه) سرم هر یک از نمونه‌های خون جدا و به تیوب‌های جدید تخلیه شد. نمونه‌های سرم پس از برچسب‌گذاری تا زمان انجام آزمایشات تکمیلی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. میزان گلوکز، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، نسبت آلبومین به گلوبولین و نیتروژن اوره‌ای خون (BUN) ماهیان هر یک از تیمارهای آزمایشی با کمک کیت‌های سنجش کلینیکی تجاری (شرکت پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد.

در آخرین روز آزمایش از هر تکرار، ۳ ماهی پس از آسان‌کشی، در مجاورت یخ (جهت حداقل کردن فعالیت‌های آنزیمی ناخواسته) کالبدگشایی شدند. روده ماهیان کشته شده با دقت استخراج، محتوی درون روده‌ها تخلیه و سپس با کمک ترازو، وزن روده‌ها با دقت یک میلی‌گرم اندازه‌گیری شد. با استفاده از دستگاه هموژنایزر و بافر (100 mM Tris-HCl buffer with 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.8) یک محلول کاملاً هموژن از نمونه‌های مذکور آماده شد. محلول‌های به دست آمده از مرحله قبل برای ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفتند و در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ فاز روئی نمونه‌ها با دقت برداشته شد و از آن برای تعیین میزان فعالیت آنزیم تریپسین بهره گرفته شد (Furné et al., 2008). میزان فعالیت آنزیم تریپسین روده ماهیان با بهره‌گیری از شیوه Erlanger و همکاران (۱۹۶۱) و سوستر BAPNA (α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide-) تعیین شد؛ برای این منظور ابتدا ۴۳/۵ میلی‌گرم از سوستر BAPNA در ۱ میلی‌لیتر از Dimethylsulphoxide (DMSO) حل گردید، محلول به دست آمده با بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار (CaCl₂.2H₂O ۰/۰۲ مولار، pH=۷/۵) رقیق و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلولی متشکل از ۲۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۱/۲۵ از سوسترای تهیه شده (BAPNA) برای مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گوبه شده و در ادامه با افزودن ۱ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۳۰ درصد واکنش متوقف گردید و مقدار جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت

شد. فعالیت آنزیم تریپسین با کمک رابطه زیر مورد

$$\text{میلی لیتر مخلوط واکنش} \times 1000 \times \text{میزان جذب نوری در طول موج 410 نانومتر} \\ = \frac{\text{میلی گرم پروتئین/واحد}}{8800 \div \text{میلی گرم پروتئین در مخلوط واکنش}}$$

مقدار پروتئین کل در نمونه‌ها به روش Bradford (۱۹۷۶) و با کمک سرم گاوی به‌عنوان نمونه استاندارد به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی آماری داده‌های ثبت شده با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۲) و بهره‌گیری از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way-ANOVA) صورت گرفت و جهت مقایسه بین میانگین تیمارها، آزمون چند دامنه توکی (Tukey) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

۰/۰۴ درصد مکمل نداشت ($p > 0/05$). ضرایب تبدیل غذایی در تیمارهای تغذیه‌شده با مکمل تریپسین به شکل معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود ($p < 0/05$). نرخ رشد ویژه، ضریب بازده پروتئین و شاخص وضعیت در تیمارهای تغذیه‌شده با مکمل تریپسین به شکل معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود (شکل ۱). در طول دوره هیچ تلفاتی در تیمارهای مختلف ثبت نشد.

