



## 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<sup>۱\*</sup>، جاسم غفله مرمری<sup>۲</sup>، امید صفری<sup>۳</sup>، منصور طرفی موزان زاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور، اهواز

<sup>۲</sup>موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور، اهواز

<sup>۳</sup>گروه شیلات، دانشگاه فردوسی، مشهد

<sup>۴</sup>دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر

### چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۴/۱۲/۲۵

اصلاح: ۹۵/۰۴/۲۷

پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۱

کلمات کلیدی:

اسید آمینه

آنزیم‌های گوارشی

فاکتورهای رشد

ماهی صبیتی

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 ۱۳۹۳ مورد 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 می‌باشند. 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](mailto:m.yaghoubi@ut.ac.ir)

اسیدهای آمینه ضروری در اکسید شدن اولیه اسیدهای آمینه چند زنجیره در عضلات اسکلتی با آنزیم دهیدروژیناز اسیدهای آمینه چند زنجیره می‌باشد (Mager *et al.*, 2003) در حالی که اکسید شدن سایر اسیدهای آمینه 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 اسید آمینه ضروری چند زنجیره آب‌گریز بودن آن‌ها است. بنابراین در پروتئین‌ها این اسیدهای آمینه دور از محیط آبی قرار می‌گیرند اما با سایر مولکول‌های آب‌گریز به خوبی واکنش می‌دهند (Brosnan and Brosnan, 2006). آن‌ها معمولاً در مرکز پروتئین‌ها دور از محیط آبی قرار می‌گیرند و ترکیب آن‌ها با سایر اسیدهای آمینه مشابه نقش کلیدی‌ای در مشخص کردن شکل سه‌بعدی این پروتئین‌ها که مشخص کننده عملکردشان می‌باشد به عهده دارند (Brosnan and Brosnan, 2006). اسیدهای آمینه چند زنجیره نقش‌های مهم ساختاری بر عهده دارند و به صورت اولیه در پروتئین‌های بدن به خصوص عضلات اسکلتی ذخیره می‌شوند (Brosnan and Brosnan, 2006). به خاطر نقش اسیدهای آمینه چند زنجیره در ساختار پروتئین، بیشتر پروتئین‌ها معمولاً میزان زیادی از این اسیدهای آمینه را دارا می‌باشند و نسبت قابل توجهی از اسیدهای آمینه مصرف شده توسط حیوانات را به خود اختصاص می‌دهند (NRC, 2011). اسید آمینه والین در ساخت پوشش میلین (myelin) عصب‌ها نقش دارد و کمبود والین می‌تواند باعث اختلال در وضعیت عصبی در پستانداران شود (NRC, 2011). لوسین به صورت قابل توجهی به عنوان علامت دهنده ساخت متابولیسمی مواد مغذی، باعث پیام‌رسانی 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 به عنوان یک فعال‌کننده رپامایسین (Rapamycin) که یک پروتئین‌کیناز می‌باشد و یک اسید آمینه مهم در جهت ساخت پروتئین‌های ماهیچه‌ای و بازدارنده پروتئولیز در پستانداران است (Nakashima *et al.*, 2007). افزودن لوسین غذایی کارایی غذا را افزایش می‌دهد اما غذاگیری، 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 به سرعت از عضلات سفید و قرمز آزاد شده و به عنوان منبع انرژی استفاده شوند.

پروفیل آنزیم دستگاه گوارش به عنوان 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 آمینه آروماتیک و چند زنجیره دارد (Krishna, 2011). فعالیت آنزیم‌های گوارشی و زوائد مسواکی در ماهیان به صورت قابل توجهی تحت تأثیر ترکیب جیره قرار می‌گیرند (Tibaldi *et al.*, 2006). در مورد افزایش غذایی برخی از اسیدهای آمینه چند زنجیره و تأثیر بر آنزیم‌های گوارشی گزارش‌هایی موجود می‌باشد که از جمله در موش آزمایشگاهی گزارش شده است که اسید آمینه ایزولوسین باعث بهبود عملکرد آنزیم‌های پانکراسی لیپاز، پروتئاز و آمیلاز می‌شود (Lyman Wilcox, 1963). در ماهی کپور (*Cyprinus carpio* var. Jian) نیز این تأثیر برای اسید آمینه والین گزارش شده است (Dong *et al.*, 2013).

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 ایده‌آل، رشد سریعی را از خود نمایش می‌دهد و دامنه‌ی وسیعی از شرایط فیزیکی‌شیمیایی آب را تحمل می‌کند این گونه به‌عنوان یکی از نمایندگان آبی‌پروری 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 حالی که 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 از لحاظ اسیدهای آمینه ضروری لوسین، ایزولوسین و والین را بر روی 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 جیره‌ی 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. به‌این ترتیب همه‌ی جیره‌ها هم‌نیترژن 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, 2011; NRC, 2005) توسط نرم‌افزار محاسبه و در جدول ۳ گزارش شده است. سایر اقلام غذایی هم به‌جز اسیدهای آمینه‌ی ضروری به وسیله‌ی نرم‌افزار طوری تنظیم شدند که همه‌ی جیره‌ها دارای یک میزان انرژی و پروتئین باشند. نتایج آنالیز شیمیایی جیره‌ها که در جدول ۲ 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

