

تأثیر سطوح مختلف روی جیره بر فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و الگوی الکتروفور تیک عضله در بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) (Nordmann, 1840)

کتایون کریم زاده*^۱، عسگر زحمتکش^۲

۱- گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی ۱۶۱۶

۲- بخش شیلات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران. صندوق پستی:

۴۱۶۳۵-۳۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۱۷ آذر ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۵ مرداد ۱۳۹۶

چکیده

در یک آزمایش تغذیه‌ای، تأثیر ۲ جیره غذایی حاوی دو سطح از فلز روی (۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا) و جیره شاهد (فاقد روی) بر نرخ فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و الگوی الکتروفور تیک عضله در ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii*) بررسی گردید. بدین منظور ۲۷۰ عدد ماهی با میانگین (\pm انحراف معیار) وزن $0/06 \pm 0/56$ گرم در ۹ آکوارיום ۵۰ لیتری به‌طور تصادفی توزیع گردیده و به مدت سه ماه ۳ بار در روز تغذیه شدند. میزان بیان پروتئین‌های عضله با روش الکتروفورز، مقدار فلز روی و نیز فعالیت آنزیم پیرووات کیناز (PK) در عضله اندازه‌گیری شدند. بیش‌ترین مقدار روی در عضله در انتهای دوره، در جیره حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم غذا ($5/3 \pm 0/02$) در میکروگرم بر گرم) مشاهده گردید. الگوی پروتئین الکتروفوروز پروتئین‌های استخراجی از عضله ماهی سفید، شامل زنجیره میوزین سنگین (HC) و زنجیره‌های میوزین سبک (LC) بود. زنجیره سبک سه بانده پروتئینی ویژه (LC1F, LC2F, LC3F) را نشان داد که در میزان LC2F و LC3F تغییراتی در طی دوره آزمایش مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم PK در پایان دوره آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($0/05$) و همبستگی مثبت ($r = 0/95$) و معنی‌داری ($P \leq 0/05$) بین میزان آنزیم پیرووات کیناز و افزایش وزن در بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم غذا با سایر بچه‌ماهیان مشاهده گردید. به‌طور کلی استفاده از جیره حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم غذا تأثیری بر شدت تراکم باندها در الگوی پروتئینی و فعالیت آنزیم PK عضله سفید نداشت.

کلمات کلیدی: ماهی سفید، روی، پیرووات کیناز، الگوی پروتئینی.

مقدمه

فلزات سنگین مانند روی، مس و آهن از عناصر ضروری جهت انجام بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و متابولیسم در ماهیان به‌شمار می‌روند (Eide, 2006; Maret and KrEl, 2007). افزایش و کاهش این عناصر در رژیم غذایی ماهیان منجر به بروز برخی تغییرات فیزیولوژیک-پاتولوژیک و نیز بیوشیمیایی می‌گردد که این اثرات بسته به گونه ماهی و عنصر فلزی می‌تواند متفاوت باشد (Clearwater, 2002; Eide, 2006). تعیین مقادیر عناصر ضروری موردنیاز جهت ماهیان از نقطه نظر این که آن‌ها قادر به تأمین این عناصر هم از آب و هم از منابع غذایی هستند قدری مشکل می‌باشد (Watanabe et al., 1997; Feng et al., 2011). از طرف دیگر میزان تأمین عناصری مانند روی و مس از آب توسط ماهیان کافی نیست و نمی‌تواند نیازهای فیزیولوژیک آن‌ها را به این عناصر برطرف نماید. لذا قراردادن این عناصر به صورت مکمل غذایی در جیره جهت جبران کمبود آن‌ها امری ضروری می‌باشد (Welker et al., 2015; Li and Huang, 2016).

فلز روی یک ریزمغذی مفید برای جانوران است. حضور این فلز جهت فعالیت آنزیم‌هایی مانند RNA پلیمراز، کربنیک انیدراز، سوپراکسیددسموتاز وابسته به مس و روی (Cu, Zn-SOD) و فعالیت پروتئین‌های با نواحی (دومن‌های) عملکردی وابسته به روی ضروری است. روی کوفاکتور بیش از ۳۰۰ آنزیم و مسیرهای متابولیکی وابسته به آن‌ها می‌باشد (Watanabe et al., 1997; Gropper et al., 2005). این عنصر نقش مهمی در پایداری و حفاظت ساختار پروتئین‌ها در دوره رشد و نمو ماهیان دارد. لذا ماهیان نسبت به سایر جانوران به

مقادیر بالاتری از روی نیاز دارند تا از آن جهت رشد پیوسته عضلات‌شان به‌ویژه عضله‌های جانبی استفاده نمایند (Lin et al., 2008; Isani et al., 2003).

با توجه به اهمیتی که عنصر روی می‌تواند در جیره ماهیان داشته باشد، لذا تاکنون چندین مطالعه بر روی مقدار موردنیاز عنصر روی در جیره برخی از ماهیان انجام شده است که می‌توان به ماهیانی از قبیل ماهی قزل‌آلا (Hidaglo et al., 2002; Welker et al., 2016)، ماهی تیلاپیای هیبرید (Li and Huang, 2015)، ماهی باس دریایی (Buentello et al., 2009) و ماهی کپورعلفخوار (Liang et al., 2012) اشاره کرد. کمبود فلز روی در ماهیان منجر به کاهش رشد، کاهش اشتها و کاهش روی در استخوان و حتی در سرم خون ماهیان گردیده است (Li and Huang, 2015). نقصان فلز روی در جیره می‌تواند سیستم ایمنی ماهیان را متأثر کرده و میزان فعالیت سلول‌های T و ماکروفاژی را کاهش دهد چنان‌که در گربه‌ماهی کانالی این مسئله به‌وضوح مشاهده گردیده است (Scarpa and Gatlin, 1992). نقصان این فلز منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی به‌ویژه سوپراکسید دسموتاز در قزل‌آلای رنگین‌کمان (Hidaglo et al., 2002) و ماهی کپور (Feng et al., 2011) گردیده است. عضله ماهیان ۶۰ درصد کل بدن ماهیان را تشکیل می‌دهد و مهم‌ترین بافت جهت ذخیره‌سازی مواد مغذی محسوب می‌شوند (Wu et al., 2015).

