



## تأثیر پروبیوآنزیم جیره بر فعالیت آنزیم‌های هضمی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

محمد حسین پور<sup>۱\*</sup>، ولی اله جعفری<sup>۲</sup>، عباسعلی زنده بودی<sup>۳</sup>، عبدالمجید حاجی مرادلو<sup>۴</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۲- استادیار، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳- کارشناسی ارشد، گروه شیلات، پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر

۴- استاد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۱۸

\*نویسنده مسئول مقاله: mohammad.hosseinpour64@gmail.com

### چکیده:

تأثیر یک مکمل پروبیوآنزیمی شامل ۶ نوع آنزیم هضمی و ۴ نوع باکتری پروبیوتیکی در چهار سطح صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ گرم در کیلوگرم جیره میگوی جوان وانامی و در سه تکرار، باهدف سنجش استفاده همزمان باکتری‌های پروبیوتیکی و آنزیم‌های هضمی جیره بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (روده) بررسی شد. در هر آکواریوم ۱۵ قطعه میگو با میانگین وزنی (۵/۰۴±۰/۳۹) گرم به‌طور تصادفی توزیع و به مدت ۳۰ روز تغذیه شدند. نتایج در پایان دوره بیانگر تفاوت‌ترشد معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) <میگوی تغذیه‌شده با ۰/۵ گرم مکمل نسبت به سایر تیمارها بود. همچنین، فعالیت آمیلاز و لیپاز بیشتری در تیمار ۰/۵ گرم مکمل نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد. از لحاظ فعالیت ویژه پروتئاز، تفاوت معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) در تیمار ۱ گرم مکمل نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. نتایج نشان داد لزوماً با افزایش غلظت باکتری‌های پروبیوتیکی و آنزیم‌های هضمی مکمل، فعالیت همه آنزیم‌های هضمی افزایش نمی‌یابد. بنابر این، پروبیوتیک و آنزیم در غلظت‌های معینی دارای تأثیر مثبت بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی میگو می‌باشد.

**کلید واژگان:** پروتئاز، لیپاز، آمیلاز، پروبیوآنزیم، میگوی وانامی

شود (Ghosh et al., 2001; Stone et al., 2003; Kumar et al., 2006) همچنین مطالعات (carter, 1992) نشان داد استفاده از مکمل تک آنزیمی آلفا آمیلاز باعث عملکرد رشد ضعیف در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (salmon parr) می‌گردد؛ درحالی‌که در مطالعات بعدی (carter, 1994) نشان داد که استفاده از مکمل‌های مولتی آنزیم در جیره حاوی پودر سویا سبب بهبود عملکرد رشد و FCR در این ماهی می‌شود.

باکتری‌های پروبیوتیکی مکمل‌های غذایی میکروب زنده‌ای هستند که با بهبود تعاد لمیکروبی روده میزبان تأثیرات سودمندی برای آن ایجاد می‌کند (fuller, 1989). از آنجا که باکتری‌های باسیلوسی طیف گسترده‌ای از آنزیم‌ها را ترشح می‌کنند، این باکتری‌ها با نام معروف پروبیوتیک به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند (Moriarty, 1996). بیشترین فعالیت آنزیم‌های هضمی در میگو در زمان لاروی است که پروبیوتیک‌ها می‌توانند بیشترین تأثیر را داشته باشند (Lovett and Felder, 1990; Kamarudin et al., 1994). مطالعات گذشته نشان دادند زمانی که باکتری‌های باسیلوسی به‌عنوان پروبیوتیک در پرورش میگو استفاده می‌شود، این باکتری‌ها سبب افزایش رشد و بقا و فعالیت آنزیم‌های هضمی شده و قابلیت هضم مواد غذایی را بالا می‌برند (Rengpipat et al., 1998; Lin et al., 2004 and Ziaei-Nejad et al., 2006). همچنین Ahmadnia و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که استفاده از سطوح مختلف باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های هضمی و افزایش رشد می‌شود.