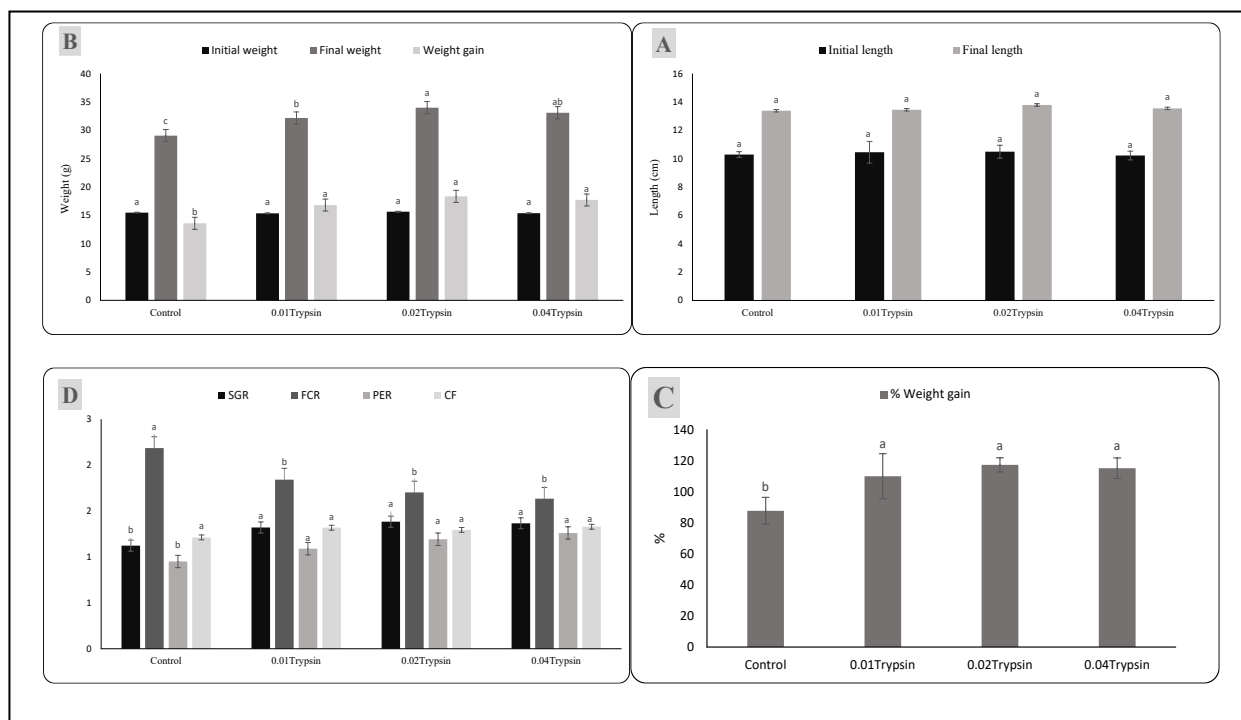
نتایج

شاخص‌های رشد و بازماندگی

نتایج بررسی اثرات استفاده از درصدهای مختلف مکمل آنزیمی تریپسین در جیره بر روی رشد بچه ماهیان کپور معمولی در شکل ۱ آمده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده افزایش معنی‌داری در شاخص وزن نهایی ماهیان در تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی آنزیم در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0/05$). بالاترین میزان وزن نهایی در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد مکمل تریپسین مشاهده شد؛ که به شکل معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد و گروه تغذیه‌شده با جیره حاوی ۰/۰۱ درصد مکمل بود ($p < 0/05$)، اما تفاوت معنی‌داری با گروه تغذیه‌شده با جیره حاوی

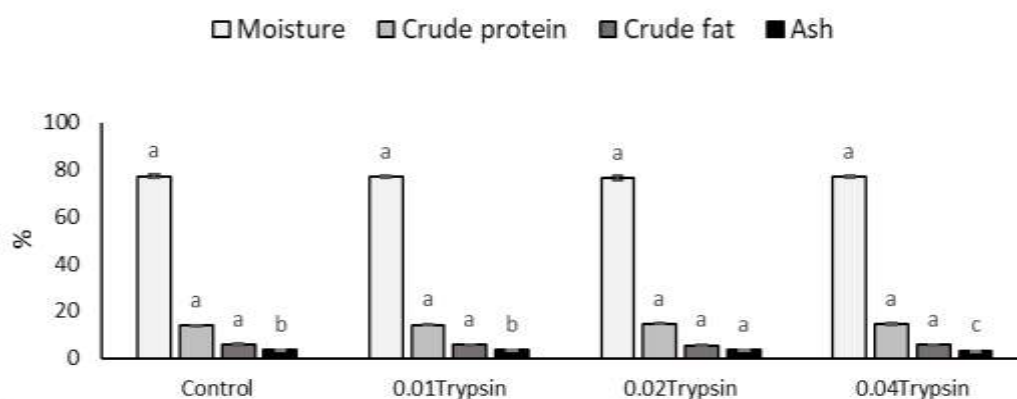
ترکیب بیوشیمیایی لاشه

نتایج تأثیر استفاده از مقادیر مختلفی از مکمل آنزیمی تریپسین در جیره بر آنالیز بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان کپور معمولی در شکل ۲ نشان داده شده است، نتایج نشان داد از نظر میزان درصد رطوبت، پروتئین خام و چربی لاشه ماهیان، بین تیمارهای مختلف به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0/05$)، تنها در مورد درصد خاکستر لاشه، تیمار تغذیه‌شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد مکمل تریپسین به شکل معنی‌داری با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$).



شکل ۱: شاخص‌های رشد (۱-۱-۱: طول اولیه و طول نهایی، ۱-۱-۲: وزن اولیه، وزن نهایی، مقدار افزایش وزن، ۱-۱-۳: درصد افزایش وزن و ۱-۱-۴: نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، نرخ بازده پروتئین و ضریب چاقی) بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از تریپسین

Figure 1: Growth indices (1-A: Initial length and Final length, 1-B: Initial Weight, Final Weight, Weight gain, 1-C: %Weight gain, 1-D: SGR, FCR, PER, CF) of common carp fingerlings fed with diets containing different concentrations of trypsin



