مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

تأثیر کمبود اسیدهای آمینه چند زنجیره در جیره ماهی صبیتی جوان (*Sparidentex hasta*) بر فاکتورهای رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترکیب شیمیایی بدن

مرتضی یعقوبی[1*]، جاسم غفله مرمضی[2]، امید صفری[3]، منصور طرفی موزان زاده[4]

[1] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، اهواز

[2] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، اهواز

[3] گروه شیلات، دانشگاه فردوسی، مشهد

[4] دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۴/۱۲/۲۵
اصلاح: ۹۵/۰۴/۲۷
پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۱

کلمات کلیدی:
اسید آمینه
آنزیم های گوارشی
فاکتورهای رشد
ماهی صبیتی

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر اثرات کاهش چهل درصدی اسیدهای آمینه‌ی ضروری چند زنجیره شامل لوسین، ایزولوسین و والین در جیره غذایی بر فاکتورهای رشد، تغذیه، ترکیب بیوشیمیایی لاشه و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی صبیتی به مدت ۴۲ روز در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی در تابستان سال ۱۳۹۳مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق واجد چهار تیمار غذایی در سه تکرار بود که شامل جیره غذایی شاهد با میزان و نسبت مناسب از همه‌ی اسیدهای آمینه ضروری و سه تیمار با کاهش ۴۰٪ هر یک از اسیدهای آمینه لوسین (LEU)، ایزولوسین (ILE) و والین (VAL) نسبت به جیره کنترل بود. کمبود اسیدهای آمینه چند زنجیره جیره غذایی منجر به کاهش شاخص‌های رشد، تغذیه، تثبیت نیتروژن، کاهش شاخص چربی احشایی، چربی خام و انرژی ناخالص لاشه و همچنین کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی لوزالمعده پانکراسی گردید ($P > 0/05$)، اما تأثیر معنی‌داری بر اسیدهای آمینه چند زنجیره لاشه نداشت. ذخیره‌سازی اسیدهای آمینه کاهش یافته شده در بدن مشاهده شد. بر اساس نتایج این آزمایش اثرات اسیدهای آمینه چند زنجیره در ماهی صبیتی بر رشد، متابولیسم چربی و فعالیت آنزیم‌های پانکراسی در بدن و همچنین عدم وجود رابطه‌ی آنتاگونیستی در بین اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در این ماهی مشخص شد.

مقدمه

اسیدهای آمینه مولکول‌هایی هستند که عملکرد هر دو گروه آمین و کربوکسیلیک را دارا می باشند. عملکرد اصلی اسیدآمینه کاربرد آن‌ها در ساختن پروتئین می‌باشد. اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره شامل لوسین، ایزولوسین و والین از اسیدهای آمینه‌ی ضروری در جیره‌ی حیوانات از جمله ماهیان می‌باشند (Li *et al.*, 2009). تفاوت اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره با سایر

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: m.yaghoubi@ut.ac.ir

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

اسیدهای آمینه‌ی ضروری در اکسید شدن اولیه‌ی اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در عضلات اسکلتی با آنزیم دهیدروژیناز اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره می‌باشد (Mager *et al.*, 2003) درحالی‌که اکسید شدن سایر اسیدهای آمینه‌ی ضروری در کبد صورت می‌پذیرد. لوسین، ایزولوسین و والین ۱۸-۲۰ درصد از اسیدهای آمینه را در پروتئین‌های گیاهی و حیوانی تشکیل می‌دهند. ویژگی کلیدی هر سه اسیدآمینه‌ی ضروری چند زنجیره آب‌گریز بودن آن‌ها است. بنابراین در پروتئین‌ها این اسیدهای آمینه دور از محیط آبی قرار می‌گیرند اما با سایر مولکول‌های آب‌گریز به‌خوبی واکنش می‌دهند (Brosnan and Brosnan, 2006). آن‌ها معمولاً در مرکز پروتئین‌ها دور از محیط آبی قرار می‌گیرند و ترکیب آن‌ها با سایر اسیدهای آمینه‌ی مشابه نقش کلیدی‌ای در مشخص کردن شکل سه‌بعدی این پروتئین‌ها که مشخص کننده عملکردشان می‌باشد به عهده دارند (Brosnan and Brosnan, 2006). اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره نقش‌های مهم ساختاری بر عهده دارند و به‌صورت اولیه در پروتئین‌های بدن به خصوص عضلات اسکلتی ذخیره می‌شوند (Brosnan and Brosnan, 2006). به خاطر نقش اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در ساختار پروتئین، بیشتر پروتئین‌ها معمولاً میزان زیادی از این اسیدهای آمینه را دارا می‌باشند و نسبت قابل توجهی از اسیدهای آمینه‌ی مصرف شده توسط حیوانات را به خود اختصاص می‌دهند (NRC, 2011). اسیدآمینه‌ی والین در ساخت پوشش میلین (myelin) عصب‌ها نقش دارد و کمبود والین می‌تواند باعث اختلال در وضعیت عصبی در پستانداران شود (NRC, 2011). لوسین به‌صورت قابل توجه ای به‌عنوان علامت دهنده ساخت متابولیکی مواد مغذی، باعث پیام رسانی به بافت‌های بدن از یک منبع پروتئین هضم شده می‌شود و باعث تحریک ترشح انسولین می‌شود و سپس ساخت پروتئین در عضلات و بافت‌های چربی رخ می‌دهد (Yang *et al.*, 2008). لوسین به‌عنوان یک فعال‌کننده رپمایسین (Rapamycin) که یک پروتئین کیناز می‌باشد و یک اسیدآمینه مهم در جهت ساخت پروتئین‌های ماهیچه‌ای و بازدارنده‌ی پروتئولیز در پستانداران است (Nakashima *et al.*, 2007). افزودن لوسین غذایی کارایی غذا را افزایش می‌دهد اما غذا گیری، رشد و کارایی پروتئین را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) کاهش می‌دهد که احتمالاً به خاطر رابطه آنتاگونیستی میان اسیدهای آمینه مخصوصاً اسیدهای آمینه چند زنجیره است (Choo *et al.*, 1991). مطالعات صورت گرفته در مورد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) و حتی میگو نشان داده است که اسیدهای آمینه چند زنجیره در طول فعالیت‌های خسته کننده (Milligan, 1997) یا آداپتاسیون با آب دریا (Bystriansky *et al.*, 2007) می‌تواند به‌سرعت از عضلات سفید و قرمز آزاد شده و به عنوان منبع انرژی استفاده شوند.

پروفیل آنزیم دستگاه گوارش به‌عنوان معرف قابلیت هضم و جذب مواد مغذی مطرح می‌باشد (Deng *et al.*, 2010). در ماهیان آنزیم‌های پانکراسی مانند تریپسین، لیپاز و آمیلاز به ترتیب در هضم پروتئین، چربی و کربوهیدرات نقش دارند (Suzer *et al.*, 2007). آنزیم کربوکسی پپتیداز نیز در پانکراس ترشح می‌شود و اولین باند پپتیدی را از سمت کربوکسیل پروتئین هیدرولیز می‌کند و نقش مهمی را در فرایند جذب پروتئین و پپتیدها و هیدرولیز اسیدهای آمینه‌ی آروماتیک و چند زنجیره دارد (Krishna, 2011). فعالیت آنزیم‌های گوارشی و زوائد مسواکی در ماهیان به‌صورت قابل توجه ای تحت تأثیر ترکیب جیره قرار می‌گیرند (Tibaldi *et al.*, 2006). در مورد افزایش غذایی برخی از اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره و تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی گزارش‌هایی موجود می‌باشد که ازجمله در موش آزمایشگاهی گزارش شده است که اسیدآمینه‌ی ایزولوسین باعث بهبود عملکرد آنزیم‌های پانکراسی لیپاز، پروتئاز و آمیلاز می‌شود (Lyman Wilcox, 1963). در ماهی کپور Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian) نیز این تأثیر برای اسیدآمینه‌ی والین گزارش شده است (Dong *et al.*, 2013).