باکتری‌های پروبیوتیکی و آنزیم‌های هضمی مکمل‌های غذایی هستند که در جیره غذایی آبزیان پرورشی به‌کار می‌روند. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی استفاده

یکی از مشکلات بزرگ آبی‌پروری هزینه بالای تهیه غذا و همچنین نگرانی از بازده کم غذا در برابر این هزینه سنگین است. درواقع هدف ما بالاترین استفاده از تمامی اجزای موجود در جیره غذایی برای رسیدن به بهترین بازده در برابر هزینه صرف شده و درنهایت تولید بالاست. افزایش قابلیت هضم غذا نه تنها سبب کاهش هزینه‌ها به‌ازای هر واحد تولیدشده، بلکه سبب کاهش آلودگی محیط پرورشی آبی و جلوگیری از ایجاد بیماری می‌شود. استفاده از مکمل‌های آنزیمی سبب افزایش قابلیت هضمی و بازده بالای مواد غذایی جیره در حیوانات خشکی و آبزیان می‌گردد (wenk, 1992). آنزیم‌های هضمی گروهی از آنزیم‌ها هستند که با شکستن مولکول‌های پلیمری به اجزای کوچک‌تر سبب تسهیل در جذب آنها توسط دستگاه گوارش موجود زنده می‌شوند. در مطالعات اخیر نقش مثبت آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز در استفاده بیشتر از مواد غذایی در جیره آبزیان به اثبات رسیده است (Deshimaru, 1981). برخی از تحقیقات نشان دادند که با توجه به کمبود یا نبود برخی از آنزیم‌های هضمی در مراحل از زندگی موجود زنده مانند مراحل لاروی، استفاده از آنزیم‌های مکمل هضمی در جیره غذایی در این مراحل باعث جبران کمبود این آنزیم‌ها و همچنین افزایش ظرفیت هضمی در مراحل جوانی می‌شوند (Dabrowska et al., 1979; Kolkovski et al., 1993). همچنین Maugle و همکاران (۱۹۸۳ a) نشان دادند که استفاده از آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز در جیره غذایی میگوی *P. japonicas* سبب اصلاح کارایی هضمی می‌شود. برخی مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از مکمل آنزیمی آلفا آمیلاز در جیره غذایی ماهی و میگو، می‌تواند باعث بهبود عملکرد رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی

### طراحی آزمایش و آماده سازی تیمارها

این آزمایش در پژوهشکده میگوی کشور (بوشهر) انجام شد. برای انجام آزمایش، میگوهای جوان وانامی با میانگین وزن اولیه ( $5/0 \pm 0/39$ g) از مرکز تحقیقات بندرگاه هله استان بوشهر تهیه شدند. پس از انتقال میگوها به سوله، آزمایش سازگاری دمایی و شوری به مدت ۵ ساعت انجام گرفت. سپس برای سازگاری با شرایط جدید، میگوها در مخازن فایبرگلاس به مدت یک هفته در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد در آب فیلتر شده با شوری  $30 \text{ g l}^{-1}$  همراه با هوادهی مناسب ذخیره سازی و با غذای پایه کنسانتره تغذیه شدند. پس از دوره سازگاری، میگوهای جوان را به صورت تصادفی انتخاب و در ۱۲ آکواریوم به تعداد ۱۵ عدد در هر آکواریوم با حجم ۲۰۰ لیتر آب ذخیره ساز شدند. مواد زائد حاصل از فضولات میگو و غذای اضافی خورده نشده به صورت هر ۲ روز یک بار از آکواریوم ها تخلیه می شد.

در طول آزمایش هوادهی آکواریوم ها به صورت یکنواخت و مداوم به وسیله هواده مرکزی و سنگ هوا انجام می گرفت. طراحی آزمایش به صورت ۴ تیمار با ۳ تکرار برای هر تیمار انجام شد و همه گروه های آزمایشی به مدت یک هفته با جیره های غذایی تهیه شده مخصوص هر تیمار غذادهی شدند. غذادهی به میزان ۷ درصد وزن بدن میگوها و ۳ بار در روز انجام گرفت و برای محاسبه میزان غذای مورد نیاز میگوها هر هفته از ۳۵ درصد میگوهای هر تکرار زیست سنجی به عمل آمد.

برای کنترل شرایط مناسب آزمایش، دما به صورت روزانه اندازه گیری و با بالا رفتن شوری بر اثر تبخیر آب، به طور مداوم شوری به وسیله آب شیرین به  $30 \text{ g l}^{-1}$  کاهش

ترکیبی از باکتری های پروبیوتیکی و آنزیم های هضمی در جیره غذایی آبزیان به ویژه میگوی پرورشی انجام نشده است، در این مطالعه ترکیبی به نام پروبیوآنزیم، که مخلوطی از ۶ نوع آنزیم هضمی و ۴ نوع باکتری پروبیوتیکی است، آزمایش شد تا روشن شود که آیا غلظت های مختلفی از این ترکیب می تواند تأثیری بر فعالیت آنزیم های هضمی در میگوی وانامی جوان داشته باشد و در نهایت سبب رشد بیشتر گردد.