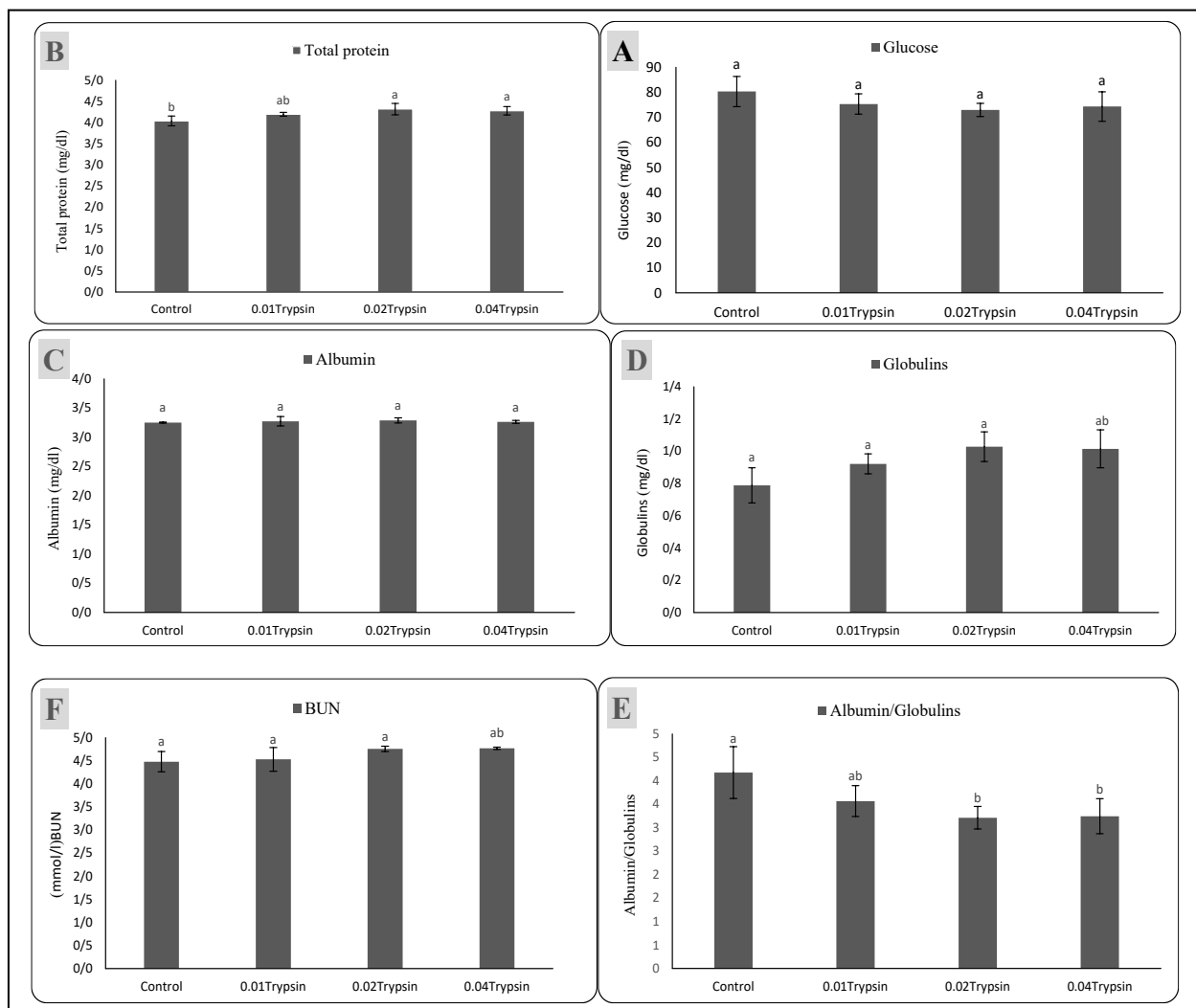
شکل ۲: ترکیب بیوشیمیایی لاشه بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از تریپسین (بر اساس درصد)

Figure 2: Biochemical body composition of common carp fingerlings fed diets containing different concentration of trypsin (%)

فاکتورهای بیوشیمیایی خونی

بین ماهیان تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلف آنزیم تریپسین تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارد ($p>0/05$) (شکل ۳).

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل فاکتورهای بیوشیمیایی خون (گلوکز، پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین، نسبت آلبومین به گلوبولین و میزان نیتروژن اوره ای خون) نشان داد که فاکتورهای بیوشیمیایی در



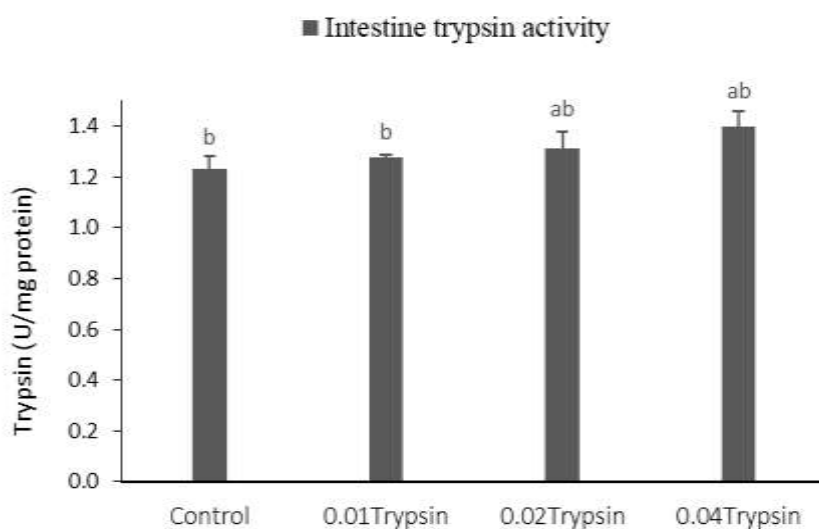
شکل ۳: فاکتورهای بیوشیمیایی خون بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلفی از تریپسین (۳-A: گلوکز، ۳-B: پروتئین کل، ۳-C: آلبومین، ۳-D: گلوبولین، ۳-E: نسبت آلبومین به گلوبولین و ۳-F: BUN).

Figure 3: Blood biochemical factors of common carp fingerlings fed diets containing different concentration of trypsin (3-A: Glucose, 3-B: Total Protein, 3-C: Albumin, 3-D: Globulins, 3-E: Albumin/Globulins and 3-F: BUN).

فعالیت آنزیم تریپسین روده

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم تریپسین روده بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلفی از آنزیم تریپسین در شکل ۴ آمده است. بر اساس نتایج حاصله اگرچه میزان فعالیت آنزیم

تریپسین در روده ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد مکمل تریپسین بالاتر از تیمارهای دیگر بود اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار نبود ($p>0/05$).