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

ماهی صبیتی با نام علمی *Sparidentex hasta* (Valenciennes, 1830) تنها گونه از جنس Sparidentex در خانواده‌ی Sparidae می‌باشد و از غذاهای باارزش دریایی بوده که به میزان زیادی در خلیج‌فارس، سواحل هند و قسمت‌های غربی اقیانوس هند یافت می‌شود. این ماهی به‌آسانی در اسارت تخم‌ریزی می‌کند و در شرایط ایده ال، رشد سریعی را از خود نمایش می‌دهد و دامنه‌ی وسیعی از شرایط فیزیکوشیمایی آب را تحمل می‌کند این گونه به‌عنوان یکی از نمایندگان آبزی‌پروری دریایی در ایران و حوضه‌ی خلیج‌فارس مورد توجه می‌باشد (Basurco *et al.*, 2011). استفاده از روش‌های پیشرفته در تکثیر و پرورش این ماهی برای تأمین نیاز بازار اهمیت زیادی دارد در حالی‌که اطلاعات اندکی در مورد تغذیه و احتیاجات غذایی این ماهی به‌ویژه در زمینه‌ی اسیدهای آمینه‌ای در دسترس می‌باشد.

هدف از این پژوهش مشخص کردن تأثیرات کاهش اسیدهای آمینه‌ی ضروری چند زنجیره در جیره به یک میزان ثابت بر روی فاکتورهای رشد، تغذیه، فعالیت آنزیم‌های پانکراسی، ترکیب شیمیایی و پروفیل اسیدآمینه‌ی لاشه ماهیان مورد تغذیه می‌باشد. با نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان تأثیر جیره‌های غیر متوازن ازلحاظ اسیدهای آمینه ضروری لوسین، ایزولوسین و والین را بر روی ماهی صبیتی بررسی کرد و نقش‌های فیزیولوژیک این اسیدهای آمینه ضروری را در ماهی صبیتی جوان بیشتر شناخت.

مواد و روش‌ها

جیره نویسی و تهیه‌ی غذاها

در این مطالعه چهار جیره ی آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت و هر ۴ جیره‌ی آزمایشی به‌گونه‌ای فرموله شدند که به‌طور میانگین حاوی ۴۷۰ گرم پروتئین بر کیلوگرم جیره و انرژی خالص ۲۰/۷ کیلوژول بر گرم بودند (جدول ۲). در جیره‌ی تهیه‌شده برای هر چهار تیمار از الگوی اسیدهای آمینه‌ی پودر ماهی کیلکا برای متعادل کردن جیره استفاده شد و در همه تیمارها ۶۰٪ منبع پروتئین از پودر ماهی کیلکا و ژلاتین و ۴۰٪ مابقی از اسیدهای آمینه کریستاله تأمین گردید. در تیمار شاهد (Control) هیچ محدودیتی در اسیدهای آمینه‌ی ضروری لحاظ نگردید ولی در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی لوسین (LEU) از ۴۰ درصد ترکیب اسیدهای آمینه‌ی خالص استفاده شده در تیمار اول میزان لوسین صفر در نظر گرفته شد و با میزان مشابهی از مخلوط اسیدهای آمینه‌ی غیرضروری جایگزین گردید. برای تهیه‌ی تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی ایزولوسین (ILE) و تیمار کمبود والین (VAL) نیز روند مشابهی همانند تیمار لوسین به انجام رسید. به‌این‌ترتیب همه‌ی جیره‌ها هم نیتروژن بودند و تنها تفاوت تیمار شاهد با تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه در کاهش ۴۰ درصدی میزان اسیدهای آمینه‌ی لوسین، ایزولوسین و والین به ترتیب در تیمارهای لوسین، ایزولوسین و والین بود. ترکیب اسیدآمینه‌ی جیره‌ها بر اساس پروفیل اسیدآمینه اجزای جیره به‌دست‌آمده از NRC و پروفیل اسیدآمینه‌ی پودر ماهی کیلکا (Köprücü and Özdemir, 2005; NRC, 2011) توسط نرم‌افزار محاسبه و در جدول ۳ گزارش شده است. سایر اقلام غذایی هم به‌جز اسیدهای آمینه‌ی ضروری به وسیله ی نرم افزار طوری تنظیم شدند که همه‌ی جیره‌ها دارای یک میزان انرژی و پروتئین باشند. نتایج آنالیز شیمیایی جیره‌ها که در جدول۲ آمده است بر این امر دلالت دارد. اسیدهای آمینه خالص با یک درصد آگار برای تأخیر انداختن در هضم و جذب و افزایش کارایی آن‌ها در بدن به جای پروتئین پوشش دهی شدند (Green and Hardy, 2002) (جدول ۱). برای متعادل کردن جیره‌ها با منابع غذایی استفاده‌شده از نرم‌افزار WUFFF DA نسخه 1.0 استفاده شد. برای تهیه جیره‌های غذایی تمامی مواد با ترازوی دیجیتال توزین شدند. ابتدا ترکیبات خشک جیره که قبلاً آسیاب شده بود به‌اضافه اسیدهای آمینه‌ی خالص به مدت تقریباً ۲۰ دقیقه با یکدیگر مخلوط گردیدند. سپس روغن با مواد ویتامینی مخلوط گشته و

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

به مواد خشک اضافه گردید و همراه با اضافه کردن آب به مقدار لازم کاملاً مخلوط شدند. سپس خمیر حاصله به چرخ‌گوشت با مش ۲ میلی‌متری منتقل شد سپس رشته‌های ایجاد شده بر روی سینی‌های خشک‌کن قرارگرفت و به دستگاه خشک‌کن (در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت) منتقل شد. جیره‌ها پس از خشک شدن به‌صورت دستی شکسته شد تا متناسب با اندازه دهان ماهی گردند (Mozanzadeh *et al.*, 2015).

شرایط آزمایش و نگهداری ماهیان

محل انجام این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) بود. تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی ۴/۷ گرمی با سن ۱۴۰ روز به محل انجام آزمایش انتقال داده شد. شرایط دمایی (°C ۱/۵ ± ۲۸/۹)، pH (۰/۲ ± ۷/۶) و شوری ($g\ L^{-1}$ ۰/۵ ± ۴۸) متناسب با شرایط طبیعی منطقه بود و در طول دوره به‌صورت روزانه اندازه‌گیری گردید. در این تحقیق از ۱۲ عدد تانک ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی مدور (میانگین قطر سطح و کف ۰/۸ ارتفاع ۰/۶ متر) برای انجام آزمایش استفاده شد که در داخل هر تانک یک سنگ هوا برای تأمین اکسیژن (میانگین اکسیژن محلول: $mg\ L^{-1}$ ۰/۴ ± ۶/۸) و یک لوله‌ی تعویض آب به‌گونه‌ای که در طول شبانه‌روز دو بار آب کاملاً تعویض شود، تعبیه شد. برای آبگیری مخازن، آب دریا به حوضچه‌های رسوب‌گیر منتقل و پس از عبور از فیلتر شنی، حوضچه کلرزنی و فیلتر اشعه‌ی ماروابنفش به سالن آزمایش منتقل شد. در هر تانک ۱۵ قطعه ماهی قرار داده و به مدت ده روز قبل از شروع آزمایش با شرایط جدید سازگاری یافتند. در تمام مراحل آزمایش ماهی‌ها ۳ نوبت در روز در ساعات ۷ و ۱۲ و ۱۷ در حد سیری غذادهی شدند. این آزمایش با ۴ تیمار و در ۳ تکرار اجرا گردید. تنها تفاوت موجود در تیمارهای این آزمایش کاهش ۴۰ درصد از کل اسیدهای آمینه لوسین، ایزولوسین و والین در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد بود. آزمایش فوق ۶ هفته به طول انجامید (Mozanzadeh *et al.*, 2015).

نمونه‌برداری زیست‌سنجی و شاخص‌های مورد بررسی

در ابتدا و انتهای آزمایش زیست‌سنجی ماهیان به‌صورت گروهی با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن و با خط کش با دقت یک میلی‌متر طول ۵ عدد از هر تانک سنجیده شد. جهت ارزیابی عملکرد غذاهای مورد استفاده از شاخص‌های رشد استفاده شد تا نتایج بر مبنای آن‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گیرد. پس از اتمام دوره پرورش، درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، نرخ بازماندگی، ضریب تبدیل غذایی، نرخ کارایی پروتئین، تثبیت نیتروژنی، فاکتور وضعیت، شاخص کبدی، شاخص احشایی و شاخص چربی احشایی بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Green and Hardy, 2002; Mozanzadeh *et al.*, 2015).