### مواد و روش ها

#### ترکیب باکتری و آنزیم

در این مطالعه مکمل تجاری پروبیوآنزیم حاوی ۴ سویه از باکتری های پروبیوتیکی (*b.subtilis*, *b.licheniformis*, *enterococcus faecium*, *lactobacillus acidophilus*) و ۶ نوع آنزیم هضمی به صورت پتانسیل مشترک در تغذیه میگوی وانامی جوان مطالعه شد. این مکمل از شرکت xvet آلمان خریداری و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان مصرف نگهداری شد. محتوای پروبیوتیکی و آنزیمی این مکمل به صورت  $1 \text{ g kg}^{-1}$  از پروبیوآنزیم در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ ترکیبات تشکیل دهنده پروبیوآنزیم (به ازای یک گرم).

| Bacteria strains                                         | CFU <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Bacillus Licheniformis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> | $2 \times 10^7$                  |
| <i>Enterococcus faecium</i>                              | $2 \times 10^7$                  |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>                         | $2/5 \times 10^7$                |
| enzymes                                                  | U <sup>**</sup> g <sup>-1</sup>  |
| $\beta$ -Glucanase EC 3.2.1.4                            | ۸۰۰                              |
| $\beta$ -Glucanase EC 3.2.1.6                            | ۴۵۰                              |
| $\beta$ -Xylanase EC 3.2.1.8                             | ۴۰۰۰                             |
| $\alpha$ -Amylase EC 3.2.1.1                             | ۱۴۸/۵                            |
| Protease                                                 | ۲۴۷۴                             |
| Cellulase                                                | ۸۰۰                              |

\* واحد تشکیل دهنده کلونی که برآورد تقریبی از تعداد باکتری های زنده موجود در سلول نمونه است.

\*\* واحد گزارش آنزیم، که ۱ واحد آن برابر است با ۱/۶ میکروکاتال.

آون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد استفاده و رطوبت جیره به ۱۰ درصد کاهش یافت. در پایان جیره‌های تهیه شده را در یخچال در دمای ۴- درجه سانتی گراد تا زمان مصرف ذخیره‌سازی شدند.

جدول ۲ آنالیز تقریبی جیره آزمایشی (درصد)

| آنالیز تقریبی | درصد |
|---------------|------|
| پروتئین خام   | ۳۸/۲ |
| چربی          | ۹/۲  |
| خاکستر        | ۱۴/۲ |
| رطوبت         | ۱۰/۱ |

#### محاسبه نرخ رشد و بقا و میزان بهره‌وری از غذا

در پایان آزمایش عملکرد رشد و بقا و میزان بهره‌وری از جیره بر طبق روش (Felix and Sudharsan, 2004) و Venkat و همکاران (2004) مطابق معادلات زیر انجام گرفت:

نرخ رشد ویژه (SGR) = طول دوره پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن نهایی)  $\times 100$   
 وزن به دست آمده (گرم) = (وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم))  
 نرخ بقا (درصد) = (تعداد نهایی / تعداد اولیه)  $\times 100$   
 ضریب تبدیل غذایی = (غذای خورده شده (گرم) / وزن به دست آمده (گرم))

#### آماده‌سازی نمونه‌ها برای بررسی‌های آنزیمی

برای محاسبه میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های هضمی، ۴۸ ساعت پیش از نمونه‌برداری تغذیه میگوها متوقف شد. سپس ۶ عدد میگو از هر آکواریوم به صورت تصادفی انتخاب (بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح) و روده میگوها روی یخ (برای به حداقل رساندن فعالیت آنزیمی در دمای ۴ درجه سانتی گراد) به دقت جدا و پس از تخلیه مواد

داده شد. علاوه بر این، pH و اکسیژن هر دو روز یک بار در ساعت ۷:۳۰ صبح اندازه‌گیری می‌شد که طی این مدت متوسط اکسیژن محلول حدود  $7/6 \text{ mg l}^{-1}$ ، pH:  $8/1-8/4$  و تغییرات دمایی در حدود ۳۱-۳۲ درجه سانتی گراد ثبت گردید. همه این فاکتورها به وسیله دستگاه HQ30d HACH kits (HACH Co., Loveland, CO, USA) اندازه‌گیری شد.

برای تهیه تیمارهای آزمایشی از جیره تولیدی شرکت هووراش بوشهر به عنوان جیره پایه استفاده شد. آنالیز تقریبی جیره (جدول ۲) شامل (پروتئین خام، چربی، رطوبت و خاکستر) به وسیله روش استاندارد (AOAC, 1995) انجام گرفت. بر این اساس، میزان پروتئین خام جیره با استفاده از روش اندازه‌گیری نیتروژن به وسیله روش میکروکجلدال انجام شد. همچنین اندازه‌گیریمحتوای چربی با دستگاه سوکسله با روش استخراج (حلال اتر) صورت گرفت. برای محاسبه میزان خاکستر لاشه نیز از آون مخصوص با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد.