افزودن روی در جیره غذایی ماهیان منجر به بهبود ترکیب شیمیایی به‌ویژه پروتئین‌های عضله می‌گردد که در الگوی الکتروفوریتیک پروتئینی عضله و نیز پروفایل اسیدهای آمینه آن‌ها به‌خوبی منعکس شده است.

رشد بچه ماهی سفید (نویریان و همکاران، ۱۳۸۳)، تعیین سطح مطلوب پیش مخلوط ویتامینی در جیره غذایی بچه ماهی سفید دریای خزر (نویریان و همکاران، ۱۳۸۶) صورت گرفته است. نتایج این مطالعات نشان داد که با افزایش میزان پروتئین و پیش مخلوط ویتامینی در جیره، شاخص معیارهای رشد مانند افزایش وزن و درصد رشد نسبی بهبود می یابد. به منظور معرفی ماهی سفید به سیستم آبی پروری و پرورش آن در محیط محصور لازم است که این ماهی با غذای فرموله تغذیه شود. این غذا می بایست به نحوی باشد که هم بیشترین شباهت را با غذای موجود در محیط طبیعی داشته باشد و هم تمام نیازهای متابولیکی آن را برآورده کند. یکی از عوامل مهم برای موفقیت در پرورش این ماهی فراهم کردن غذای مناسب می باشد. علاوه بر پروتئین، چربی و کربوهیدرات، وجود عناصر معدنی در غذا امری ضروری محسوب می شود. از میان مواد مغذی معدنی، روی اهمیت قابل توجهی را دارد. از آن جا که مطالعه ای در خصوص تأثیر پذیری الگوی پروتئینی عضله و تغییرات آنزیم پیرووات کیناز در بچه ماهی سفید تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف روی وجود ندارد، بنابراین تحقیق حاضر امکان استفاده از روی در جیره غذایی و بررسی تأثیر آن بر روی آنزیم پیرووات کیناز و همچنین پروتئین بدن بچه ماهی سفید به صورت الگوی پروتئینی را مورد مطالعه قرار داده است.

مواد و روش ها

بچه ماهیان سفید مورد استفاده در این تحقیق از مجتمع تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان شهید بهشتی تهیه و به مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی

چنان که استفاده از روی در جیره ماهی سیم دریایی منجر به متراکم شدن باند پروتئینی زنجیره سنگین میوزین گردید که بیانگر بهبود کیفیت پروتئین در این ماهی بوده است (Isani *et al.*, 2004). عضلات سفید در ماهیان معمولاً پس از فعالیت و شنای نسبتاً زیاد (در هنگام مهاجرت های طولانی، گرفتن طعمه و فرار از شکارچیان) تحلیل رفته اما در شرایط استراحت دوباره بازسازی می گردند. این دسته از عضلات متشکل از لایه های فیبری غیرهوازی می باشند تا در زمان فعالیت های شدید عکس العمل نشان دهند (Marras *et al.*, 2013).

در عضلات سفید، ATP تولید شده در مسیر گلیکولیز توسط انقباضات عضلانی مصرف می شود. آنزیمی که در این مسیر دخالت می کند پیرووات کیناز می باشد که در پستانداران مطالعات زیادی بر روی آن انجام شده است (Maret and KrE1, 2007). اما در ماهیان مطالعات اندکی در خصوص این آنزیم و سنتتیک آن صورت گرفته است (Yuan *et al.*, 2003; Isani *et al.*, 2013). چنان که پیرووات کیناز استخراج شده از عضله ماهی آزاد دارای زیر واحدهای با وزن مولکولی مشابه با ایزوآنزیم های مطالعه شده در سایر جانوران می باشد (Yuan *et al.*, 2013).

ماهی سفید (*Rutilus frisii*) یکی از گونه های خانواده کپور ماهیان می باشد که به دلیل ارزش اقتصادی بالا از مهم ترین ماهیان استخوانی در سواحل جنوبی دریای خزر محسوب می شود. از نظر رژیم غذایی جزء ماهیان همه چیز خوار می باشد (طهامی و قیاسی، ۱۳۹۲؛ ولی پور و خانی پور، ۱۳۹۴). مطالعاتی در خصوص تغذیه ماهی سفید به ویژه تأثیر سطوح مختلف پروتئین و چربی بر روی معیارهای شاخص

نوبت در طی سه ماه مورد تغذیه قرار گرفتند. دوره نوری به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

ساخت غذا

جیره غذایی با دو سطح مختلف روی فرموله و بالانس شد. جهت تأمین پروتئین جیره از ژلاتین، سفیده تخم مرغ و پودر ماهی استفاده گردید و برای تأمین روی، مقادیر مناسب سولفات روی به جیره‌ها افزوده شد. اقلام غذایی را پس از وزن کردن با همدیگر مخلوط کرده و پس از تهیه خمیر آن را چرخ کرده و پس از خشک کردن پلت‌ها را خرد و با توجه به اندازه دهان بچه‌ماهیان با الک ۱ و ۱/۵ میلی‌متری الک شدند (جدول ۱).

میرزا کوچک خان منتقل شدند. برای اجرای آزمایش جیره‌هایی با مقادیر مختلف روی (صفر، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۲ درصد) ساخته شده و هر کدام در ۳ تکرار و در مجموع در ۹ آکواریوم جهت تغذیه بچه‌ماهیان سفید بکار برده شد.