شکل ۴: فعالیت آنزیم تریپسین روده بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلفی از تریپسین

Figure 4: Intestinal trypsin enzyme activity of common carp fingerlings fed diets containing different concentration of trypsin

بحث

غلظت های مختلف آنزیم تریپسین در خوراک ماهی کپور معمولی در مطالعه حاضر فاکتورهای رشد را در همه تیمارها در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری بهبود بخشید. از سوی دیگر استفاده از این مکمل کاهش ضریب تبدیل غذایی را در تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد به همراه داشت. در میان تیمارهای مختلف نیز بهترین عملکرد رشد در تیمار ۰/۰۲ درصد ثبت شد. نتایج به دست آمد در این مطالعه هم راستا با نتایج بررسی اثر مکمل تریپسین بر تغذیه

ماهیان روهو (*Labeo rohita*) تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ درصد از این مکمل بود که در مقایسه با گروه شاهد رشد بیشتری نشان دادند (Kumari et al., 2013). همچنین در بررسی Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) استفاده از تریپسین در جیره فیل ماهی (*Huso huso*) به میزان ۰/۰۲ درصد سبب رشد بالاتر و ضریب تبدیل پایین تر ماهیان این تیمار در مقایسه با گروه شاهد گردید. در مطالعه دیگری نیز که با استفاده از مکمل تریپسین به میزان ۰/۵۶ درصد در جیره ماهی کپور معمولی صورت گرفت، مکمل بهبود رشد و

غذایی در ماهیان را به همراه داشته باشند. انتظار می‌رود در گونه‌هایی که معده مشخصی در آن‌ها دیده نمی‌شود و نقش آنزیم پروتئازی پپسین در آن‌ها کم‌رنگ است، آنزیم‌های روده و به‌خصوص تریپسین نقش موثرتری در تبدیل پروتئین‌های جیره به پپتیدها و آمینواسیدهای قابل جذب توسط روده داشته باشند؛ که نتایج مطالعه حاضر مؤید این مطلب می‌باشد هرچند می‌توان با بهینه کردن عواملی نظیر نوع آنزیم تریپسین مورد استفاده، فرآوری آنزیم مورد استفاده، نحوه اضافه کردن آنزیم به جیره، شرایط انبارداری جیره و مدیریت نحوه غذادهی به ماهیان این تأثیر را بهبود بخشید.

در مطالعه حاضر بهره‌گیری از آنزیم تریپسین به‌عنوان یک مکمل در جیره ماهی کپور معمولی تأثیر معنی‌داری بر محتوای پروتئین، رطوبت و چربی لاشه ماهیان در مقایسه با گروه شاهد نداشت. نتایج منتشر شده در پژوهش Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) نیز حاکی از عدم اثرگذاری استفاده از این آنزیم در بازه زمانی ۴۵ روزه بر محتوای چربی و رطوبت لاشه فیل ماهی است. هرچند استفاده از مکمل، پروتئین و خاکستر ماهیان در تیمار ۰/۰۲ درصد را افزایش داد. استفاده از مکمل آنزیمی Aquagrow (پروتئاز باکتریایی) در کپور معمولی در پایان دوره، اثر معنی‌داری بر محتوای لاشه ماهیان نداشت (Leng *et al.*, 2008). در مطالعه Sharma و همکاران (۲۰۱۹) استفاده از عصاره آناناس به‌عنوان مکمل آنزیمی به شکل معنی‌داری سطح پروتئین و اسیدهای آمینه ماهیان را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. در مطالعه Shaker و همکاران (۲۰۲۴) استفاده از پروتئاز و آنزیم پاپائین در جیره ماهی کپور معمولی اثر معنی‌داری بر میزان پروتئین و رطوبت لاشه نداشت، تنها

کاهش ضریب تبدیل غذایی ماهیان را در مقایسه با گروه شاهد به‌همراه داشت (Dabrowski and Glogowski, 1977).

در مطالعات صورت گرفته با ترکیبی از آنزیم‌های پانکراسی بر روی ماهیان، همانند مطالعه حاضر، افزایش رشد مشاهده می‌شود. به‌عنوان مثال استفاده از عصاره روده و پانکراس ماهیان کپور معمولی بالغ به‌عنوان مکمل آنزیمی، در جیره لاروهای ماهی کپور معمولی، رشد بیشتر آن‌ها در مقایسه با جیره‌های بدون مکمل آنزیمی را به‌همراه داشت (Dabrowska *et al.*, 1979). در مقابل استفاده از آنزیم‌های پانکراس خوک به میزان ۰/۰۵ درصد در جیره لارو ماهی باس دریایی، اثر معنی‌داری بر روی رشد لاروها نداشت (Kolkovski *et al.*, 1997). صرف‌نظر از مطالعه اخیر به نظر می‌رسد استفاده از آنزیم‌های با منشأ پانکراسی و به‌طور ویژه تریپسین به‌عنوان مکمل آنزیمی در جیره ماهیان می‌تواند افزایش رشد را در آن‌ها به‌همراه داشته باشد. در خصوص تفاوت در غلظت‌های مورد استفاده در مطالعات مختلف نیز می‌توان منبع و کیفیت آنزیم استخراج شده و نحوه افزودن آن به جیره، نحوه فرآوری جیره غذایی و نحوه و ترتیب افزودن ترکیب اقلام جیره را در این تفاوت دخیل دانست (Khosravanizadeh *et al.*, 2017).