درصد افزایش وزن = (وزن ثانویه - وزن اولیه / وزن اولیه) × ۱۰۰

نرخ ویژه رشد (% body weight d^{-1}) = (ln وزن نهایی – ln وزن اولیه) / تعداد روز آزمایش ×۱۰۰

نرخ بازماندگی (%) = (تعداد نهایی ماهیان / تعداد اولیه‌ی ماهیان) ×۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی = میزان غذایی مصرفی / افزایش وزن

نرخ کارایی پروتئین = (وزن نهایی – وزن اولیه) / (میزان پروتئین جیره * غذای خورده شده)

تثبیت نیتروژنی = (نیتروژن پایانی لاشه - نیتروژن اولیه لاشه) / (نیتروژن خورده شده) ×۱۰۰

فاکتور وضعیت = وزن / (طول)^{۳}

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

شاخص کبدی = (وزن کبد / وزن بدن) ×١٠٠

شاخص احشایی = (وزن احشاء /وزن بدن) ×١٠٠

شاخص چربی احشایی = (وزن چربی احشایی / وزن بدن)×١٠٠

با اتمام دورهٔ پرورش همه‌ی زی‌توده موجود در هر تانک با غلظت بالای ماده بیهوشی فنوکسی اتانول ($0/5\ ml\ L^{-1}$) کشته شدند و با باز کردن شکم تعداد پنج عدد ماهی از هر تانک اقدام به برداشتن احشاء و جدا کردن روده و زوائد پیلوریک کبـد و چربـی احشایی جهت برسی فاکتورهای مربوطه شد. روده و زوائد پیلوریک بعد از جداسازی بر روی یخ تا اندازه گیری آنزیم‌ها به تانک ازت و سپس فریزر ٨٠- منتقل گردید. بخش دیگری از زی‌توده تانک‌ها (چهار عدد ماهی) به‌صورت جداگانه و به کمک آون در دمای زیر ٦٠ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و به‌منظور آنالیز لاشه به آزمایشگاه تغذیه پژوهشکده آبـزی‌پـروری جنـوب کشـور منتقل گردید. تعداد چهار عدد ماهی نیز در کنار یخ به فریزر ٨٠- تا اندازه گیری پروفیل اسیدآمینه‌ای منتقل شدند.

آنالیز ترکیب شیمیایی و اسیدهای آمینه

میزان پروتئین خام، چربی خام، فیبر خام، خاکستر و رطوبت کل بدن هر تکرار به‌صورت جداگانه بر اسـاس روش‌هـای AOAC (2005) به صورت زیر اندازه گیری شد. برای محاسبه پروتئین خام، پس از هضم نمونه‌ها (با استفاده از دستگاه Digest Buchi Automat K438,) مقدار نیتروژن کل در نمونـه‌هـا بـا اسـتفاده از روش کجلـدال (دسـتگاه K370 Kejldahl Auto, Buchi) و تقسیم آن در عدد ٦/٢٥ تعیـین گردیـد. چربـی بـا روش سوکسـله (Barnstead/Electrothermal, UK) بـا اسـتفاده از حـلال کلروفرم با نقطه‌جوش ٥٠ تا ٦٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ ساعت استخراج و محاسبه شد. خاکستر با سوزاندن لاشه در کوره الکتریکی ٥٥٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٢ ساعت اندازه‌گیری شد. میزان فیبر خام به‌وسیله دسـتگاه فیبـر سـنج (VELP® Scientifica, Italy) و با استفاده از هضم اسیدی (اسیدسولفوریک) و هضم قلیایی (هیدروکسید سـدیم) محاسـبه شـد. عصـاره فاقد ازت (NFE) از طریق روش محاسباتی تفریق میزان پروتئین، چربـی، فیبـر، رطوبـت و خاکسـتر از ١٠٠ محاسـبه گردیـد (AOAC 2005). جهت تعیین پروفیل اسیدآمینه کل لاشه بعد از صید به‌صورت کامل و یکنواخت به‌وسیله آسیاب چرخ شده و سپس میزان ده گرم از آن با دستگاه فریز درایر خشک و پس از دو مرحله هضم و اشتقاق به‌وسیله‌ی دسـتگاه HPLC بـا روش (Lindroth and Mopper, 1979) مورد سنجش قرار گرفت. طول ستون ٢٥٠×٤ میلی‌لیتر، دمای ستون ٣٠ درجه سانتی‌گراد و نوع آن C18 بود. از آشکارساز فلورسنس بین دو طـول‌مـوج Excitation 330 nm و Emission 450 nm نیـز جهـت شناسـایی اسیدهای آمینه استفاده شد و درنهایت نتیجه به‌صورت درصد بیان گردید.

آنزیم‌های گوارشی

نمونه‌های روده و زوائد پیلوریک در ٣٠ برابر محلول ٥٠ میلی مولار Manitol و بـافر Tris-HCl، ٢ میلـی مـولار بـا pH=٧ بـه مدت ٣٠ ثانیه هموژنیزه شده سپس ١٠٠ میکرولیتر از $CaCl_2$، ٠/١ مولار اضافه گردید و سـپس در ١٠٠٠٠ دور بـر دقیقـه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حاصله جمع آوری و برای سـنجش آنزیمـی در مراحـل بعـدی در دمای ٨٠- نگهداری گردید (Gisbert *et al.*, 2009). فعالیت تریپسین به‌وسـیله N-α-benzoyl-dlarginine-p-nitroanilide بـه عنوان سوبسترا و با روش (Erlanger *et al.*, 1961)، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با نشاسته ١ درصـد بـه‌عنـوان سوبسـترا بـا روش (Worthington, 1991) ، فعالیت آنزیم لیپاز با سوبسترای 4-nitrophenyl-myristate، ٠/٤ میلی مولار بـا روش (Gawlicka *et al.*, 2000) و فعالیـت آنـزیم کربوکسـی پپتیـداز بـا سوبسـترای (N-4methoxyphenylazoformyl-Phe-OH) بـا روش

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

(Worthington, 1991) اندازه گیری شد. میزان پروتئین عصاره‌ی آنزیمی به‌وسیله‌ی روش (Bradford, 1976) با استفاده از آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد پروتئینی سنجیده شد.

روش آماری و شیوه نمونه‌برداری

شیوه نمونه‌برداری به‌صورت طرح کاملاً تصادفی بود. بعد از تحقق دو شرط اصلی آزمون‌های پارامتری یعنی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنف و یکنواختی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene، از آزمون ANOVA در سطح پنج درصد استفاده شد. داده‌های درصدی به Arcsinus تبدیل شدند. داده‌های به‌دست‌آمده در ارتباط با تأثیر کاهش هریک از اسیدهای آمینه ضروری بر شاخص‌های رشد، بازماندگی ماهی صبیتی به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA Analysis) صورت پذیرفت و سپس برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey استفاده شد. برای انجام آنالیزهای فوق از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

جدول ۱. درصد و اجزاء غذایی تشکیل‌دهنده جیره‌ها ($g\ kg^{-1}$dry diet)

	جیره‌ها			
اقلام غذایی	Control	LEU	ILE	VAL
پودر ماهی[۱]	۳۶/۰۰	۳۶/۰۰	۳۶/۰۰	۳۶/۰۰
نشاسته ذرت[۱]	۲۰/۵۰	۲۰/۵۰	۲۰/۵۰	۲۰/۵۰
آرد سفید گندم[۱]	۷/۰۰	۷/۰۰	۷/۰۰	۷/۰۰
ژلاتین[۱]	۴/۰۰	۴/۰۰	۴/۰۰	۴/۰۰
روغن ماهی[۱]	۱۱/۰۰	۱۱/۰۰	۱۱/۰۰	۱۱/۰۰
آگار[۲]	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
مکمل ویتامینی[۱ a]	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
مکمل معدنی[۱ a]	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
[۲]L-arginine	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸۵
[۲]L-lysine-HCl	۱/۱۵	۱/۱۵	۱/۱۵	۱/۱۵
[۲]L-threonine	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰
[۲]L-histidine	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰
[۳]L-isoleucine	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۰۰	۰/۸۵
[۲]L-leucine	۱/۴۰	۰/۰۰	۱/۴۰	۱/۴۰
[۲]L-methionine	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۶۰
[۲]L-phenylalanine	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵
[۲]L-tryptophan	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۰
[۲]L-valine	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۰۰
[۲b] NEAA mixture	۱۰/۴۵	۱۱/۸۵	۱۱/۳	۱۱/۴