جهت سازگاری با شرایط محیط بچه‌ماهیان در تانک فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری به مدت دو هفته نگهداری شدند. پس از دوره سازگاری ۲۷۰ عدد از این ماهی‌ها با میانگین وزن ۰/۵۶ گرم به صورت کاملاً تصادفی در ۹ آکواریوم با ابعاد ۳۵×۴۰×۵۰ سانتی‌متر (حجم آب‌گیری ۴۰ لیتر) و با تراکم تقریباً ۰/۵ گرم در لیتر توزیع شدند (Ahmadian et al., 2015). بچه‌ماهی‌ها با جیره‌های تهیه شده به صورت دستی در ۳

جدول ۱: اجزای غذایی و ترکیب جیره‌های غذایی مورد استفاده برای بچه‌ماهی سفید در این آزمایش

مواد اولیه (درصد در جیره)	جیره ۱ (شاهد)	جیره ۲	جیره ۳
ژلاتین	۷	۷	۷
پودر سفیده تخم مرغ	۲۲/۲۶	۲۲/۲۶	۲۲/۲۶
پودر ماهی	۲۰	۲۰	۲۰
مخمر	۱۰	۱۰	۱۰
آرد گندم	۱۳/۵۶	۱۳/۵۶	۱۳/۵۶
نشاسته	۵	۵	۵
شیر خشک	۴	۴	۴
روغن ماهی	۴	۴	۴
روغن آفتاب گردان	۷/۵۸	۷/۵۸	۷/۵۸
مخلوط معدنی*	۲/۵	۲/۵	۲/۵
مخلوط ویتامینی	۳	۳	۳
آنتی‌اکسیدان	۰/۱	۰/۱	۰/۱
روی	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۲
سلولز	۱	۰/۹۹۵	۰/۹۸

* مخلوط معدنی بدون روی در جیره استفاده شده است.

نمونه برداری گردیدند. ۴۸ ساعت قبل از هر نمونه‌گیری غذادهی قطع گردید و ماهیان به کمک پودر گل‌میخک با غلظت ۱۰۰ mg/l بی‌هوش شدند. قسمتی

تهیه هموژنات سلولی

در ابتدای آزمایش و به صورت ماهانه تعداد ۱۰ عدد بچه‌ماهی از هر تیمار جهت انجام آنالیزها

الکتروفورز پلی اکریل آمید

الکتروفورز پلی اکریل آمید هموزنات عضله سفید بچه ماهیان سفید به روش لاملی (Laemmli, 1970) انجام گرفت. پس از تهیه ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد، نمونه‌های هر تیمار بر روی ژل برده شدند. الکتروفورز در حضور بافر تریس هیدروکلراید ۵۰ میلی مولار که حاوی گلیسین ۲۰۰ میلی مولار و SDS ۰/۱ درصد با pH برابر ۸/۶ بود، انجام گرفت. پس از اعمال ولتاژی معادل ۱۵۰ ولت و شدت جریان ۲۰ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت الکتروفورز به پایان رسید و ژل حاصله از الکتروفورز توسط ماده رنگی کوماسی بلو ۳۵۰-R رنگ آمیزی گردید.

تعیین غلظت روی

۰/۱ گرم از نمونه‌های عضله در حضور ۲ میلی لیتر اسیدنیتریک ۶۵ درصد و ۰/۵ میلی لیتر از پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد در ماکرویو به ترتیب ۵ دقیقه در ۲۵۰ وات، ۵ دقیقه در ۴۰۰ وات، ۵ دقیقه در ۵۰۰ وات و ۱ دقیقه در ۷۵۰ وات هضم شیمیایی شدند (Isani *et al.*, 2000). پس از سرد شدن، نمونه‌ها به بالن‌های حجمی ۱۰ میلی لیتر از جنس پلی اتیلن منتقل گردیدند. مقدار روی توسط اسپکتوفتومتر جذب اتمی مجهز به شعله Perkinelmer, PinAAcle 500 (Flame, USA) در طول موج ۲۱۴ نانومتر در حضور استاندارد روی اندازه گیری گردیده و مقدار روی بر حسب میکروگرم بر گرم گزارش گردید.

تعیین فعالیت آنزیم پرووات کیناز

اندازه گیری فعالیت آنزیم پرووات کیناز با استفاده از روش ایسانی (Isani *et al.*, 2000) انجام گرفت. به

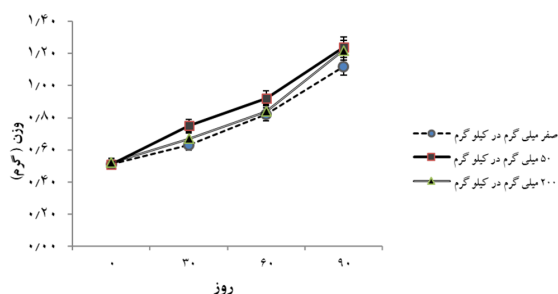
از عضله سفید بچه ماهیان در هر تیمار جدا شده و جهت سنجش‌های بیوشیمیایی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری گردیدند.

ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از بافت عضله بچه ماهی سفید در هر تیمار با محلول کلرید سدیم ۴۰ میلی مولار شستشو داده شد (۳ تا ۴ بار). پس از شستشوی نمونه‌ها، همگن سازی عضله‌ها به کمک ۱۰ حجم از بافر نمکی کلرید سدیم ۴۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۸ توسط دستگاه هموزنایزر (مدل IKA, ULTRA-TURRAX, Germany) صورت گرفت. سوسپانسیون‌های حاصله در دور ۱۸۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰°C سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب ته نشینی در این مرحله با بافر تریس هیدروکلراید اسید ۰/۶ مولار که حاوی ۲/۳ درصد دترجنت سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، ۱۰ درصد گلیسرول و مرکاپتواتانل (۵ درصد) می باشد به شکل سوسپانسیون تبدیل گردید. سوسپانسیون‌های حاصله در این مرحله در دمای ۱۰۰°C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. مجدداً نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی حاصل از این مرحله جدا گردیده و در فریزر ۲۰- نگهداری گردیدند (Chen *et al.*, 2014).

تعیین غلظت پروتئین

میزان پروتئین عضله همگن شده توسط روش برادفورد به کمک استاندارد آلبومین گاوی بر اساس روش برادفورد تعیین گردید (Bradford, 1976).

پایان دوره در تیمار غذایی فاقد روی به $1/12 \pm 0/05$ میلی گرم و در تیمارهای دارای مقادیر ۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم جیره به ترتیب به $1/24 \pm 0/02$ و $1/22 \pm 0/06$ میلی گرم رسید. اختلاف معنی داری بین دو جیره حاوی روی از لحاظ افزایش وزن مشاهده نگردید ($P > 0/05$).