با توجه به مقایسه نتایج این مطالعه با نتایج دیگر پژوهش‌های صورت گرفته در خصوص استفاده از آنزیم‌های پروتئازی در ماهی کپور معمولی که در سطوح بالا ذکر شد به نظر می‌رسد استفاده از آنزیم‌های پروتئازی (نظیر تریپسین) در اکثر موارد توانسته‌اند، با افزایش کارایی دستگاه گوارش ماهی در هضم و جذب پروتئین‌های جیره، افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل

خون ماهیان، عمدتاً از طریق جذب این ماده در روده صورت می‌پذیرد. در جانوران آنزیم کبدی گلوکیناز، هورمون‌های انسولین، رشد، آدرنالین، نورآدرنالین، گلوکاگون و کورتیزول، وظیفه ایجاد هموستازی گلوکز در بدن آن‌ها را، با حفظ سطح گلوکز در محدوده غلظت استاندارد، بر عهده دارند (Burrin and Price, 1985). نتایج مطالعه حاضر نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف آزمایش، از نظر میزان غلظت گلوکز خون وجود ندارد. مشابه این نتایج در مطالعه Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) بر روی فیل ماهی که با استفاده از آنزیم تریپسین به‌عنوان مکمل آنزیمی در جیره انجام شد نیز گزارش شده است. در مطالعه Adelian و همکاران (۲۰۱۶) نیز عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف آزمایش که با سطوح مختلف مکمل آنزیمی کمین تغذیه‌شده بودند، گزارش شده است. با این وجود استفاده از آنزیم تریپسین در جیره غذایی ماهی روهو، کاهش سطح گلوکز را در مقایسه با گروه شاهد به‌همراه داشت (Kumari et al., 2013). به‌کارگیری آنزیم در جیره ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) نیز مشابه مطالعه حاضر، تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز خون ماهیان نشان نداد (Khosravanizadeh et al., 2020). در بررسی که با استفاده از مکمل آنزیمی پاپائین بر روی ماهی کپور معمولی صورت گرفت، نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار میزان گلوکز خون ماهیان در مقایسه با گروه شاهد بود (Shakir et al., 2013). در مطالعه Yousefian و همکاران (۲۰۱۳) نیز استفاده از مکمل آنزیمی، سطح گلوکز خون ماهیان را نسبت به گروه فاقد آنزیم به شکل معنی‌داری افزایش داد. با عنایت به نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر و مقایسه آن با نتایج

در تیمار ۱/۵ درصد پاپائین میزان چربی لاشه به شکل معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها بود. استفاده از مکمل آنزیمی Hostazyme X که حاوی زایلناز، آمیلاز، سلولاز، آلفا گلوکتوسیداز، بتا گلوکوناز، پکتیناز، لیپاز و پروتئاز است، در جیره ماهی کپور معمولی سبب افزایش معنی‌دار پروتئین و چربی و کاهش رطوبت و خاکستر لاشه ماهیان در تیمارها در مقایسه با گروه شاهد شد (Monier, 2020). همچنین در مطالعات صورت گرفته با استفاده از آنزیم‌های پروتئازی در سایر گونه‌ها نظیر تیلاپیا هیبرید (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*)، ماهی کاراس (*Carassius auratus gibelio*) و باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) استفاده از مکمل آنزیمی اثر معنی‌داری بر ترکیب شیمیایی لاشه ماهیان نداشت (Kolkovski et al., 1977; Lin and Tan, 2007; Shi et al., 2016; Khosravanizadeh et al., 2020). بررسی نتایج این مطالعه و مقایسه با سایر مطالعات نشان می‌دهد علی‌رغم اثرگذاری مثبت عمده مکمل‌های پروتئازی به‌کار گرفته‌شده در خصوص گونه کپور معمولی، بر رشد ماهیان، اما تغییرات قابل‌توجهی در لاشه ماهیان مشهود نبوده است. یکی از دلایل عدم مشاهده نتایج ملموس در بهبود کیفیت لاشه ماهیان را می‌توان دوره‌های کوتاه آزمایشات صورت گرفته عنوان کرد لذا توصیه می‌شود جهت قضاوت دقیق‌تر در این خصوص مطالعاتی با بازه زمانی طولی‌تر در این زمینه صورت پذیرد.

گلوکز به‌عنوان یک منبع انرژی مهم از طریق سیستم گردش خون در اختیار سلول‌های اندام‌های مختلف ماهیان قرار می‌گیرد و در تأمین نیازهای آن‌ها، در فرآیند سوخت‌وساز نقش آفرینی می‌کند. تأمین گلوکز

به‌دست آمده در سایر مطالعات، به نظر می‌رسد استفاده از تریپسین در غلظت‌های استفاده‌شده در این مطالعه، اثر منفی بر میزان نقش آفرینی آنزیم‌ها و هورمون‌های مؤثر در مسیر حفظ غلظت مناسب گلوکز در خون ماهیان ندارد و سبب کاهش یا افزایش غیرمتعارفی در این پارامتر در خون ماهیان نمی‌شود.