[۱] موارد تهیه‌شده از شرکت خوراک دام، طیور و آبزیان ۲۱- بیضا. [۲] تهیه‌شده از شرکت مرک. [۳] موارد تهیه‌شده از شرکت فلوکا. [a] ویتامین A ۲۰۰۰IU/kg، ویتامین D: ۸۰۰ IU/kg، ویتامین E: ۸۸ IU/kg، ویتامین K: ۳ mg/kg، ویتامین C: ۲۰۰ mg/kg ، ویتامین B1: ۱۲ mg/kg، ویتامین B2: ۱۴ mg/kg، ویتامین B5: ۷۰ mg/kg، ویتامین B3: ۵۰ mg/kg، ویتامین B6: ۱۲ mg/kg، ویتامین B9: ۳mg/kg ، ویتامین B12: ۰/۰۱۶ mg/kg، ویتامین H2: ۰/۱۴ mg/kg، سلنیم: ۱۶۸mg/kg ، سولفات آهن ۲۰mg/kg ، سولفات مس ۲mg/kg ،یدات کلسیم: ۲ mg/kg، اکسیدمنگنز: ۱۶/۸mg/kg ، اکسیدروی: ۳۳/۲mg/kg ، کبالت: ۰/۳۳۶ mg/kg. [b] ترکیب اسیدهای آمینه‌ی غیرضروری برحسب درصد شامل: L-alanine: 13; L-aspartic acid: 20; sodium glutamate: 32; L-glycine: 15; L-serine: 10; and L-proline: 10

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

جدول ۲. آنالیز بیوشیمیایی ترکیب جیره‌ها (%) (n = 3)

	Control	LEU	ILE	VAL
ماده خشک	۹۲/۹۱±۰/۴	۹۱/۹۵±۰/۴	۹۲/۱±۰/۰۸	۹۱/۹۷±۰/۱
انرژی ناخالص[1]	۲۰/۹۲±۰/۰۵	۲۰/۴۲±۰/۰۴	۲۰/۳۸±۰/۰۹	۲۰/۵۶±۰/۰۱
پروتئین	۴۶/۶۷±۰/۵۷	۴۷/۴۴±۰/۳۲	۴۷/۳۷±۰/۹۲	۴۸/۱۷±۰/۷۵
چربی	۲۰/۱۴±۰/۰۱	۱۹/۲۶±۰/۰۸	۱۹/۴۷±۰/۲	۲۰/۱۶±۰/۲۱
فیبر خام	۱/۰۸±۰/۰۴	۰/۴۶±۰/۰۸	۰/۶۸±۰/۰۷	۰/۳۶±۰/۰۴
عصاره‌ی عاری از ازت[2]	۱۹/۱۴±۰/۵	۱۹/۰۶±۰/۳۶	۱۸/۹۳±۱/۱۵	۱۷/۱۲±۰/۴۶
خاکستر	۶/۷۵±۰/۰۷	۶/۱۸±۰/۰۵	۶/۳۲±۰/۰۳	۶/۳۱±۰/۰۸

[1] محاسبه انرژی ناخالص بر اساس میزان انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۲۳/۶ کیلوژول بر گرم)، چربی (۳۹/۵ کیلوژول بر گرم) و کربوهیدرات (۱۷/۲ کیلوژول بر گرم) محاسبه شد (NRC, 2011). [2] عصاره عاری از نیتروژن = ۱۰۰ – (فیبر+خاکستر+رطوبت+چربی+پروتئین).

جدول ۳. ترکیب اسیدآمینه‌ی جیره‌های آزمایش $g\ 100\ g^{-1}$Diet (*n = 1*)

	Control	LEU	ILE	VAL
آرژنین	۲/۵۶	۲/۵۶	۲/۵۶	۲/۵۶
لایزین	۲/۱۸	۲/۱۸	۲/۱۸	۲/۱۵
ترئونین	۱/۹	۱/۸۹	۱/۸۸	۱/۹۵
هیستیدین	۱/۱۱	۱/۱۰	۱/۱۲	۱/۱۳
ایزولوسین	۲/۰۷	۲/۰۷	۱/۲۴	۲/۰۷
لوسین	۲/۴۳	۱/۴۸	۲/۴۲	۲/۳۴
متیونین	۱/۳۸	۱/۳۸	۱/۳۸	۱/۳۸
فنیل آلانین	۱/۸۴	۱/۸۴	۱/۸۴	۱/۸۴
تریپتوفان	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵
والین	۲/۱۳	۲/۱۸	۲/۱۳	۱/۲۸
سیستین	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷
تیروزین	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷
گلایسین	۵	۵/۲۶	۵/۱۶	۵/۱۸
سرین	۲/۰۴	۲/۱۸	۲/۱۲	۲/۱۳
آلانین	۳/۹۳	۳/۷۵	۳/۸۲	۳/۵۸
پرولین	۱/۹۸	۲/۳۱	۲/۲۴	۲/۳۴

_ خط زیر نشان‌دهنده اسیدهای آمینه‌ی کاهش‌یافته در هر جیره می‌باشد.

نتایــج

در طول این آزمایش همه‌ی ماهی‌ها سالم بودند. نـرخ بقـا در همـه‌ی تیمارهـا بـالا بـود و تفـاوت معنـی‌داری را نشـان نـداد. فاکتورهای رشد، تغذیه و شاخص‌های بیومتری مربوط به این آزمایش در جدول شماره ۴ گزارش شده است. همه‌ی جیره‌هـای آزمایشی به‌خوبی توسط ماهی‌ها پذیرفته شدند و همه‌ی ماهی‌ها در طول آزمایش به مدت ۴۲ روز به‌خوبی به‌صـورت فعـال بـه تغذیه پرداختند. شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، نرخ کارایی پروتئین و تثبیت نیتروژنی در همـه‌ی

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه نسبت به شاهد به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵). بالاترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی والین (۰/۰۹ ± ۳/۰۳) و کمترین آن در تیمار شاهد (۰/۱۱ ± ۲/۰۰) مشاهده شد ($P <$ ۰/۰۵). میزان مصرف غذا تنها در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی لوسین (۰/۱۴ ± ۱۴/۲۰) در مقایسه با شاهد (۰/۴۱ ± ۱۶/۲۷) به‌صورت تیمارهای لوسین و ایزولوسین نسبت به شاهد به‌صورت معنی‌دار کاهش یافتند ($P <$ ۰/۰۵). شاخص احشایی در تیمارهای کمبود لوسین و والین و شاخص چربی احشایی در معنی‌داری کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵).

آنالیز ترکیب شیمیایی کل بدن ماهیان مورد آزمایش در تیمارها در انتهای آزمایش و همچنین در ماهیان شروع آزمایش در جدول شماره ۵ گزارش گردیده است. آنالیز آماری فقط برای نتایج انتهای آزمایش گزارش شده است؛ که بر اساس نتایج حاصله تنها میزان خاکستر لاشه در بین تیمارها تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. میزان رطوبت به‌صورت معنی‌داری در تیمار لوسین (۰/۸۹ ± ۷۳/۴۴) بیشتر از تیمار شاهد (۰/۶۷ ± ۶۹/۶۵) بود ($P <$ ۰/۰۵). میزان پروتئین خام تنها در تیمار کمبود والین (۰/۳ ± ۱۷/۸۶) نسبت به شاهد (۰/۲۶ ± ۱۶/۴۴) افزایش یافت ($P <$ ۰/۰۵). چربی خام و انرژی ناخالص در همه‌ی تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه نسبت به شاهد با کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($P <$ ۰/۰۵).