شکل ۱: مقایسه میانگین افزایش وزن بچه‌ماهی سفید ($n=10$) تغذیه شده

با سطوح مختلف روی در دوره ۹۰ روزه آزمایش، (میانگین \pm خطای معیار)

نتایج میزان روی اندازه‌گیری شده در عضلات بچه‌ماهیان سفید در جیره‌های متفاوت در طی دوره آزمایش در جدول ۲ آورده شده است. با افزایش مقدار روی در جیره، غلظت روی در عضله افزایش یافت. بیش‌ترین مقدار روی ($5/3 \pm 0/02$ میکروگرم بر گرم) در آخر دوره پرورش در عضله بچه‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۲۰۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم غذا مشاهده گردید. بین میانگین مقدار روی عضله در ماه اول نسبت به ماه‌های دوم و سوم آزمایش در جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$).

۲۰۰ میلی گرم از بافت همگن‌شده (هموژنات) عضله بچه‌ماهی سفید، ۵۰ میلی مولار بافر ایمیدازول کلراید که حاوی ۵ میلی مولار EDTA، ۰/۱ میلی مولار فیل متیل سولفونیک فلوراید (PMSF) با pH برابر ۷/۵۶ بود، افزوده گردید. سپس سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از جمع‌آوری مایع رویی، میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز در درجه حرارت 25°C به وسیله اسپکتوفتومتر UV-Visible (مدل Jenway 6400, UK) در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

آنالیز آماری

وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 18) انجام گرفت. ابتدا وضعیت داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف (kolmogorov-Smirnov) برای نرمال بودن بررسی شد. جهت مقایسه کلی میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA One-Way Analysis of Variance) و مقایسه میانگین بین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple-range test) استفاده گردید.

نتایج

تأثیر مقادیر مختلف روی جیره بر افزایش وزن بچه‌ماهیان سفید در شکل ۱ آورده شده است. بچه‌ماهیان سفید در ابتدای دوره آزمایش دارای وزن اولیه $0/06 \pm 0/056$ گرم بودند که وزن نهایی آن‌ها در

جدول ۲: میانگین غلظت روی (Zn) بر حسب میکروگرم بر گرم در عضله بچه ماهی سفید ($n=10$) تغذیه شده با سطوح مختلف روی، در دوره ۹۰ روزه آزمایش، (میانگین \pm خطای معیار)

دوره آزمایش	جیره فاقد روی (شاهد)	جیره ۰/۰۰۵ درصد روی	جیره ۰/۰۲ درصد روی
شروع آزمایش	۰/۵۵ \pm ۰/۰۵ ^{aA}	۲/۹ \pm ۰/۰۴ ^{aB}	۳/۷ \pm ۰/۰۳ ^{aC}
۳۰ روز	۰/۵۸ \pm ۰/۰۳ ^{aA}	۳/۵ \pm ۰/۰۲ ^{bB}	۴/۸ \pm ۰/۰۱ ^{bC}
۶۰ روز	۰/۶۱ \pm ۰/۰۴ ^{aA}	۴/۳ \pm ۰/۰۳ ^{cB}	۵/۱ \pm ۰/۰۱ ^{bC}
۹۰ روز	۰/۵۸ \pm ۰/۰۲ ^{aA}	۴/۴ \pm ۰/۰۱ ^{cB}	۵/۳ \pm ۰/۰۳ ^{bC}

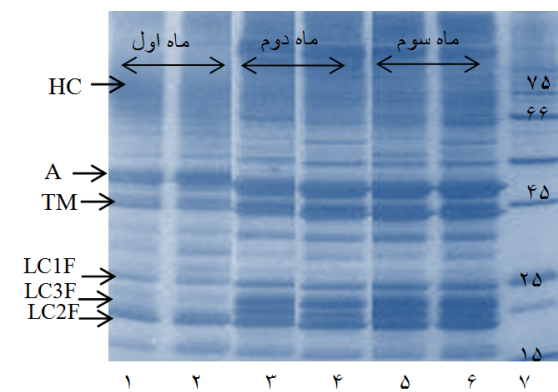
اعدادی که در هر ردیف (حروف بزرگ) و هر ستون (حروف کوچک) دارای حروف غیرمشابه هستند، اختلاف معنی دار دارند ($P < 0.05$)

پروتئین‌های میوفیبریلار عضله سفید در بچه ماهیان سفید شامل زنجیره‌های سنگین و سبک میوزین می‌باشند. در زنجیره سبک میوزین حضور سه بخش پروتئینی LC1F, LC2F, LC3F مشاهده می‌شود.

میزان مهاجرت بخش‌های پروتئینی زنجیره سبک میوزین بر روی الکتروفورز به ترتیب LC2F > LC3F > LC1F می‌باشد. افزایش در مقدار باندهای پروتئینی LC2F و LC3F از شروع ماه دوم تا پایان دوره مشاهده گردید. میزان بیان پروتئین‌ها در جیره حاوی روی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بیش‌تر از جیره حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم می‌باشد. استفاده از جیره حاوی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روی (Zn) تأثیری بر روی الگوی پروتئینی میوفیبریلار عضله سفید نداشت و شدت تراکم باندها مشابه با شدت تراکم باندها در شروع دوره آزمایش بود.

میانگین تغییرات آنزیم پیروات کیناز در بچه ماهیان سفید دارای فعالیت نسبتاً خوبی در طی دوره آزمایش بود. با افزایش سوبسترای فسفوانیول پیروات در طی سنجش فعالیت این آنزیم، سینتیک (سرعت) واکنش افزایش یافت. لذا فعالیت این آنزیم در بچه ماهیان سفید از مدل میکائلیس و منتون تبعیت می‌کند. میزان فعالیت آنزیم در هر سه تیمار پس از پایان دوره آزمایش به

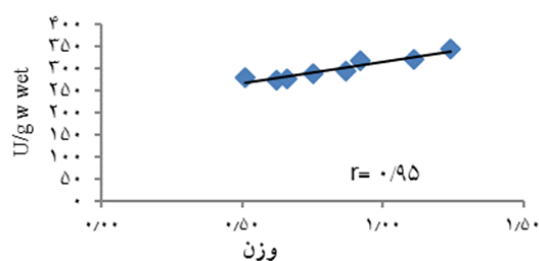
الگوی الکتروفورز پروتئین‌های میوفیبریلار عضله سفید بچه ماهی سفید در شکل ۲ آورده شده است. پروتئین‌های عضله متشکل از میوزین، تروپومیوزین و اکتین می‌باشد و باندهای ضعیف می‌تواند متعلق به تروپونین‌ها باشد.