پروتئین‌های خون نقش مهمی در انتقال لیپیدها، هورمون‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی و حفظ عملکرد سیستم ایمنی بدن ماهیان دارند. آسیب به کبد و نقصان در عملکرد آن، تغذیه نامناسب یا ناکافی، گرسنگی برای زمان طولانی، انواع التهابات و عفونت‌ها، ازدست‌دادن خون و اختلال در سیستم گوارش و جذب مواد غذایی به‌خصوص پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه، برخی از مهم‌ترین عواملی هستند که کاهش پروتئین‌های خون (از جمله آلومین) را به همراه دارند؛ در نقطه مقابل استفاده از یک رژیم غذایی مناسب با درصد مناسبی از پروتئین، به‌همراه عملکرد کارا و مطلوب سیستم گوارش در هضم و جذب این رژیم غذایی، می‌تواند با فراهم کردن زمینه برای بهره‌برداری حداکثری بدن از پپتیدها و اسیدهای آمینه حاصل از تجزیه پروتئین‌های جیره، فرصت سنتز پروتئین‌های ضروری در خون ماهیان نظیر آلومین، گلوبولین و گلبول‌های سفید را فراهم کند (Mahmoudi Khoshdarehgi et al., 2019). در مطالعه حاضر افزایش معنی‌دار سطح پروتئین کل خون ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی مکمل آنزیمی تریپسین در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. در خصوص آلومین خون این تغییرات معنی‌دار نبود. همچنین در خصوص غلظت گلوبولین خون، علی‌رغم افزایش محسوس میزان این فاکتور در خون ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی مکمل آنزیمی، اما تغییرات

معنی‌دار نبودند. در مطالعه Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) که با استفاده از آنزیم تریپسین در جیره فیل ماهی صورت پذیرفت میزان پارامترهای پروتئین کل، آلومین، گلوبولین و نسبت آلومین به گلوبولین با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. همچنین گزارش‌شده استفاده از کمین در جیره بر فاکتورهای آلومین و پروتئین کل خون ماهیان کپور معمولی اثر معنی‌داری نداشته است (Adelian et al., 2016). نتایجی که در مطالعه اثرات آنزیم آویزایم (حاوی پروتئاز) در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نیز مشاهده شد (Hosseini-fard et al., 2013). در مطالعه Shaker و همکاران (۲۰۲۴) استفاده از آنزیم پروتئاز، موجب افزایش معنی‌دار غلظت آلومین در مقایسه با تیمار فاقد آنزیم شد، بر روی پروتئین کل اثری نداشت، اما کاهش معنی‌دار غلظت گلوبولین را به همراه داشت. در مطالعه Yousefian و همکاران (۲۰۱۳) نیز استفاده از آنزیم در جیره، سطح پروتئین کل و آلومین را به شکل معنی‌داری ارتقا داد. نتایج به‌دست آمده در خصوص پروتئین‌های خون ماهی کپور معمولی در مطالعه حاضر، حکایت از آن دارد که به‌واسطه افزودن مکمل پروتئازی به جیره ماهیان و نقش آن در هضم و جذب بالاتر پروتئین، میزان بهره‌برداری از پروتئین‌های جیره افزایش یافته است و با در دسترس قرار گرفتن منابع غنی‌تری از اسیدهای آمینه در اختیار کبد و سایر اندام‌های دخیل در فرآیند سنتز پروتئین‌های مختلف پلاسما، فرصت سنتز مقادیر بالاتری از پروتئین‌های خون را فراهم کرده است.

تجزیه پروتئین‌ها در بدن ماهیان، محصولات فرعی حاوی ترکیبات نیتروژن‌دار را تولید می‌کند که از طریق

گزارش شده است. در مطالعه Monier (۲۰۲۰) نیز استفاده از مکمل آنزیمی Hostazyme X، موجب افزایش فعالیت پروتئازی روده ماهیان شد. نتایجی که در مورد مکمل آنزیمی پروتئاز میکروبی نیز گزارش شده است (Lin and Tan, 2007). همچنین استفاده از مکمل پروتئازی Aquagrow در جیره ماهی کپور معمولی، سبب افزایش فعالیت پروتئازی در دستگاه گوارش این گونه شد (Leng et al., 2008). اما استفاده از پروتئاز طبیعی در جیره ماهی کپور سیاه (*Mylopharyngodon piceus*)، تغییر معنی داری در فعالیت پروتئازهای روده ماهیان ایجاد نکرد (Chen et al., 2009). بر اساس نتایج مطالعات مختلف و مطالعه حاضر افزودن آنزیم پروتئازی به جیره می تواند سطح فعالیت آنزیم های پروتئازی مانند تریپسین در روده ماهیان را افزایش دهد که زمینه برای هضم بهتر پروتئین جیره و رشد بیشتر را فراهم می کند.

نتیجه گیری کلی

به طور کلی استفاده از آنزیم تریپسین به عنوان مکمل در جیره غذایی ماهی کپور معمولی با افزایش کارایی جیره غذایی و به ویژه بخش ارزشمند جیره، یعنی پروتئین جیره، سبب بهبود فاکتورهای رشد می گردد. بر اساس نتایج به دست آمده غلظت ۰/۰۲ درصد از آنزیم تریپسین جهت استفاده به عنوان مکمل در جیره ماهی کپور معمولی، مؤثر بوده و توصیه می گردد؛ زیرا علی-رغم افزایش رشد ماهیان، درصد بقای ماهیان را تحت شعاع قرار نداده و اثرات جانبی خاصی بر روی پارامترهای خونی مانند گلوکز، پروتئین کل، آلبومین و نیتروژن اوره ای خون که منعکس کننده سلامت دستگاه گوارش هستند، نداشت. با این وجود انجام مطالعات