جدول ۴. رشد، مصرف غذا، بقا و پارامترهای بیومتریک ماهی صبیتی جوان در انتهای دوره‌ی آزمایش (means±SE, n=3)[1]

	تیمارهای غذایی			
	Control	**LEU**	**ILE**	**VAL**
عملکرد رشد و تغذیه				
IBW (g) [a]	۴/۶۴ ± ۰/۰۸	۴/۶۷ ± ۰/۰۶	۴/۶۴ ± ۰/۰۱	۴/۷۸ ± ۰/۰۶
FBW (g) [b]	۱۲/۸۴ ± ۰/۵۳ [a]	۹/۹۴ ± ۰/۲۱ [b]	۱۰/۴۱ ± ۰/۳۷ [b]	۱۰/۰۲ ± ۰/۴۲ [b]
WG (%) [c]	۱۷۷/۰۳ ± ۵/۹ [a]	۱۱۲/۸۸ ± ۳/۱ [b]	۱۲۴/۱۶ ± ۱/۹ [b]	۱۰۹/۶۶ ± ۷/۹ [b]
SGR [d]	۲/۳۹ ± ۰/۱۲ [a]	۱/۸۰ ± ۰/۰۳ [b]	۱/۹۲ ± ۰/۲۰ [b]	۱/۷۶ ± ۰/۱۳ [b]
S (%) [e]	۱۰۰	۹۵/۶ ± ۲/۹۴	۹۵/۶ ± ۲/۹۴	۹۷/۸ ± ۲/۲۲
FCR [f]	۲/۰۰ ± ۰/۱۱ [c]	۲/۸۰ ± ۰/۰۶ [b]	۲/۵۸ ± ۰/۰۵ [b]	۳/۰۳ ± ۰/۰۹ [a]
PER [g]	۱/۱۲ ± ۰/۱۱ [a]	۰/۸۳ ± ۰/۰۷ [b]	۰/۸۵ ± ۰/۰۸ [b]	۰/۷۶ ± ۰/۰۷ [b]
FC (g $fish^{-1}$) [h]	۱۶/۲۷ ± ۰/۴۱ [a]	۱۴/۲۰ ± ۰/۱۴ [b]	۱۴/۹۶ ± ۰/۴۷ [ab]	۱۵/۳۳ ± ۰/۳۴ [ab]
N Retention [i]	۱۷/۰۶ ± ۰/۹۷ [a]	۱۲/۶ ± ۰/۲۴ [b]	۱۲/۳۶ ± ۰/۶۹ [b]	۱۲/۵۵ ± ۰/۶۳ [b]
K [j]	۲/۴ ± ۰/۰۰	۲/۱۶ ± ۰/۰۹	۲/۳۷ ± ۰/۰۲	۲/۱۳ ± ۰/۱۱
HSI [k]	۲/۰۴ ± ۰/۰۲	۲/۰۰ ± ۰/۲۶	۲/۰۳ ± ۰/۱۷	۱/۸۵ ± ۰/۲۲
VSI [l]	۹/۴۹ ± ۰/۴۳ [a]	۷/۶۱ ± ۰/۲۰ [b]	۸/۰۹ ± ۰/۸۰ [ab]	۷/۲۹ ± ۰/۳۷ [b]
IPF [m]	۱/۸۰ ± ۰/۱۶ [a]	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ [b]	۰/۷۵ ± ۰/۲۸ [b]	۱/۰۶ ± ۰/۰۹ [ab]

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

[1] حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت آماری ($P < ۰/۰۵$) و عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف در پارامترهای مذکور است. [a] وزن اولیه. [b] وزن نهایی. [c] درصد افزایش وزن. [d] نرخ ویژه رشد. [e] نرخ بقا. [f] ضریب تبدیل غذایی. [g] نرخ کارایی پروتئین. [h] میزان مصرف غذا. [i] تثبیت نیتروژنی. [j] فاکتور وضعیت. [k] شاخص کبدی. [l] شاخص احشایی. [m] شاخص چربی احشایی.

جدول ۵. آنالیز ترکیب کل لاشه (درصد وزن‌تر) ماهی صبیتی جوان در انتهای آزمایش (means ± SE, n= 3)[1]

	اولیه	Control	LEU	ILE	VAL
رطوبت	۷۲/۳۷ ± ۱/۱۶	۶۹/۶۵ ± ۰/۶۷ [b]	۷۳/۴۴ ± ۰/۸۹ [a]	۷۲/۷۸ ± ۰/۹۵ [ab]	۷۱/۹۱ ± ۰/۶۰ [ab]
پروتئین خام	۱۷/۵۵ ± ۰/۶۰	۱۶/۴۴ ± ۰/۲۶ [b]	۱۶/۷۹ ± ۰/۴۳ [ab]	۱۶/۲۷ ± ۰/۲۵ [b]	۱۷/۸۶ ± ۰/۳ [a]
چربی خام	۵/۱۱ ± ۰/۲۸	۷/۶ ± ۰/۲۲ [a]	۴/۴۱ ± ۰/۱۱ [b]	۵/۱۲ ± ۰/۱ [b]	۴/۶۱ ± ۰/۲۸ [b]
خاکستر	۴/۲۹ ± ۰/۱۶	۴/۷۲ ± ۰/۲۱	۴/۵۷ ± ۰/۱۷	۴/۸۷ ± ۰/۱۸	۴/۶۶ ± ۰/۰۸
انرژی ناخالص (MJ/kg)[2]	۶/۲۲ ± ۰/۰۲	۶/۹۴ ± ۰/۰۷ [a]	۵/۸۰ ± ۰/۰۴ [c]	۵/۹۳ ± ۰/۰۶ [c]	۶/۱۵ ± ۰/۰۵ [b]

[1] حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت آماری ($P < ۰/۰۵$) و عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف در پارامترهای مذکور است. [2] محاسبه انرژی ناخالص بر اساس میزان انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۲۳/۶ کیلوژول بر گرم)، چربی (۳۹/۵ کیلوژول بر گرم) و کربوهیدرات (۱۷/۲ کیلوژول بر گرم) محاسبه شد (NRC 2011).

در جدول شماره‌ی ۶ ترکیب اسیدآمینه‌ی لاشه‌ی ماهیان بر اساس گرم بر صد گرم پروتئین هم در تیمارهای آزمایشی و هم در ابتدای آزمایش بیان‌شده است؛ که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده و مقایسه تیمارهای مورد مطالعه در انتهای آزمایش، اسیدهای آمینه هیستیدین، لوسین، متیونین، فنیل آلانین، گلایسین، پرولین، تیروزین و سیستین بدون تغییر معنی‌دار مشاهده شدند ($P > ۰/۰۵$). در میزان کل اسیدهای آمینه‌ی ضروری و غیرضروری نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. علی رقم کاهش چهل‌درصدی اسیدهای آمینه‌ی لوسین، ایزولوسین و والین در جیره‌های کمبود اسیدهای آمینه مذکور، میزان این اسیدهای آمینه در لاشه ماهیان تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار بدون کمبود شاهد مشاهده نشد. در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی لوسین نسبت به شاهد کاهش اسیدهای آمینه‌ی آرژنین و ایزولوسین و افزایش اسیدهای آمینه‌ی لایزین و آلانین به‌صورت معنی‌داری مشاهده شد ($P <۰/۰۵$). در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی ایزولوسین نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار میزان اسیدهای آمینه‌ی ترئونین، آسپارتیک اسید، سرین و آلانین مشاهده شد ($P <۰/۰۵$). در تیمار تغذیه شده با جیره‌ی دارای کمبود اسیدآمینه‌ی ترئونین اسیدهای آمینه‌ی لوسین، فنیل آلانین، گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، سرین و تیروزین کمتر و اسیدهای آمینه‌ی والین و گلایسین بیشتر از تیمار شاهد گزارش گردید ($P <۰/۰۵$). در لاشه ماهیان تغذیه شده با جیره‌ی حاوی کمبود اسیدآمینه‌ی والین به‌صورت معنی‌داری تنها اسیدهای آمینه‌ی لایزین کمتر و اسیدآمینه‌ی آلانین بیشتر از تیمار شاهد مشاهده شدند ($P <۰/۰۵$).