به منظور تهیه تیمارهای آزمایشی از ترکیب پروبیوآنزیم، بر اساس غلظت‌های پیشنهادی درج شده بر روی این محصول از سه غلظت مختلف (T-1,  $1/0 \text{ g kg}^{-1}$ ; T-2  $0/5$  (T-3  $0/25 \text{ g kg}^{-1}$  در جیره پایه و گروه شاهد فاقد هرگونه ماده پروبیوآنزیم استفاده شد. جیره غذایی برای تیمارهای آزمایشی به صورت هر ۲ روز یک بار تهیه می‌شد تا کیفیت آنزیم‌ها و باکتری‌های موجود در جیره حفظ شود. پلت‌های غذایی با دستگاه آسیاب پودر شده سپس در ۱۰۰ ml آب مقطر گرم مخلوط کرده تا خمیر سفتی حاصل شود و با عبور دادن خمیر به دست آمده از توری با چشمه  $1/5 \text{ mm}$  جیره به صورت رشته‌ای حاصل شد. در مرحله بعد برای خشک کردن جیره و کاهش رطوبت آن از دستگاه

غذایی باقی‌مانده در روده، با آب مقطر خنک شستشو داده شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده را به‌دقت توزین و سپس با نسبت وزنی به حجمی ۱ w/v به ۵ با NaCl ۲/ مولار مخلوط و در داخل ویال ۱ ml قرار داده و در حضور یخ عمل یکنواخت‌سازی با هموژنایزر (اکوسندر مدل UP200H) انجام شد. سوسپانسیون به‌دست‌آمده در دور ۵۰۰۰ g و با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از انجام سانتریفیوژ مایع سوپرناتانت (مایع بالای ویال) را به‌دقت با سمپلر جدا کرده داخل ویال‌های تمیز ریخته و نمونه‌ها به سرعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Ding et al, 2004).

#### محاسبه فعالیت آنزیم‌های هضمی

فعالیت آنزیم لپاز به‌وسیله روش Lorentz (۱۹۹۸) و با استفاده از روش رنگ سنجی آنزیم با دستگاه اسپکتوفتومتر (طول موج ۵۸۰ نانومتر)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از نیتروفنیل به‌عنوان سوبسترا توسط اختلاف جذب نوری محاسبه گردید. فعالیت آنزیم آمیلاز با به‌کارگیری روش Bernfeld (۱۹۵۵) به‌وسیله نشاسته محلول به‌عنوان سوبسترا با ۵۳ دی نیتروسالسیلیک اسید انجام شد. فعالیت آنزیم پروتئاز با روش Anson (۱۹۳۸) با استفاده از کازئین به‌عنوان سوبسترا با معرف فولین انجام گرفت. فعالیت آنزیم‌های هضمی به‌وسیله اسپکتوفتومتر مدل spectra max 190 و پروتئین کل نیز با استفاده از آلبومین سرم گاو به‌عنوان استاندارد با روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

در این آزمایش داده‌های به‌دست‌آمده از فعالیت آنزیم‌های هضمی با نرم افزار Spss, version 17 و از طریق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن و در سطح معناداری ۵ درصد مقایسه شدند.

#### نتایج

##### عملکرد رشد و بقا

در این آزمایش تأثیر تیمارهای حاوی پروبیوآنزیم بر عملکرد رشد و بقا نیز در میگوی وانامی جوان بررسی شد. شاخص‌های رشد شامل (وزن اولیه، وزن نهایی، افزایش وزن، FCR، SGR، طول کارپاس، طول کل و درصد بقا) در جدول ۳ نشان داده شده است. در پایان آزمایش مشاهده شد که هیچ تفاوت معناداری ( $p > 0.05$ ) در نرخ بقا در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی حاصل نشده است؛ هرچند تیمارهای T-2 و T-3 هیچ تلفانی نداشتند. همچنین تفاوت معناداری در وزن نهایی به‌دست‌آمده از تیمار شاهد و T-1 مشاهده نشد و در مقابل میگوهای جوان تغذیه شده با تیمار T-2 و T-3 بیشترین وزن نهایی را داشته و بهترین عملکرد رشد مربوط به تیمار T-2 است (جدول ۳). افزایش وزن نیز به‌طور معناداری ( $p < 0.05$ ) در تیمار T-2 نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بوده و تفاوت معناداری در افزایش وزن بین سایر تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (جدول ۲). درباره شاخص SGR، همه تیمارهای آزمایشی تفاوت معنادار و عملکرد بهتری نسبت به گروه شاهد داشتند، اما تفاوت معناداری درباره این شاخص در بین تیمارهای تغذیه شده با پروبیوآنزیم مشاهده نشد. شاخص FCR نیز در تیمارهای آزمایشی T-2 و T-3 عملکرد بهتر و تفاوت معناداری ( $p < 0.05$ ) نسبت به