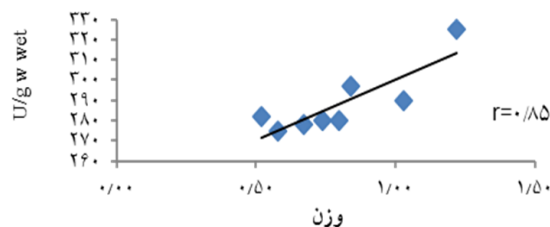
شکل ۲: الگوی الکتروفورز عضله سفید در بچه ماهیان سفید، ستون‌های ۱، ۳ و ۵ جیره حاوی روی ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم طی دوره آزمایش، ستون‌های ۲، ۴ و ۶ جیره حاوی ۵۰ میکروگرم روی بر کیلوگرم در طی دوره آزمایش، ستون ۷ مارکر پروتئینی با اوزان مولکولی ۱۵، ۲۵، ۴۵، ۶۶ و ۷۵ کیلودالتون. HC: زنجیره سنگین میوزین، A: اکتین، TM: تروپومیوزین، LC1F: زنجیره سبک میوزین ۱ سریع، LC2F: زنجیره سبک میوزین ۲ سریع و LC3F: زنجیره سبک میوزین ۳ سریع.

سریع.

میزان همبستگی این دو شاخص در تیمارهای حاوی روی ۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غذا به ترتیب برابر با ۰/۹۵ و ۰/۸۵ برآورد گردید (اشکال ۵ و ۶) به طوری که در جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم همبستگی بالاتری بین وزن و فعالیت آنزیم پیرووات کیناز بدست آمد.



شکل ۵: همبستگی بین فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و وزن بچه‌ماهی سفید در جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم غذا در دوره ۹۰ روزه آزمایش.

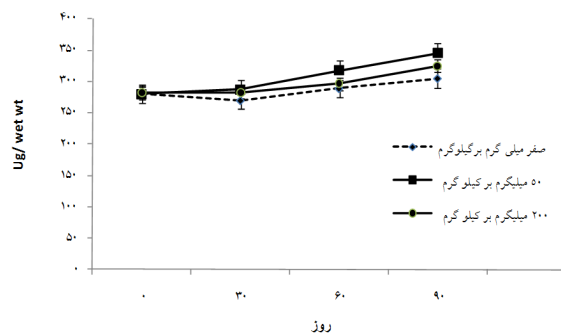


شکل ۶: همبستگی بین آنزیم پیرووات کیناز و وزن بچه‌ماهیان سفید در جیره حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم غذا در دوره ۹۰ روزه آزمایش.

بحث

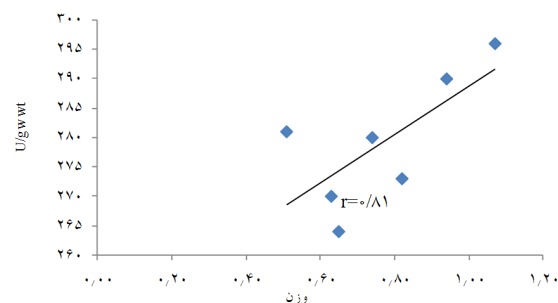
میوزین یک پروتئین هگزامر می‌باشد که دارای دو زنجیره سنگین (High chain:HC) با وزن ۲۰۰ کیلودالتون و ۴ زنجیره سبک (Light chain fast: LCF) با وزن ۱۵ تا ۳۰ کیلودالتون می‌باشد (Isani et al., 2004). زنجیره‌های سبک و سنگین میوزین توسط خانواده چند ژن کد می‌گردند. پیوستن این زیر واحدها

حداکثر مقدار رسید. بیش‌ترین مقدار فعالیت آنزیم پیرووات کیناز عضله بچه‌ماهی سفید مربوط به بچه‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم روی بر کیلوگرم غذا بود و اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با تیمارهای شاهد و تیمار غذایی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده گردید (شکل ۳).



شکل ۳: تغییرات آنزیم پیرووات کیناز در عضله بچه‌ماهیان سفید در تیمارهای شاهد (فاقد روی)، تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در دوره ۹۰ روزه آزمایش (میانگین ± خطای معیار).

نتایج همبستگی بین وزن و فعالیت آنزیم پیرووات کیناز در تیمار شاهد (جیره فاقد روی) نشان داد که بین این دو معیار همبستگی نسبتاً بالایی ($r=0/81$) وجود دارد (شکل ۴).



شکل ۴: همبستگی بین فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و وزن بچه‌ماهی سفید در جیره شاهد (فاقد روی) در دوره ۹۰ روزه آزمایش.

اختلاف برون گونه‌ای نیز در مقدار وزن مولکولی ظاهری و نیز میزان مهاجرت ایزوفرم‌های زنجیره سبک میوزین (LCF) در میان ماهیان مختلف مشاهده شده است.

در عضله بچه‌ماهیان سفید تغذیه شده با سطوح مختلف روی، حضور سه ایزوفرم زنجیره سبک سریع مشاهده می‌شود (شکل ۲) که ایزوفرم LC3F مهاجرت بیش تری نسبت به دو ایزوفرم دیگر LC2F و LC1F دارد و از وزن مولکولی پایین تری برخوردار است. افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار باندهای پروتئینی مربوط به ایزوفرم‌های LC3F و LC2F با شروع ماه دوم تا پایان دوره ۹۰ روزه آزمایش مشاهده گردید. مقدار بیان پروتئین‌ها در ایزوفرم LC3F و LC2F در جیره حاوی ۵۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم بیش تر از جیره حاوی ۲۰۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم بود. با استفاده از واکنش‌های شیمیایی که بین ایزوفرم‌های پروتئینی عضله با آنتی‌بادی‌های اختصاصی آن‌ها صورت می‌گیرد می‌توان با روش بلاتینگ حضور این باندهای جدا شده در الکتروفورز را تأیید کرد. چنان که در تحقیقات انجام شده توسط Isani و همکاران (۲۰۰۴)، حضور ایزوفرم‌های LC3F و LC2F جدا شده از عضله ماهی سیم به کمک آنتی‌بادی اختصاصی (آنتی میوزین) مشخص گردید.