جریان خون به اندام های دفع کننده این ترکیبات منتقل می شوند. در شرایط طبیعی میزان نیتروژن اوره ای خون در محدوده معینی در هر گونه ماهی قرار دارد. هرگونه آسیب به اجزای دفع نیتروژن از بدن یا اختلال در این فرآیند باعث می شود، برداشت نیتروژن از خون با سرعت لازم صورت نپذیرد و در نتیجه شاهد افزایش این شاخص در خون باشیم. در مطالعه حاضر نتایج نشان می دهد علی رغم افزایش برداشت پروتئین از جیره در تیمارهای حاوی مکمل آنزیمی، تغییر معنی داری در میزان نیتروژن اوره ای خون ماهیان تیمارهای مختلف دیده نمی شود که حاکی از ایمن بودن استفاده از این مکمل آنزیمی در دوزهای به کار گرفته شده در ماهیان است. مشابه این نتایج در مطالعه Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) در خصوص استفاده از مکمل تریپسین در خوراک فیل ماهی نیز مشاهده می شود. اما در مطالعه ای که با استفاده از این آنزیم بر روی ماهی روهو انجام شده، سطح نیتروژن اوره ای خون به شکل معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است (Kumari et al., 2013). در بررسی Yousefian و همکاران (۲۰۱۳) نیز استفاده از مکمل آنزیمی اثر معنی داری بر میزان نیتروژن اوره ای خون ماهیان نداشت.

در مطالعه حاضر استفاده از مکمل تریپسین در جیره غذایی کپور معمولی، فعالیت آنزیم تریپسین در روده ماهیان را افزایش داد اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود. در مطالعه Khosravanizadeh و همکاران (۲۰۱۷) استفاده از آنزیم تریپسین در جیره فیل ماهی، سطح فعالیت آنزیم تریپسین در روده ماهیان را به شکل معنی داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. نتایجی که در مطالعه Kumari و همکاران (۲۰۱۳) نیز

of *Clinical Biochemistry*, 22(4), pp.327-342.

DOI:10.1177/000456328502200401

7. Chen, J.M., Ye, J.Y., Xu, Y.X., Shen, B.Q., Guo, J.L., Pan, Q. and Wang, Y.H., 2009. Effect of adding neutral protease to diets on growth performance, digestion, and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 33(4), pp.726-731.

DOI:10.3724/SP.J.1035.2009.40726

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

DOI:10.1577/1548-

8659(1979)41[196:ADFCC]2.0.CO;2

9. Dabrowski, K. and Glogowski, J., 1977. A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. *Aquaculture*, 12(4), pp.349-360.

DOI:10.1016/0044-8486(77)90213-7

10. David, L. H., Pinho, S.M., Agostinho, F., Kimpara, J. M., Keesman, K. J. and Garcia, F., 2021. Emery synthesis for aquaculture: A review on its constraints and potentials. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), pp.1119-1138.

DOI:10.1111/raq.12519

11. 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), pp.271-278. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90145-X

12. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Towards Blue Transformation., 2022. Available online: www.fao.org (accessed on 4 July 2022).

13. Farhangi, M. and Carter, C.G., 2007. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*

تکمیلی در خصوص بررسی ایمنی بیشتر این مکمل و

نیز بهینه کردن استفاده از آن در جیره غذایی ماهیان

توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

این طرح (با شماره طرح: PR-RIOZ-1402-

4941-1) با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری

پژوهشگاه زابل انجام شده است.

منابع

- Adelian, M., Imanpoor, M. R., Taghizadeh, V. and Mazandarani, M., 2016. Utilizing Kemin multi-enzymes in the diet and their effects on growth and some blood factors of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Environment*, 8(2), pp.201-206. [In Persian]
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. Official Methods of Analysis 16th edition. AOAC, Gaithersburg, Maryland. P: 532
- Asadi, R., Imanpoor, M.R., Asghari, M. and Enayat, G.T., 2012. Effects of gradual replacement of fish meal with soy meal and supplement phytase enzyme supplement on apparent digestibility coefficient and carcass mineral composition of beluga (*Huso huso*) juvenile. *Iranian Veterinary Journal*, 8(1), pp.5-14. [In Persian]
- Bedford, M.R. and Partridge, G.G (Eds.), 2001. Enzymes in farm animal nutrition. Wallingford, UK: CABI Publishing, 336 p.
- 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), pp.248-254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Burrin, J.M. and Price, C.P., 1985. Measurement of blood glucose. *Annals*