گروه شاهد و تیمار T-1 داشت. همچنین هیچ تفاوت معناداری در طول کارپاس و طول کل در بین تیمارهای

جدول ۳ عملکرد رشد و بقا در میگوی جوان وانامی تغذیه شده با سطوح متفاوت از پروبیوآنزیم.

| تیمارها | درصد بقا   | وزن اولیه              | وزن نهایی              | افزایش وزن             | SGR                     | FCR                    | طول کارپاس             | طول کل                 |
|---------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| شاهد    | ۹۵/۵۳±۳/۸۶ | ۵/۱۲±۰/۱۳ <sup>a</sup> | ۶/۸۵±۰/۰۴ <sup>c</sup> | ۱/۷۳±۰/۱۷ <sup>b</sup> | ۰/۹۷±۰/۰۱ <sup>c</sup>  | ۴/۳۵±۰/۰۴ <sup>a</sup> | ۳/۳۹±۰/۰۱ <sup>a</sup> | ۹/۸۰±۰/۰۲ <sup>a</sup> |
| T-1     | ۹۷/۷۶±۳/۸۸ | ۴/۸۲±۰/۰۵ <sup>a</sup> | ۶/۶۷±۰/۱۵ <sup>c</sup> | ۱/۸۴±۰/۰۴ <sup>b</sup> | ۱/۰۹±۰/۰۳ <sup>ab</sup> | ۴/۲۰±۰/۰۹ <sup>a</sup> | ۳/۳۶±۰/۱۸ <sup>a</sup> | ۹/۶۵±۰/۰۳ <sup>a</sup> |
| T-2     | ۱۰۰/۰۰     | ۴/۹۰±۰/۰۴ <sup>a</sup> | ۷/۷۲±۰/۰۲ <sup>a</sup> | ۲/۸۲±۰/۰۴ <sup>a</sup> | ۱/۰۵±۰/۰۲ <sup>a</sup>  | ۲/۶۹±۰/۰۴ <sup>b</sup> | ۳/۴۱±۰/۰۵ <sup>a</sup> | ۹/۷۷±۰/۰۲ <sup>a</sup> |
| T-3     | ۱۰۰/۰۰     | ۵/۳۰±۰/۰۲ <sup>a</sup> | ۷/۳۵±۰/۰۷ <sup>b</sup> | ۲/۰۳±۰/۱۹ <sup>b</sup> | ۱/۰۸±۰/۱۳ <sup>ab</sup> | ۳/۷۰±۰/۰۳ <sup>b</sup> | ۳/۴۰±۰/۰۸ <sup>a</sup> | ۹/۸۶±۰/۱ <sup>a</sup>  |

### فعالیت آنزیم های گوارشی

فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز را نشان داد. بیشترین فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز و لیپاز در تیمار T-2 مشاهده شد. همچنین فعالیت این دو آنزیم در تیمارهای T-1 و T-3 تفاوت معناداری ( $p > 0/05$ ) با یکدیگر نداشت، هرچند این دو تیمار فعالیت ویژه آمیلاز و لیپاز بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند (جدول ۴).

فعالیت ویژه آنزیم های گوارشی و همچنین کل پروتئین محلول در بین تیمارهای آزمایشی در جدول ۴ نشان داده شده است. فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در میگوهای تغذیه شده با تیمارهای T-1 و T-2 بیشتر بود و نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی تفاوت معناداری ( $p < 0/05$ ) داشت (جدول ۴). درواقع تیمار آزمایشی T-1 بیشترین