وزن مولکولی LC3F با توجه به الگوی الکتروفورز برای گونه‌های مختلف ماهیان بین ۱۴ تا ۱۹ کیلودالتون گزارش شده است (Beaulieu and Guderley, 1998; Ochiai et al., 1990). در مطالعه حاضر وزن مولکولی LC3F عضله بچه‌ماهیان سفید نیز در همین محدوده قرار گرفته است. تفاوت‌های مشاهده شده در میزان مهاجرت ایزوفرم‌ها، در پستان‌داران و نیز در گونه‌های

به یکدیگر منجر به شکل‌گیری ایزوفرم‌های میوزین می‌گردد (Wakeling et al., 2000; Yuan et al., 2013). رشد و نمو بافتی وابسته به سنتتیز ایزوفرم‌های پروتئینی در عضله می‌باشد و میزان مهاجرت الکتروفورزی ایزوفرم‌های زنجیره سبک و سریع میوزین به عنوان شاخص مناسب جهت رشد عضله در نظر گرفته شده است (Isani et al., 2003).

در پستان‌داران فیبرهای عضلانی سریع اسکلتی، توسط ۲ ایزوفرم زنجیره سبک LC1F و LC3F مشتق شده از یک ژن منفرد که در انتهای C دارای ۱۴۱ اسید آمینه می‌باشد، تشکیل گردیده است (Periasamy et al., 1984). توالی اسیدهای آمینه انتهای N از اگزون ۱ و ۴ و نیز از اگزون‌های ۲ و ۳ منجر به شکل‌گیری به ترتیب LC1F و LC3F می‌گردد (Isani et al., 2000).

مهاجرت الکتروفورتیک ایزوفرم LC3F در ماهیان اندک می‌باشد. بنابراین از وزن مولکولی بیش تری نسبت به ایزوفرم پستان‌داران برخوردار است (Isani et al., 2004). تفاوت دیگر ایزوفرم LC3F ماهیان با ایزوفرم پستان‌داران کد شدن این زنجیره سبک با ژن جداگانه‌ای می‌باشد که برای نخستین بار توالی اسید آمینه این ایزوفرم در ماهی گونه *Mugil capito* (Dalla Libera et al., 1991) و متعاقباً با کلونینگ cDNA در کپور معمولی *Cyprinus Carpio* (Hirayama et al., 1997) مشخص شد، احتمالاً با توجه به این حقیقت که ایزوفرم LC3F در ماهیان توسط یک ژن اختصاصی کد می‌گردد. بنابراین تفاوت‌های بارزی در خصوص این ایزوفرم در الگوی الکتروفورز تک‌بعدی و هم الکتروفورز دوبعدی ماهیان گزارش گردیده است (Wantabe et al., 1984).

مختلف ماهیان می‌تواند ناشی از حضور اسیدهای آمینه خاصی باشد که در مقدار بار سطحی پروتئین تأثیر گذاشته و منجر به افزایش حرکت بیش‌تر نوع خاصی از ایزوفرم زنجیره سبک در الکتروفورز می‌گردد. این مسئله در خصوص ایزومر LC1F پستان‌داران نیز مشاهده شده است. حضور اسیدهای آمینه‌ای مانند آلانین و پرولین در انتهای N منجر به تحرک بیش‌تر ایزوفرم LC1F در الکتروفورز می‌شود. در ماهیانی مانند مارماهی، گویی و سیم‌دریائی میزان تحرک الکتروفورزی این ایزوفرم‌ها به شکل $LC1F > LC2F > LC3F$ گزارش شده است (Huriaux and Focant, 1990; Meton *et al.*, 1999; Rowleron *et al.*, 1985) درحالی‌که در ماهی‌پلائی (*Carassius auratus*) این روند به شکل $LC3F > LC2F > LC1F$ می‌باشد (Rowleron *et al.*, 1985). از عوامل مؤثر دیگر در میزان تحرک ایزوفرم‌ها در الکتروفورز، شرایط زیست‌محیطی می‌باشد. سازگاری ماهیان با شرایط زیست‌محیطی حاکم در محل زندگی آن‌ها، منجر به شکل‌گیری و بروز دسته‌ای از ژن‌های متفاوت می‌شود (Wakeling *et al.*, 2000). تأثیر سطوح مختلف روی در جیره بر مقدار روی در بدن ماهیان مختلف می‌تواند متفاوت باشد (Luo *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012) اگرچه میزان غلظت روی در کل بدن ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی روی تحت تأثیر مقدار روی در جیره قرار می‌گیرد اما مقدار روی در بافت‌های نرم مانند بافت عضله، بافت قلب و مغز تقریباً یکنواخت است (Chen *et al.*, 2014). میزان روی اندازه‌گیری شده در عضله بچه‌ماهیان سفید پس از گذشت یک ماه از دوره آزمایش افزایش پیدا نمود. در بچه‌ماهیان سفید، با بالا رفتن سطوح روی در جیره، میزان روی در عضله