- the diet and their effects on growth, body composition, some blood biochemical factors and activity of intestinal trypsin of great sturgeon (*Huso huso*). *Journal of Animal Environment*, 9(3), pp.211-218. [In Persian]
20. Khosravanizadeh, A., Sudagar, M., Salehi, H., Alishahi, A. and Jafari, S.M., 2019. Utilizing encapsulated protease supplement in the diet and its effects on growth, body composition, some blood biochemical factors and activity of intestinal trypsin of beluga (*Huso huso*). *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 7(1), pp.77-102. DOI:10.22124/JAPB.2019.8933.1204 [In Persian]
 21. Khosravanizadeh, A., Rahdari, A. and moradian, H., 2020. Effects of dietary Kemin multi-enzyme on growth, body composition and some blood biochemical factors of *Carassius auratus*. *Aquatic Animals Nutrition*, 6(3), pp.13-24. DOI: 10.22124/janb.2021.18992.1126 [In Persian]
 22. Kolkovski, S., Tandler, A. and Izquierdo, M.S., 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148(4), pp.313-322. DOI: 10.1016/S0044-8486(96)01366-X
 23. Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Choudhury, D. and Mukherjee, S.C., 2006. Non-gelatinized corn supplemented with α -amylase at sub-optimum protein level enhances the growth of *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 37(3), pp.284-292. DOI:10.1111/j.1365-2109.2005.01434.x
 24. Kumar, P., Mehta, N., Abubakar, A.A., Verma, A. K., Kaka, U., Sharma, N., Sazili, A.Q., Pateiro, M., Kumar, M. and Lorenzo, J.M., 2023. Potential alternatives of animal proteins for sustainability in the food sector. *Food Research*, 38(12), pp.1274-1282. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01789.x
 14. Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Domezain, A., Domezain, J. and Sanz, A., 2008. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 149(4), pp.420-425. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.02.002
 15. Ghadirzadeh, S.K., Nasr, E., Sheikhzadeh, N. and Heidarieh, M., 2025. Effects of the recombinant fungal phytase enzyme PhyA derived from *Pichia pastoris* on growth factors and phosphate content in the feces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Development*, 19 (1), pp.113-132. DOI: 10.71901/jad-2025-1-884 [In Persian]
 16. Helmy, M., Elhalis, H., Liu, Y., Chow, Y. and Selvarajoo, K., 2023. Perspective: multiomics and machine learning help unleash the alternative food potential of microalgae. *Advances in Nutrition*, 14(1), pp.1-11. DOI: S2161831322013060
 17. Hosseinifard, S.M., Ghobadi, Sh., Khodabakhsh, E. and Razeghi, M., 2013. The effect of different levels of soybean meals and avizyme enzyme supplement on hematological and biochemical parameters of serum in rainbow trout. *Iranian Veterinary Journal*, 9(3), pp.43-53. [In Persian]
 18. Kakavand, M., Hosseini Shekarabi, S.P., Shamsaie Mehrgan, M. and Rajabi Islami, H., 2025. Effect of protease enzyme in the diet on the growth performance and chemicals body composition of Sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) juvenile. *Journal of Aquaculture Development*, 18(4), pp.45-55. DOI: 10.71901/jad-2024-1-812 [In Persian]
 19. Khosravanizadeh, A., Sudagar, M., Salehi, H., Alishahi, A. and Jafari, S.M., 2017. Utilizing trypsin enzyme in

- of papain supplemented diet on growth and survival of post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(6), pp.176-179.
32. Saeed, F., Afzaal, M., Khalid, A., Shah, Y.A., Ateeq, H., Islam, F., Akram, N., Ejaz, A., Nayik, G.A. and Shah, M.A., 2023. Role of mycoprotein as a non-meat protein in food security and sustainability: A review. *International Journal of Food Properties*, 26(1), pp.683-695. DOI: 10.1080/10942912.2023.2178456
33. Shakir, H.F., Hameed Albassam, N., Al Habib, F.M. and Abass, K.S., 2024. Effect of Adding some Digestive Enzymes in Diets of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) on the Rates of Digestion, Growth and Hematological Characteristics. *Jornal of Al-Muthanna Agricultural Sciences*, 11(supplement 1).
34. Sharma, S. A., Krishnakumar, V. and Arulraj, J., 2019. Impact of Ananas comosus extract supplementation on the growth and biochemical profile of *Cyprinus carpio* fingerlings. *Trends Fisheries Research*, 8, pp.69-77.
35. Shi, Z., Li, X.Q., Chowdhury, M.K., Chen, J.N. and Leng, X.J., 2016. Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Aquaculture*, 460, pp.37-44. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.049
36. Statistical Yearbook of Iranian Fisheries., 2024. *Iranian Fisheries Organization*, 2024. [In Persian]
37. Tacon, A.G., 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Washington DC, Argent Laboratories press. P: 454.
38. Wilfart, A., Prudhomme, J., Blancheton, J.P. and Aubin, J., 2013. LCA and emergy accounting of aquaculture systems: Towards ecological intensification. *Journal of Reviews International*, 39(8), pp.5703-5728. DOI: 10.1080/87559129.2022.2094403
25. Kumari, R., Gupta, S., Singh, A.R., Ferosekhan, S., Kothari, D.C., Pal, A. K. and Jadhao, S.B., 2013. Chitosan nanoencapsulated exogenous trypsin biomimics zymogen-like enzyme in fish gastrointestinal tract. *PLoS One*, 8(9), pp.e74743. DOI:10.1371/journal.pone.0074743
26. Leng, X.J., Liu, D.Y., Li, X.Q. and Lu, Y.H., 2008. Effects of adding Protease AG on growth and digestive protease activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 20(3), pp.1-7. DOI: 10.5555/20093191533
27. Lin, S., Mai, K. and Tan, B., 2007. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture Research*, 38(15), pp.1645-1653. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01825.x
28. Mahmoudi Khoshdarehgi, M., Haji Moradloo, A. and Dastar, B., 2019. Determining the appropriate level of protein in diet of *Cyprinus carpio* fry based on some parameters of growth, blood and serum biochemistry in biofloc system. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 7(1), pp.61-84. [In Persian]
29. Monier, M.N., 2020. Efficacy of dietary exogenous enzyme supplementation on growth performance, antioxidant activity, and digestive enzymes of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(2), pp.713-723. DOI: 10.1007/s10695-019-00745-z
30. Özcan, F. and Taşbozan, O., 2022. September. Effects of dietary lipase supplementation on digestive enzyme activity and growth metrics of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *In Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*, 75(9), pp.1383-1392.
31. Patil, D.W. and Singh, H., 2014. Effect

environmental management, 121,
pp.96-109. DOI:
10.1016/j.jenvman.2013.01.031

39. Yousefian, M., Navazandeh, A., Gharaati, A. and Mahdavi, S., 2013. Investigation of survival, growth and biochemical blood parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae fed by artificial diets. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, pp.175-179.
40. Zhao, Z., Li, Y. and Du, Z., 2022. Seafood waste-based materials for sustainable food packing: From waste to wealth. *Sustainability*, 14(24), pp.16579. DOI: 10.3390/su142416579