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در روده و زوائد پیلوریک (U mg protein^{-1}) ماهی صبیتی در انتهای آزمایش در جدول ۷ گزارش گردیده است که بر اساس نتایج حاصل شده میزان فعالیت آنزیم‌های پانکراسی تریپسین، کربوکسی پپتیداز، لیپاز و آمیلاز در همه‌ی تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه با شاهد به‌صورت معنی‌داری کمتر می‌باشد ($P <۰/۰۵$)؛ اما در بین تیمارهای داری کمبود اسیدآمینه هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های موردسنجش مشاهده نشد.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

جدول ۶. ترکیب اسیدآمینه‌ی لاشه ماهیان در ابتدا و انتهای آزمایش[۱]. N g^{-1} 16 g, (n = 3)

	اولیه	Control	LEU	ILE	VAL
اسیدهای آمینه ضروری					
آرژنین	۶/۴۵ ± ۰/۰۳	۷/۸۳ ± ۰ [a]	۷/۵۸ ± ۰/۰۲ [b]	۷/۹۷ ± ۰/۰۹ [a]	۷/۹۵ ± ۰/۰۳ [a]
هیستیدین	۲/۹۳ ± ۰/۰۳	۲/۶ ± ۰/۰۱	۲/۶۱ ± ۰/۰۳	۲/۶۱ ± ۰/۰۱	۲/۵۷ ± ۰
ایزولوسین	۳/۹۷ ± ۰/۰۲	۴/۰۳ ± ۰/۰۸ [ab]	۳/۵۹ ± ۰/۲۱ [b]	۴/۴۴ ± ۰/۰۲ [a]	۳/۹ ± ۰/۱۹ [ab]
لوسین	۷/۵۸ ± ۰/۱	۷/۵۹ ± ۰/۰۷	۷/۲۸ ± ۰/۳۲	۷/۴ ± ۰/۱	۷/۶۲ ± ۰/۱۸
لایزین	۸/۶۱ ± ۰/۰۴	۷/۸ ± ۰/۰۳ [b]	۸/۱۵ ± ۰/۰۶ [a]	۷/۹ ± ۰/۰۵ [b]	۷/۴۹ ± ۰/۰۶ [c]
متیونین	۲/۵۲ ± ۰	۳/۱ ± ۰/۰۴	۲/۹۸ ± ۰/۰۳	۲/۹۹ ± ۰/۰۹	۲/۹۱ ± ۰/۰۸
فنیل آلانین	۳/۹۲ ± ۰/۰۲	۴/۱۸ ± ۰/۰۸	۳/۹۵ ± ۰/۰۷	۳/۹۶ ± ۰/۰۴	۴/۱۶ ± ۰/۰۴
ترئونین	۳/۸۹ ± ۰/۰۶	۴/۷۸ ± ۰/۰۱ [a]	۴/۹۵ ± ۰/۱ [a]	۱/۷۹ ± ۱/۱۱ [b]	۴/۹۷ ± ۰/۰۹ [a]
والین	۴/۸۶ ± ۰/۰۹	۴/۲۱ ± ۰/۱ [ab]	۳/۸۴ ± ۰/۲۱ [b]	۴/۷۴ ± ۰/۰۲ [a]	۴/۳۲ ± ۰/۱۸ [ab]
اسیدهای آمینه غیرضروری					
آسپارتیک اسید	۱۱/۱۱ ± ۰/۱	۱۰/۵۴ ± ۰/۰۳ [a]	۹/۹۹ ± ۰/۱۸ [ab]	۹/۲۵ ± ۰/۵۳ [b]	۱۰/۳۳ ± ۰/۰۱ [ab]
گلوتامیک اسید	۱۴/۱۷ ± ۰/۰۷	۱۴/۷۹ ± ۰/۰۸ [ab]	۱۴/۱۳ ± ۰/۲۴ [b]	۱۵/۲۳ ± ۰/۳۸ [a]	۱۴/۶۷ ± ۰/۰۸ [ab]
سرین	۳/۵۵ ± ۰/۰۴	۴/۶ ± ۰/۰۳ [a]	۴/۵۴ ± ۰/۰۱ [a]	۴/۰۵ ± ۰/۰۳ [b]	۴/۵۸ ± ۰/۰۴ [a]
گلایسین	۷/۵۸ ± ۰/۰۹	۶/۶۳ ± ۰/۲۴	۸/۵۳ ± ۱/۱۶	۱۰/۰۵ ± ۱/۵۶	۶/۶۲ ± ۰/۸۴
پرولین	۳/۵ ± ۰/۰۴	۳/۴۳ ± ۰/۰۳	۳/۳۵ ± ۰/۰۸	۳/۴۲ ± ۰/۰۱	۳/۲۲ ± ۰/۰۸
آلانین	۶/۹۴ ± ۰/۰۲	۷/۰۸ ± ۰/۰۳ [b]	۷/۸ ± ۰/۰۱ [a]	۶/۶۷ ± ۰/۱۳ [c]	۷/۸۳ ± ۰/۱ [a]
تیروزین	۳/۲۵ ± ۰/۰۲	۳/۱۷ ± ۰/۰۲	۳/۰۷ ± ۰/۱	۳/۱۳ ± ۰/۰۵	۳/۱ ± ۰/۰۷
سیستین	۰/۹۵ ± ۰/۰۸	۰/۹۶ ± ۰/۱۲	۱ ± ۰/۰۹	۱ ± ۰/۰۲	۱/۰۲ ± ۰/۰۴
Total EAA	۴۴/۷۲ ± ۰/۱۲	۴۶/۰۹ ± ۰/۳۵	۴۴/۹۲ ± ۰/۷	۴۳/۷۷ ± ۰/۶۹	۴۵/۸۷ ± ۰/۷۲
Total NEAA	۵۱/۰۵ ± ۰/۲	۵۱/۱۸ ± ۰/۲۹	۵۲/۳۹ ± ۰/۷۸	۵۲/۷۹ ± ۰/۸۳	۵۱/۳۵ ± ۰/۶۲
Total AA	۹۵/۷۷ ± ۰/۳۱	۹۷/۲۷ ± ۰/۱۱	۹۷/۳۱ ± ۰/۱	۹۶/۵۶ ± ۰/۱۵	۹۷/۲۲ ± ۰/۱۱

[۱] میانگین ۳ تکرار، حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت آماری ($P < ۰/۰۵$) و عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف در پارامترهای مذکور است.

جدول ۷. میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در روده و زوائد پیلوریک (U mg $protein^{-1}$) ماهی صبیتی در انتهای آزمایش (means ± SE, n= 3)

	Control	LEU	ILE	VAL
تریپسین	۳/۱۱ ± ۰/۰۲ [a]	۱/۳۹ ± ۰/۰۱ [b]	۱/۳۷ ± ۰/۰۱ [b]	۱/۳۸ ± ۰/۰۲ [b]
لیپاز	۲/۱۶ ± ۰/۰۱ [a]	۱/۲۲ ± ۰/۰۱ [b]	۱/۲۱ ± ۰ [b]	۱/۲۱ ± ۰/۰۱ [b]
آمیلاز	۱/۳۵ ± ۰/۰۱ [a]	۰/۶ ± ۰ [b]	۰/۶ ± ۰ [b]	۰/۶ ± ۰/۰۱ [b]
کربوکسی پپتیداز	۲/۹۸ ± ۰/۰۲ [a]	۱/۳۳ ± ۰/۰ ۱ [b]	۱/۳۱ ± ۰/۰۱ [b]	۱/۳۲ ± ۰/۰۲ [b]

[۱] حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی تفاوت آماری ($P < ۰/۰۵$) می باشد.

بحث

اسیدهای آمینه می‌توانند به‌صورت پروتئین یا به‌صورت خالص به حالت کریستاله به‌عنوان مکمل غذایی فراهم گردند. افزایش استفاده از پروتئین‌های گیاهی در جیره‌ی ماهیان در سال‌های اخیر باعث افزایش استفاده از اسیدهای آمینه‌ی خالص برای رفع کمبودهای ایجادشده در اثر استفاده در سطوح بالا از این تولیدات گیاهی گردیده است (Ambardekar *et al.*, 2009). به جهت شناخت تأثیرات منفی جیره‌های نامتعادل از نظر پروفیل اسیدآمینه، در این مطالعه به بررسی جیره‌های دارای کمبود اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره پرداخته شد. برهم‌کنش میان اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در بین مرغ، خوک، موش و انسان