اندکی افزایش یافته و تا پایان دوره نوسانات اندکی مشاهده گردید. عدم مشاهده نوسانات زمانی وابسته به تغذیه در جیره‌های حاوی روی در عضله بچه‌ماهیان سفید می‌تواند ناشی از حضور سیستم‌های کنترل یکنواخت باشد که وظیفه آن‌ها تنظیم مقدار فلزات دوظرفیتی از طریق سیستم‌های ورودی و خروجی برای کاتیون‌های دوظرفیتی است (Carpenè *et al.*, 1998). البته کاهش و یا عدم حضور بیوسنتز متالوتیونین‌ها می‌تواند از عوامل کاهش تجمع زیستی فلزات در بافت نرم باشد. به‌علاوه شرایط زیست‌محیطی و میزان فعالیت‌های انجام‌شده توسط ماهیان مانند شنا، می‌تواند منجر به تغییراتی در میزان روی گردد. چنان‌که در ماهی سیم‌دریایی تفاوت‌هایی در میزان روی در عضله ماهی سیم‌پرورشی و گونه وحشی آن مشاهده گردید (Himeno 2002). آنزیم پیرووات‌کیناز از پارامترهای بیوشیمیایی مهمی می‌باشد که جهت نشان دادن ارتباط بین میزان تولید انرژی، انرژی مصرفی در طی شنا و سنتز پروتئین به کار می‌رود (Yuan *et al.*, 2013). مقدار انرژی خروجی از عضلات اسکلتی توسط هیدولیز ATP و با کمک آنزیم میوزین ATPase انجام می‌گیرد (Haagensen *et al.*, 2008; Couture *et al.*, 1998). میزان فعالیت آنزیم پیرووات‌کیناز در عضلات بچه‌ماهیان سفید مورد آزمایش تغذیه‌شده با سطوح مختلف روی مانند سایر آنزیم‌های مسیر گلیکولیز (تجزیه‌کننده گلوکز) نسبتاً زیاد بود. در ماهیان فعالیت آنزیم پیرووات‌کیناز در عضله می‌تواند متأثر از مکانیسم‌های تنظیمی و سرعتی (سینتیک) باشد. به‌طور مثال در ماهیانی مانند *Mugil lisa* و *Caetoditerus faber*، آنزیم پیرووات‌کیناز از مکانیسم‌های تنظیمی تبعیت کرده و به شکل L-type در کبد پستان‌داران

وزن، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کیفیت بهتر پروتئین عضله در جیره حاوی ۱۲۷ میلی گرم روی بر کیلوگرم غذا نسبت به سایر جیره‌های مورد مطالعه (مقادیر ۳۱ تا ۲۲۷ میلی گرم روی بر کیلوگرم غذا) گزارش شده است (Li and Huang, 2015).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد اگرچه افزودن ۲۰۰ میلی گرم روی به جیره، منجر به افزایش غلظت روی در بافت عضله می‌گردد اما میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و افزایش وزن در جیره حاوی ۵۰ میلی گرم روی (Zn) بر کیلوگرم غذا بهبود یافته چنان‌که شدت تراکم باندهای مربوط به زنجیره سبک و سنگین میوزین در این جیره بیش‌تر شده است که می‌تواند بیان‌گر ارزش غذایی بهتر این سطح از روی در جیره، برای بچه‌ماهی سفید باشد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان جهت فراهم نمودن اعتبار مالی برای اجرای این طرح سپاس گزاریم.

منابع

۱. طهامی، ف.، قیاسی، م.، ۱۳۹۲. مقایسه فاکتورهای زیست‌سنجی و پروتئین سرم خون ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در مصب و رودخانه‌های تجن و شیروود. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۷ (۳)، ۳۱-۲۳.
۲. ولی پور، ع. ر.، خانی پور، ع. ا.، ۱۳۹۲. زی فن تکثیر مصنوعی ماهی سفید (*Rutilus frisii*) فرم پائیزه دریای خزر. نشریه توسعه آبرزی پروری، ۹ (۴)، ۸۸-۷۵.
۳. نویریان، ح.، مصطفی‌زاده، س.، طلوعی، م.، ۱۳۸۳. بررسی اثرات سطوح مختلف پروتئین بر روی معیارهای شاخص رشد بچه ماهی سفید با بهره‌گیری از

شبهات دارد (Radaelli et al., 2003). در صورتی که در سایر ماهیان این آنزیم از مدل سینتیک میکائیلیس و منتون تبعیت می‌کند و نسبت به تنظیم‌کننده‌های عکس‌العمل ضعیف نشان می‌دهد و لذا قابلیت قیاس با ایزوفر م MI در عضلات اسکلتی، قلب و مغز پستان‌داران را دارا می‌باشد (Couture et al., 1998).

در عضلات بچه‌ماهیان سفید، فعالیت آنزیم پیرووات کیناز از منحنی‌های اشباعی نسبت به سوبسترای واکنش (فسفو انول پیرووات) تبعیت می‌کند. بنابراین، این آنزیم در بچه‌ماهیان سفید دارای مدل سینتیک میکائیلیس و منتون می‌باشد. میزان این آنزیم در پایان دوره آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده که در همین زمان نیز وزن بدن ماهیان تقریباً به دو برابر وزن اولیه رسید. نتایج حاصل از آزمون همبستگی میان افزایش وزن و فعالیت آنزیم پیرووات کیناز حاکی از آن است که همبستگی مثبت و معنی‌داری میان این دو معیار در بین تیمارها وجود دارد و میزان این همبستگی در تیمار حاوی ۵۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم غذا نسبت به تیمار دیگر قوی‌تر می‌باشد ($P < 0.05$ ، $r = 0.95$). در بچه‌ماهیان تغذیه‌شده با این جیره (۵۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم)، سنتز پروتئین‌ها با توجه به الگوی الکتروفورز اندکی بیش‌تر و نرخ فعالیت آنزیم پیرووات کیناز نیز بهبود یافته بود در صورتی که در تیمار دیگر (۲۰۰ میلی گرم روی) افزایش کم‌تری در میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. در ماهی سیم‌دریایی نیز بهترین همبستگی بین میزان فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و افزایش وزن در جیره ۱۲۰ میلی گرم روی بر کیلوگرم غذا نسبت به جیره ۲۴۰ میلی گرم روی مشاهده شده است (Isani et al., 2004). در تیلایای هیبرید افزایش