جدول ۴ تأثیر جیره آزمایشی مکمل سازی شده با سه غلظت متفاوت پروبیوآنزیم بر فعالیت آنزیم های هضمی میگوی جوان وانامی

| فعالیت آنزیم (واحد گرم بر پروتئین) |                        |                        |                         |                         |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| تیمارها                            |                        |                        |                         |                         |
| شاهد                               | T-1                    | T-2                    | T-3                     |                         |
| کل پروتئین محلول                   | ۱/۷۹±۰/۰۸ <sup>c</sup> | ۲/۳۷±۰/۰۷ <sup>a</sup> | ۲/۲۰±۰/۱۴ <sup>ab</sup> | ۲/۰۵±۰/۰۹ <sup>b</sup>  |
| پروتئاز                            | ۱/۱۷±۰/۱۴ <sup>c</sup> | ۱/۹۶±۰/۰۲ <sup>a</sup> | ۱/۵۹±۰/۰۶ <sup>b</sup>  | ۱/۱۸±۰/۰۳ <sup>c</sup>  |
| آمیلاز                             | ۰/۷۸±۰/۰۳ <sup>c</sup> | ۰/۸۹±۰/۰۲ <sup>b</sup> | ۰/۹۸±۰/۰۳ <sup>a</sup>  | ۰/۸۵±۰/۰۰۵ <sup>b</sup> |
| لیپاز                              | ۰/۵۵±۰/۱۲ <sup>c</sup> | ۰/۹۹±۰/۰۴ <sup>b</sup> | ۱/۱۸±۰/۰۱ <sup>a</sup>  | ۰/۸۶±۰/۱۳ <sup>b</sup>  |

### بحث

پروتئاز در مقایسه با سایر گروه ها در تیمار T-1 مشاهده شد (جدول ۴). به طور کلی افزایش فعالیت ویژه آنزیم های هضمی روده میگو با استفاده از گونه های پروبیوتیک جیره محدودیت خاصی دارد و این باکتری ها تا حدی می توانند از خود آنزیم های گوارشی ترشح و یا دستگاه گوارشی را تحریک به ترشح آن کنند، و از غلظت های بالاتر تأثیر معناداری بر افزایش فعالیت آنزیم

نتایج این مطالعه نشان داد آنزیم های هضمی لیپاز و آمیلاز در میگوهای جوان تغذیه شده با تیمار T-2، بیشترین میزان فعالیت را داشته و تفاوت معناداری ( $p < 0/05$ ) نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد دارد (جدول ۴). بیشترین فعالیت ویژه آنزیم

برخی آنزیم‌های هضمی (آمیلاز و لیپاز) و در نتیجه قابلیت هضم دارد که این نتایج هم‌راستا با برخی مطالعات قبلی است (Farhangi and Carter, 2007).

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطوح متفاوت از پروبیوآنزیم، تأثیرات متفاوتی بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی در میگوی وانامی جوان دارد. همچنین در این مطالعه مشخص شد، لزوماً با افزایش غلظت پروبیوتیک و آنزیم‌های مکمل در جیره فعالیت همه آنزیم‌های هضمی در روده میگوی وانامی افزایش نمی‌یابد. در آزمایش مشابهی که هم‌زمان با آزمایش حاضر بر روی پست لارو میگوی وانامی انجام داده‌ایم و هنوز اطلاعات آن منتشر نشده است، نتایج تقریباً یکسانی درباره تأثیر استفاده از مکمل پروبیوتیک و آنزیم (پروبیوآنزیم) در جیره بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی به دست آمده است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیبی از باکتری‌های پروبیوتیکی و آنزیم‌های هضمی با غلظتی مشخص تأثیرات مثبتی در عملکرد رشد و افزایش فعالیت آنزیم‌های هضمی دارد که این تأثیرات می‌تواند با کاهش غلظت سبب اثر مثبت کمتر و با افزایش غلظت تأثیر منفی بر رشد و فعالیت آنزیم‌های هضمی و در نهایت قابلیت هضم مواد غذایی شود. در نتیجه پیشنهاد ما با توجه به نتایج آزمایش حاضر استفاده از غلظت  $0.5 \text{ g kg}^{-1}$  مکمل پروبیوآنزیم برای افزایش فعالیت آنزیم‌های هضمی و عملکرد رشد بهتراست. بنابراین در مطالعات آینده می‌توان علت کاهش فعالیت آنزیم‌های هضمی در غلظت‌های بالا و افزایش این فعالیت در غلظت‌های مشخص و مکانیسم آن را در دستگاه گوارش میگو بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

هضمی ندارند (wang, 2007). بنابراین بر اساس نتایج این آزمایش، غلظت‌های بالاتر پروبیوتیک‌ها تأثیرات بیشتری در افزایش فعالیت آنزیم‌های هضمی ندارند. مشابه نتایج آزمایش حاضر، تحقیقات Wang (۲۰۰۷) نشان داد که با افزایش سطوح باکتری‌های پروبیوتیکیاسیلوسی در جیره میگوی وانامی، تفاوت معناداری در فعالیت آنزیم‌های هضمی ایجاد شده و از غلظتی بیشتر هیچ تأثیر معناداری در افزایش فعالیت ویژه آنزیم‌های هضمی نداشته است. همچنین مطالعات Zhou و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که افزودن باکتری *B.coagulans SC8168* در محیط آبی پرورش لاروهای میگوی وانامی سبب افزایش نرخ رشد و بقا در غلظت خاصی از پروبیوتیک‌ها می‌شود.

فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در تیمار T-1، بیشترین مقدار را داشته و تفاوت معناداری ( $p < 0.05$ ) با سایر گروه‌های آزمایشی داشته است (جدول ۴). همچنین بهترین عملکرد رشد و افزایش وزن در میگوهای تغذیه شده با تیمار ( $T-2 \text{ } 0.5 \text{ g kg}^{-1}$ ) است. در واقع افزودن مکمل‌های آنزیمی با غلظت‌های خاص به جیره میگو سبب افزایش عملکرد رشد و فعالیت ویژه آنزیم‌های هضمی شده که این نتایج هم‌راستا با نتایج تحقیقات Maugle و همکاران (۱۹۸۳b) است که گزارش کردند افزودن آنزیم‌های تریپسین و آمیلاز به جیره شاهد باعث بهبود عملکرد رشد و افزایش فعالیت آنزیم‌های هضمی در میگوی *P. japonicas* می‌گردد. همچنین Buchanan و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که استفاده از آنزیم‌های هضمی در غلظت‌های متفاوت در جیره میگوی آب شیرین سبب افزایش نرخ تغذیه، افزایش وزن و ارزش غذایی جیره می‌شود. این مطالعه نشان داد که سطوح بالایی از مکمل‌های آنزیمی در جیره میگو تأثیر منفی بر فعالیت

and activities of digestive enzymes of *Pennausvannamei*. *Journal of Fishery of Sciences of China*, 11: 580-584.

**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 Research*, 38: 1274-1282.

**Felix, N., Sudharsan, M. 2004.** Effect of glycine betaine, feed attractant affecting growth and feed conversion of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, *Aquaculture Nutrition*, 10: 193-198

**Fuller, R. 1989.** Probiotics in man and animal, *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 305-378.

**Ghosh, k., Chakraborty, k., sen, s. k., ray, A. k. 2001.** Effects of thermostable bacterial  $\alpha$ -Amylase on growth and feed utilization rohu, *labeorohita* (Hamilton), fingerlings, *Aquaculture*, 53: 101-109.

**Hughes, K. P. and Scares J. H. jr. 1998.** Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Maronesaxatilis*, *Aquaculture Nutrition*, 4: 133-140.

**Kamarudin, M. S., Jones, D. A., Vay, L. and Abidin, A. Z. 1994.** Ontogenetic changes in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*, *Aquaculture*, 123: 323-333.

**Kolkovski, S., Tandler, A., Kissel, G. and Gertler, A. 1993.** The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae linnaeus) larvae, *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 203-209.

**Kumar, S., Sahu Narottam, P., Pal Asim, K., Choudhury, Dharitri., Mukherjee Subhas, C. 2006.** Nongelatinized corn supplemented with  $\alpha$ -amylase at sub optimum protein level enhances the growth of *Labeorohita* (Hamilton) fingerlings, *Aquaculture Research*, 37: 284-292.

**Lin, H. Z., Guo, Z. X., Yang, Y. Y., Zheng, W. H. and Li, Z. J. 2004.** Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, *Aquaculture Research*, 35: 1441-1447.

**Lorentz, K. 1998.** Clinical laboratory diagnostics. Publishing society, Frankfurt, pp 95-97.

بدین وسیله از زحمات بی دریغ دکتر بابک قائدینیا و دکتر مریم میربخش مسئولان محترم بخش بهداشت و بیماری های میگو از پژوهشکده میگوی کشور و تمامی محققان این پژوهشکده و همچنین کارکنان محترم بخش تحقیقات بندرگاه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## منابع

**Ahmadnia Motlagh, H. R., Farhangi, M., Rafiee, G. And Noori, F. 2012.** Effects of different level administration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance and survival rate of *Artemia urmiana*, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 65: 364-353. (Abstract in English)

**Anson, M L. 1938.** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *The Journal of General Physiology*, 22: 79-89.

**AOAC. 1995.** Official Methods of Analysis (ed. by K. Helrich), Association of Official Analytical Chemists, Virginia, Washington DC, 1094 pp.

**Bernfeld, P. 1955.** Amylases,  $\alpha$  And  $\beta$ . p149-158, *In Methods of Enzymology*, Academic Press, New York.