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

شناخته‌شده می‌باشد که این برهم‌کنش باعث تأثیر آنتاگونیستی یا رقابتی بین این اسیدهای آمینه می‌شود (D'Mello, 1994; Wu, 2009). در ماهیان رابطه‌ی آنتاگونیستی اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره به‌صورت کامل بیان نشده است و نتایج به‌دست‌آمده در بسیاری از مواقع متضاد می‌باشند. در برخی مطالعات هیچ تأثیری از لوسین اضافه بر سایر اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره مشاهده نشد (Choo *et al.*, 1991; Rodehutscord *et al.*, 1997). هرچند Chance و همکاران (1964)، گزارش دادند که نیاز به ایزولوسین در ماهی آزاد چینوک (*Oncorhynchus tshawytscha*) با افزایش غلظت لوسین به‌آرامی افزایش یافت. تغذیه ماهی قزل‌آلای دریاچه‌ای (*Salvelinus namaychus*) با جیره‌های حاوی میزان افزایشی والین باعث تغییر در غلظت اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره می‌شود به‌گونه‌ای که میزان ایزولوسین و لوسین در تغذیه با جیره‌های حاوی کمبود غذایی والین افزایش می‌یابد و وقتی که میزان والین در جیره بیشتر شد غلظت اسیدهای آمینه‌ی ایزولوسین و لوسین کاهش یافت (Hughes *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2009). جیره‌های دارای نسبت‌های پایین ایزولوسین به لوسین و والین به لوسین دارای تأثیرات منفی بر عملکرد رشد می‌باشند (Yamamoto *et al.*, 2004). در مطالعه‌ی حاضر با کاهش هر یک از اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در تیمارهای آزمایشی، نسبت آن اسیدآمینه به دو اسیدآمینه‌ی چند زنجیره‌ی دیگر کاهش یافت. این کاهش در نسبت‌های متعارف اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در بررسی فاکتورهای رشد و حتی فاکتورهای تغذیه به‌جز ضریب تبدیل غذایی در هیچ‌یک از تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه به‌صورت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۴). تنها وقتی که نسبت اسیدآمینه‌ی والین به ایزولوسین و والین به لوسین کاهش یافت (جیره‌ی کمبود والین) میزان ضریب تبدیل غذایی در تیمار دارای کمبود والین به‌صورت معنی‌داری نسبت به دو تیمار ایزولوسین و لوسین افزایش یافت که این افزایش را با توجه به عدم‌تغییر در سایر فاکتورهای رشد و تغذیه، نمی‌توان به رابطه‌ی آنتاگونیستی بین اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره نسبت داد. با توجه به این نتایج و گزارش‌های مربوط به مطالعات گذشته می‌توان بیان داشت که در ماهی صبیتی رابطه‌ی آنتاگونیستی در بین اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره وجود ندارد و کاهش رشدی که در تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه مشاهده می‌شود صرفاً به خاطر کاهش میزان غذایی اسیدآمینه‌ی کاهش یافته در جیره حاصل شده است زیرا کمبود یک اسیدآمینه در جیره باعث افزایش اکسید شدن سایر اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری که در سطح معمولی در جیره حضور دارند، می‌شود (Rønnestad *et al.*, 2000; Ozório *et al.*, 2002). اگر چه در داخل کشور مطالعه ای در مورد تاثیر کمبود اسیدهای آمینه‌ی ضروری به خصوص اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره بر روی ماهیان در دسترس نمی باشد ولی مطالعات سنجش نیاز اسید آمینه ای بر اساس روش حذف اسید آمینه بر روی چندین گونه از ماهیان شامل قزل آلای رنگین کمان (Green and Hardy, 2002)، آزاد اطلس (Rollin *et al.*, 2003)، سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) (Peres and Oliva-Teles, 2009) و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Diógenes *et al.*, 2015) به انجام رسیده است که نتایج مشابه ای در عملکرد رشد در این مطالعات در جیره های داری کمبود اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره مشاهده شد.

در مطالعه‌ی حاضر میزان رطوبت در تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه و میزان پروتئین تنها در تیمار کمبود والین نسبت به کنترل افزایش یافت و میزان چربی در همه‌ی تیمارها نسبت به کنترل کاهش یافت. همانند این مطالعه، افزایش رطوبت، افزایش پروتئین و کاهش چربی لاشه در ماهی (*Cyprinus carpio* var. Jian) هنگام مواجهه با جیره‌ی دارای کمبود اسیدآمینه‌ی والین گزارش شده است (Dong *et al.*, 2013).کاهش میزان چربی لاشه که با کاهش فاکتور چربی احشایی در تیمارهای لوسین و ایزولوسین همراه بود نشان‌دهنده‌ی تغییر در متابولیسم چربی در این ماهی در هنگام مواجهه با جیره‌های نامتعادل ازلحاظ اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره می‌باشد. نقش اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در متابولیسم چربی در برخی مطالعات بر روی موش به اثبات رسیده است. بیان شده است که افزایش مصرف اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره باعث تأثیر

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

معنی‌داری در متابولیسم چربی و گلوکز دارد (Doi *et al.*, 2005; Layman and Walker, 2006). در این راستا کمبود اسید آمینه چند زنجیره منجر به کاهش ساخت چربی در کبد (Guo and Cavener, 2007) و افزایش انتقال چربی از بافت‌های سفید چربی (Cheng *et al.*, 2010) در موش آزمایشگاهی گزارش شده است. رفتار مشابه ای در مورد اسیدهای آمینه‌ی ایزولوسین و والین نیز گزارش شده است (Du *et al.*, 2012).

در آزمایش حاضر، علی رقم کاهش میزان اسیدهای آمینه لوسین، ایزولوسین و والین در جیره‌ها غذایی، میزان این اسیدآمینه‌ها در لاشه کاهش نیافت ممکن است به دلیل حفظ اسیدهای آمینه مذکور در هنگام مواجه با کمبود آن‌ها در جیره غذایی باشد. این مطلب با این فرض که مکانیسمی در ماهیان برای کاهش مصرف اسیدآمینه‌ی ضروری کاهش داده‌شده وجود دارد، در یک راستا می‌باشد (Jarss and Bastrop, 1995). نتایج مشابهی در مطالعه‌ی ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) گزارش شده است (Rollin *et al.*, 2003).

در این تحقیق فعالیت آنزیم های پانکراسی شامل تریپسین، لیپاز، آمیلاز و کربوکسی پپتیداز در روده و زوائد پیلوریک اندازه‌گیری شد که همه‌ی آنزیم‌های موردمطالعه در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های دارای کمبود اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره به‌صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافتند. این مطلب نشان‌دهنده‌ی تأثیر اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره بر توانایی هضم در این ماهی می‌باشد زیرا در ماهی فعالیت آنزیم‌های گوارشی تقارن زیادی با ترکیب جیره دارد (Yu *et al.*, 2012). هرچند در ماهی مطالعات اندکی تأثیر کمبود اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره را بر فعالیت آنزیم‌های پانکراسی مورد بررسی قرار داده است اما بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی با افزودن اسیدهای آمینه‌ی والین (Dong *et al.*, 2013) و ایزولوسین (Zhao *et al.*, 2012) در ماهی کپور Jian گزارش شده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که با کاهش میزان اسیدهای آمینه چند زنجیره در جیره‌ی ماهی صبیتی به‌صورت کاملاً معنی‌داری همه‌ی فاکتورهای رشد و تغذیه‌ی ماهی تحت تأثیر قرار گرفت. این تغییرات در بین هر سه اسیدآمینه‌ی لوسین، ایزولوسین و والین بدون تغییر معنی‌دار بود و در اکثر فاکتورهای مورد بررسی مشاهده شد که نشان‌دهنده عدم مشاهده‌ی رابطه‌ی آنتاگونیستی در بین این اسیدهای آمینه‌ی ضروری در ماهی صبیتی می‌باشد. علی رقم کاهش چهل‌درصدی هر یک از اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در هر یک از جیره‌ها میزان این اسیدهای آمینه در لاشه ماهیان در بین تیمارها تغییر معنی‌داری را نشان ندادند که نشان‌دهنده ذخیره‌سازی این اسیدهای آمینه‌ی محدودشده توسط بدن ماهی می‌باشد. همچنین در ترکیب اسیدآمینه‌ی لاشه‌ی ماهیان بیشترین تغییر در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی لوسین و کمترین تغییر در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی والین نسبت به تیمار شاهد رخ داد به‌گونه‌ای که در تیمار کمبود اسیدآمینه‌ی والین تنها دو اسیدآمینه‌ی لایزین و آلانین دچار تغییر شدند. کاهش فاکتورهای چربی کل لاشه در همه‌ی تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه و کاهش فاکتور چربی احشایی در تیمار، کمبود لوسین و ایزولوسین نشان‌دهنده به وجود آمدن اختلال در متابولیسم چربی در هنگام مواجهه با کمبود تغذیه‌ای اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در ماهی صبیتی می‌باشد. اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره همچنین بر میزان ترشح و فعالیت آنزیم‌های گوارشی پانکراسی در ماهی صبیتی جوان تأثیرگذار می‌باشند.