- chain originate from two different genes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 12, 366-371.
14. Eide, D.J., 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 711-722.
 15. Feng L., Tan, L.N., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W.D., Hu, K., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2011. Influence of dietary zinc on lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant defence of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio var. Jian*). *Aquaculture Nutrition*, 17, 875-882.
 16. Gropper, S.S., Smith, J.L., Groff, J.L., 2005. Microminerals. In: *Advanced Nutrition and Human Metabolism* (Gropper, S.S., Smith, J.L. & Groff, J.L. eds), 4th edn, Thomson Wadsworth, Belmont. 417-478.
 17. Haagensen, L., Jensen, D.H., Gesser, H., 2008. Dependence of myosin-ATPase on structure bound creatine kinase in cardiac myofibrils from rainbow trout and freshwater turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 150(4), 404-9.
 18. Hidalgo, M.C., Exposito, A., Palma, M.G., Higuera, M.d., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 183-193.
 19. Himeno, S., 2002. Application of metallothionein null cells to investigation of cadmium transport. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88, 207-212.
 20. Hirayama, Y., Watabe, S., 1997. Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle. *The FEBS Journal*, 246(2), 380-387.
 21. Huriaux, F., Focant B., 1990. Light chains of eel myosin isolation and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95(B), 269-274.
 22. Isani, G., Andreani, G., Monari, M., Dalla Libera, L., Carpenè, E., 2000. Biochemical changes in gilthead sea bream white muscle during post-larval growth. *Basic and Applied Myology*, 10(6), 285-290.
 23. Isani, G., Andreani, G., Monari, M., Carpenè, E., 2003. Metal concentrations (Cu, Zn and Cd) and metallothionein expression in *Sparus aurata* exposed to waterborne copper. *Journal of Trace Element Med ecine Biology Supplement*, 1, 17-23.
 24. Isani, G., Andreani, G., Monari, M., Carpenè, E., 2004. Zn, Cu, Pyruvate Kinase and Myosin in White Muscle of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 14, 366-371.
- وزارت جهاد کشاورزی، ۶۸، ۵۹-۶۸.
۴. نویریان، ح.، زحمتکش، ع.، زمانی، ح.، قناعت پرست، ا.، ۱۳۸۶. تعیین سطح مطلوب پیش مخلوط ویتامینی در جیره غذایی بچه ماهی سفید دریای خزر. *نشریه علمی پژوهشی دام و آبزیان وزارت جهاد کشاورزی*، ۷۹، ۱۶۹-۱۷۳.
 5. Ahmadian, E., Malekzadeh Viayah R., Zahmatkesh, A., 2015. Caspian whitefish (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky, 1901) a potential aquaculture candidate: study on the cumulative effects of salinity and temperature on culture performance. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(3), 623-633.
 6. Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
 7. Buentello, J.A., Goff, J.B., Gatlin III, D.M., 2009. Dietary zinc requirement of hybrid striped bass, *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*, and bioavailability of two chemically different zinc compounds. *Journal of World Aquaculture Society*, 40, 687-694.
 8. Beaulieu, M.A., Guderley, H., 1998. Changes in qualitative composition of white muscle with nutritional status of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121(A), 135-141.
 9. Carpenè, E., Martin, B., Dalla Libera, L., 1998. Biochemical differences in lateral muscle of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 229-238.
 10. Chen, H.Y., Cheng, Y.C., Hu, L.C., Chen, M.H., 2014. Dietary zinc requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 432, 360-364.
 11. Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., 2002. Bioavailability and toxicity of diet borne copper and zinc to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132(C), 269-313.
 12. Couture, P., Dutil, J.D., Guderly, H., 1998. Biochemical correlates of growth and condition in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Sciences*, 55, 1591-1598.
 13. Dalla Libera, L., Carpenè, E., Theibert, J., Collins, J. H., 1991. Fish myosin alkali light

34. Periasamy, M., Strehler, E. E., Garfinkel, L.I., Gubits, R. M., Ruis-Opaso, N., Nadal-Ginard, B., 1984. Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 13595-13604.
35. Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M., Funkenstein, B., 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell Tissue Research*, 311, 239-250.
36. Rowlerson, A., Scapolo, P.A., Mascarello, F., Carpené, E., Veggetti, A., 1985. Comparative study of myosins present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *Journal of Muscle Research Cell Mitogen*, 6, 601-640.
37. Scarpa, J., Gatlin, D.M., 1992. Dietary zinc requirements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, swim up fry in soft and hard water. *Aquaculture*, 106, 311-322.
38. Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151, 185-207.
39. Wakeling, J.M., Cole, N.J., Kemp, K.M., Johnston, I.A., 2000. The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp *Cyprinus carpio*. *American Journal of Physiology*, 279, 657-665.
40. Welker, T., Barrows, F., Overturfl, K., Gaylord, G., Sealey, W., 2016. Optimizing zinc supplementation levels of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed practical type fishmeal- and plant-based diets. *Aquaculture Nutrition*, 21(1), 91-108.
41. Wu, Y.P., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y., Jiang, J.J., Li, S.H., 2015. Influence of dietary zinc on muscle composition, flesh quality and muscle antioxidant status of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Research*, 46, 2360-2373.
42. Yuan, X., Zhou, X. F., Liang, J. J., 2013. Molecular cloning, expression and activity of pyruvate kinase in grass carp *Ctenopharyngodon idella*: effects of dietary carbohydrate level. *Aquaculture*, 410, 32-40.
25. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
26. Li, M.R., Huang, C.H., 2015. Effect of dietary zinc level on growth, enzyme activity and body trace elements of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed soya bean meal-based diets. *Aquaculture Nutrition*, 22(6), 1320-1327.
27. Liang, J.J., Yang, H.J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Liang, G.Y., 2012. Dietary zinc requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on growth and mineralization. *Aquaculture Nutrition*, 18, 380-387.
28. Lin, Y.H., Jiang, L.C., Shiau, S.Y., 2008. Dietary zinc requirements of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* & *O. aureus*. *Journal of Fisheries Society of Taiwan*, 35, 117-125.
29. Luo, Z., Tan, X.Y., Zheng, J.L., Chen, Q.L., Liu, C.X., 2011. Quantitative dietary zinc requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on hepatic intermediary metabolism and antioxidant responses. *Aquaculture*, 319, 150-155.
30. Maret, W., KrEi, A., 2007. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein in health and disease. *Molecular Medicine*, 13, 371-375.
31. Marras, S., Killen, S.S., Domenici, P., Claireaux, G., McKenzie, D.J., 2013. Relationships among Traits of Aerobic and Anaerobic Swimming Performance in Individual European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *PLoS ONE*, 8(9), e72815.
32. Meton, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Canto, E., Fernandez, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition*, 82, 223-232.
33. Ochiai, Y., Kobayashi, T., Watabe, S., Hashimoto, K., 1990. Mapping of fish myosin light chains by two dimensional gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95(B), 341-345.