**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: 248-254.

**Carter, C. G., Houlihan, D. F., Buchanan, B. I., Mitchell, A. 1992.** Feed utilization efficiencies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr: Effect of a single supplementary enzyme, *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A, 101: 369-374.

**Carter, C. G., Houlihan, D.F., Buchanan, B. I., Mitchell, A. 1994.** Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.). fed a diet containing supplementary enzymes, *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 37-46.

**Dabrowska, H., Grudniewski, C. and Dabrowski, K. 1979.** Artificial diets for common carp: effect of the addition of enzyme extracts, *Journal of progressive fish culture*, 41: 196-200.

**Deshimaru, O. 1981.** Studies on nutrition and diet for prawn, *Penaeus japonicus*, Mem. Kagoshima Pref. *Journal of fish Experiment Station*, 12: 1-118.

**Ding, X., Li, Z. J., Chen, Y. Q., Lin, H. Z., Yang, Y. Y., Yang, K. 2004.** Effects of probiotics on growth



based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities, *Aquaculture*, 287: 349–353.

**Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. H., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R. and Shakouri, M. 2006.** The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*, *Aquaculture*, 252: 516-524.

**Lovett, D. L. and Felder, D. L. 1990.** Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae), *Journal of Biological Bulletin*, 178: 144–159.

**Maugle, P. D., Deshimaru, O., Katayama, T., Nagatani, T. and Simpson, K. L. 1983a.** Effect of microencapsulated amylase and bovine trypsin dietary supplements on growth and metabolism of shrimp, *Journal of Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 49: 1421–1427.

**Maugle, P. D., Deshimaru, O., Katayama, T. and Simpson, K. L. 1983b.** The use of amylase supplements in shrimp diets, *Journal of World Mariculture Society*, 14: 25-37.

**Pan, L. Q. and Wang, K. X. 1997.** The experimental studies on activities of digestive enzyme in the larva *penaeus chinensis*, *Journal of Fisheries of China*, 21: 26–31.

**Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E. and Buchmann, K. 2003.** Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B), *Journal of Fish Diseases*, 26: 495–498.

**Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1998a.** Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth, *Aquaculture*, 167: 301–313.

**Stone, D. A. J., Allan, G. L., Anderson, A. J. 2003.** Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). IV. Can dietary enzymes increase digestible energy from wheat starch, wheat and dehulled lupin, *Aquaculture Research*, 34: 135-147.

**Venkat, H. K., Narottam, P. S., Kamal, K. J. 2004.** Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), *Aquaculture Research*, 35: 501-507.

**Wang, YB. 2007.** Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*, *Aquaculture*, 269: 259-264.

**Wenk, c. 1992.** Enzymes in the nutrition of monogastric farm animals. P 205-218, In *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alitech's eighth annual symposium*, Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky, USA.

**Zhou, X., Wang, Y. and Li, W. 2009.** Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*)

## The effect of probio-enzyme on digestive enzyme activity of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Mohammad Hosseinpour<sup>1\*</sup>, Valiollah Jafari<sup>2</sup>, Abbasali Zendeboodi<sup>3</sup>, Abdolmajid Hajimoradloo<sup>4</sup>

1- MSc. student, Department of Fisheries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- Assistant Professor. Department of Fisheries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Shrimp Culture Department, Iran Shrimp Research Center, Bushehr, Iran.

4- Professor, Department of Fisheries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 15.07.2014

Accepted: 07.04.2015

\*Corresponding author: mohammad.hosseinpour64@gmail.com

### Abstract

The effect of simultaneous application of probiotic and digestive enzyme on the intestinal digestive activity of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, was evaluated. For this purpose, the juvenile shrimps were fed for 30 days with a dietary probio-enzyme (containing a combination of six exogenous enzymes and four probiotic bacterial strains) at four concentrations of 0, 0.25, 0.5, and 1 g kg<sup>-1</sup> feed. Shrimps (5.04±0.39 g ind<sup>-1</sup>) were randomly distributed in 12 aquaria (4 treatments × 3 replications); each aquarium contained 15 individual shrimps. Results indicated significantly ( $p \leq 0.05$ ) higher growth performance, amylase and lipase activity at 0.5 g kg<sup>-1</sup> treatment as compared to other treatments. Protease activity was, however, significantly ( $p \leq 0.05$ ) higher at 1.0 g kg<sup>-1</sup> treatment as compared to other groups. Results also indicated that increase in the concentration of probiotic and enzymes supplementation was not associated with increase in all the digestive enzyme activity. In other words, probiotics and enzymes only within specific range can have positive effect on growth performance and digestive enzyme activity of *L. vannamei*, above or below.

**Keywords:** Protease, Lipase, Amylase, Probio-enzyme, *Litopenaeus vannamei*