تقدیر و تشکر

این مقاله از طرح مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فنـاوران کشـور بـا کـد شـماره ۹۲۰۱۱۶۱۰ اسـتخراج شـده اسـت. نویسندگان از پرسنل پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور و ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی کمال تشکر و قدردانی را به جهت همکاری های صورت گرفته دارند.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

منابـع

Ambardekar, A.A., Reigh, R.C., Williams, M.B. 2009. Absorption of amino acids from intact dietary proteins and purified amino acid supplements follows different time-courses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture. 291: 179-187.

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, MD: Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Basurco, B., Lovatelli, A., Garc´ıa, B. 2011. Current status of Sparidae aquaculture. In: Sparidae Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species. Pavlidis, M.A., Mylonas, C.C. (eds.). A John Wiley & Sons, Ltd, Crete. 390 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: 248-254.

Brosnan, J.T., Brosnan, M.E. 2006. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. The Journal of Nutrition. 136: 207S-211S.

Bystriansky, J., Frick, N., Ballantyne, J. 2007. Intermediary metabolism of Arctic char *Salvelinus alpinus* during short-term salinity exposure. Journal of Experimental Biology. 210: 1971-1985.

Chance, R.E., Mertz, E.T., Halver, J.E. 1964. Nutrition of salmonoid fishes. 12. Isoleucine, leucine, valine and phenylalanine requirements of chinook salmon and interrelations between isoleucine and leucine for growth. Journal of Nutrition. 83: 177-185.

Cheng, Y., Meng, Q., Wang, C., Li, H., Huang, Z., Chen, S., Xiao, F., Guo, F. 2010. Leucine deprivation decreases fat mass by stimulation of lipolysis in white adipose tissue and upregulation of uncoupling protein 1 (UCP1) in brown adipose tissue. Diabetes. 59: 17-25.

Choo, P.S., Smith, T.K., Cho, C.Y., Ferguson, H.W. 1991. Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout. Journal of Nutrition. 121: 1932-1939.

D'Mello, J. 1994. Amino acid imbalances, antagonisms and toxicities. In: Amino acids in farm animal nutrition. D'Mello, J. (ed.). Cab International, Wallingford, UK. pp. 63-97.

Deng, J., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Tan, B., Xu, W., Liufu, Z. 2010. Alternative protein sources in diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel): II. Effects on nutrient digestibility and digestive enzyme activity. Aquaculture Research. 41: 861-870.

Diógenes, A., Fernandes, J., Dorigam, J., Sakomura, N., Rodrigues, F., Lima, B.Gonçalves, F. 2016. Establishing the optimal essential amino acid ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method. Aquaculture Nutrition. 22: 435-443.

Doi, M., Yamaoka, I., Nakayama, M., Mochizuki, S., Sugahara, K., Yoshizawa, F. 2005. Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity. The Journal of Nutrition. 135: 2103-2108.

Dong, M., Feng, L., Kuang, S.Y., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.D., Li, S.H., Tang, L., Zhou, X.Q. 2013. Growth, body composition, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary valine. Aquaculture Nutrition. 19: 1-14.

Du, Y., Meng, Q., Zhang, Q., Guo, F. 2012. Isoleucine or valine deprivation stimulates fat loss via increasing energy expenditure and regulating lipid metabolism in WAT. Amino Acids. 43: 725-734.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics. 95: 271-278.

Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. Aquaculture. 184: 303-314.

Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture. 287: 381-387.

Green, J., Hardy, R. 2002. The optimum dietary essential amino acid pattern for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), to maximize nitrogen retention and minimize nitrogen excretion. Fish Physiology and Biochemistry. 27: 97-108.

Guo, F., Cavener, D.R. 2007. The GCN2 eIF2α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. Cell Metabolism. 5: 103-114.

Hughes, S.G., Rumsey, G.L., Nesheim, M.C. 1983. Dietary requirements for essential branched-chain amino acids by lake trout. Transactions of the American Fisheries Society. 112: 812-817.

Jarss, K., Bastrop, R. 1995. Amino acid metabolism in fish. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (eds.). Vol. 4. Elsevier Science, Amster dam. pp. 159-189.

Köprücü, K., Özdemir, Y. 2005. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 250: 308-316.

Krishna, P.N. 2011. Enzyme technology: pacemaker of biotechnology, PHI Learning Pvt. Ltd. pp. 360.

Layman, D.K., Walker, D.A. 2006. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. The Journal of Nutrition. 136: 319S-323S.

Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Amino Acids. 37: 43-53.

Lindroth, P., Mopper, K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. Analytical Chemistry. 51: 1667-1674.

Lyman, R.L., Wilcox, S.S. 1963. Effect of acute amino acid deficiencies on carcass composition and pancreatic function in the force-fed rat. 2. Deficiencies of valine, lysine, tryptophan, leucine and isoleucine. Journal of Nutrition. 79: 37-44.

Mager, D.R., Wykes, L.J., Ball, R.O., Pencharz, P.B. 2003. Branched-chain amino acid requirements in school-aged children determined by indicator amino acid oxidation (IAAO). The Journal of Nutrition. 133: 3540-3545.

Milligan, C. 1997. The role of cortisol in amino acid mobilization and metabolism following exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Fish Physiology and Biochemistry. 16: 119-128.

Mozanzadeh, M., Marammazi, J., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N., Gisbert, E. 2015. Somatic and physiological responses to cyclic fasting and re-feeding periods in sobaity sea bream (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). Aquaculture Nutrition. 23: 181-191.

Nakashima, K., Yakabe, Y., Ishida, A., Yamazaki, M., Abe, H. 2007. Suppression of myofibrillar proteolysis in chick skeletal muscles by α-ketoisocaproate. Amino Acids. 33: 499-503.

NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington, DC. pp. 392.

Ozório, R., Booms, G., Huisman, E., Verreth, J. 2002. Changes in amino acid composition in the tissues of African catfish (*Clarias gariepinus*) as a consequence of dietary L-carnitine supplements. Journal of Applied Ichthyology.18: 140-147.

Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir at 5:19 +0430 on Thursday June 21st 2018

Peres, H., Oliva-Teles, A. 2009. The optimum dietary essential amino acid profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Aquaculture. 296: 81-86.

Rodehutscord, M., Becker, A., Pack, M., Pfeffer, E. 1997. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. The Journal of Nutrition. 127: 1166-1175.

Rollin, X., Mambrini, M., Abboudi, T., Larondelle, Y., Kaushik, S.J. 2003. The optimum dietary indispensable amino acid pattern for growing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. British Journal of Nutrition. 90: 865-876.

Rønnestad, I., Conceição, L.E., Aragão, C., Dinis, M.T. 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). The Journal of Nutrition.130: 2809-2812.

Suzer, C., Kamaci, H.O., Coban, D., Saka, Ş., Firat, K., Özkara, B., Özkara, A. 2007. Digestive enzyme activity of the red porgy (*Pagrus pagrus*, L.) during larval development under culture conditions. Aquaculture Research. 38: 1778-1785.

Tibaldi, E., Hakim, Y., Uni, Z., Tulli, F., de Francesco, M., Luzzana, U., Harpaz, S. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. 261: 182-193.

Worthington, C. 1991. Worthington enzyme manual related biochemical. Freehold, New Jersey, USA. pp. 280.

Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids. 37: 1-17.

Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H. 2004. Antagonistic effects of branched-chain amino acids induced by excess protein-bound leucine in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 232: 539-550.

Yang, X., Yang, C., Farberman, A., Rideout, T., De Lange, C., France, J., Fan, M. 2008. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. Journal of Animal Science. 86: E36-E50.

Yu, H., Ai, Q., Mai, K., Ma, H., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. 2012. Effects of dietary protein levels on the growth, survival, amylase and trypsin activities in large yellow croaker, *Pseudosciaena Crocea* R., larvae. Aquaculture Research. 43: 178-186.

Zhao, J., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Chen, G., Jiang, W., Li, S., Tang, L., Kuang, S., Feng, L. 2012. Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture. 368: 117-128.