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 قرار گرفت و به دستگاه خشک‌کن (در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت) منتقل شد. جیره‌ها پس از خشک شدن به صورت 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 ( $28.9 \pm 1.5$  °C)، pH ( $7.6 \pm 0.2$ ) و شوری ( $5 \pm 0.5$  g L<sup>-1</sup>) متناسب با شرایط طبیعی منطقه بود و در طول دوره به صورت 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:  $4 \pm 0.6$  mg L<sup>-1</sup>) و یک لوله‌ی تعویض آب به گونه‌ای که در طول شبانه‌روز دو بار آب کاملاً تعویض شود، تعبیه شد. برای آبیگری مخازن، آب دریا به حوضچه‌های رسوب‌گیر منتقل و پس از عبور از فیلتر شنی، حوضچه کلرزنی و فیلتر اشعه‌ی مارواینفش 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 به صورت 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 تجزیه و تحلیل 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).

$$100 \times \text{وزن اولیه} / \text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه} = \text{درصد افزایش وزن}$$

$$100 \times \text{تعداد روز آزمایش} / (\ln \text{وزن اولیه} - \ln \text{وزن نهایی}) = (\text{body weight } d^{-1} \%) \text{ نرخ ویژه رشد}$$

$$100 \times (\text{تعداد اولیه ماهیان} / \text{تعداد نهایی ماهیان}) = (\%) \text{ نرخ بازماندگی}$$

$$\text{افزایش وزن} / \text{میزان غذایی مصرفی} = \text{ضریب تبدیل غذایی}$$

$$\text{میزان پروتئین جیره} * \text{غذای خورده شده} / (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}) = \text{نرخ کارایی پروتئین}$$

$$100 \times (\text{نیتروژن خورده شده}) / (\text{نیتروژن اولیه لاشه} - \text{نیتروژن پایانی لاشه}) = \text{تثبیت نیتروژنی}$$

$$\text{فاکتور وضعیت} = (\text{طول})^3 / \text{وزن}$$

$100 \times (\text{وزن بدن} / \text{وزن کبد}) = \text{شاخص کبدی}$

$100 \times (\text{وزن بدن} / \text{وزن احشاء}) = \text{شاخص احشایی}$

$100 \times (\text{وزن بدن} / \text{وزن چربی احشایی}) = \text{شاخص چربی احشایی}$

با اتمام دوره پرورش همگی زی‌توده موجود در هر تانک با غلظت بالای ماده بیهوشی فنوکسی اتانول ( $5 \text{ ml L}^{-1}$ ) 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 کبد و چربی احشایی جهت بررسی فاکتورهای مربوطه شد. روده و زوائد پیلوریک بعد از جداسازی بر روی یخ تا اندازه گیری آنزیم‌ها به تانک ازت و سپس فریزر  $80^\circ\text{C}$  منتقل گردید. بخش دیگری از زی‌توده تانک‌ها (چهار عدد ماهی) به صورت جداگانه و به کمک آون در دمای زیر  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد خشک شدند و به منظور آنالیز لاشه به آزمایشگاه تغذیه پژوهشکده آبی‌پروری جنوب کشور منتقل گردید. تعداد چهار عدد ماهی نیز در کنار یخ به فریزر  $80^\circ\text{C}$  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 به صورت جداگانه بر اساس روش‌های 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 نمونه‌ها با استفاده از روش کج‌لدال (دستگاه Buchi K370) و تقسیم آن در عدد  $6/25$  تعیین گردید. چربی با روش سوکسله (Barnstead/Electrothermal, UK) با استفاده از حلال کلروفرم با نقطه جوش  $50^\circ\text{C}$  تا  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت استخراج و محاسبه شد. خاکستر با سوزاندن لاشه در کوره الکتریکی  $550^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت اندازه‌گیری شد. میزان فیبر خام به وسیله دستگاه فیبر سنج (VELP® Scientifica, Italy) و با استفاده از هضم اسیدی (اسیدسولفوریک) و هضم قلیایی (هیدروکسید سدیم) محاسبه شد. عصاره فاقد ازت (NFE) از طریق روش محاسباتی تفریق میزان پروتئین، چربی، فیبر، رطوبت و خاکستر از  $100$  محاسبه گردید (AOAC 2005). جهت تعیین پروفیل اسیدآمینه کل لاشه بعد از صید به صورت کامل و یکنواخت به وسیله آسیاب چرخ شده و سپس میزان ده گرم از آن با دستگاه فریز درایر خشک و پس از دو مرحله هضم و اشتقاق به وسیله دستگاه HPLC با روش (Lindroth and Mopper, 1979) مورد سنجش قرار گرفت. طول ستون  $4 \times 250$  میلی‌لیتر، دمای ستون  $30^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و نوع آن C18 بود. از آشکارساز فلورسنس بین دو طول‌موج Excitation 330 nm و Emission 450 nm نیز جهت شناسایی اسیدهای آمینه استفاده شد و در نهایت نتیجه به صورت درصد بیان گردید.

### آنزیم‌های گوارشی

نمونه‌های روده و زوائد پیلوریک در  $30^\circ\text{C}$  برابر محلول  $50$  میلی مولار Manitol و بافر Tris-HCl،  $2$  میلی مولار با  $\text{pH}=7$  به مدت  $30$  ثانیه هموژنیزه شده سپس  $100$  میکرولیتر از  $\text{CaCl}_2$ ،  $0/1$  مولار اضافه گردید و سپس در  $100000$  دور بر دقیقه در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حاصله جمع‌آوری و برای سنجش آنزیمی در مراحل بعدی در دمای  $80^\circ\text{C}$  - نگهداری گردید (Gisbert *et al.*, 2009). فعالیت تریپسین به وسیله N- $\alpha$ -benzoyl-dlarginine-p-nitroanilide به عنوان سوبسترا و با روش (Erlanger *et al.*, 1961)، فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با نشاسته  $1$  درصد به عنوان سوبسترا با روش (Worthington, 1991)، فعالیت آنزیم لیپاز با سوبسترای 4-nitrophenyl-myristate،  $4$  میلی مولار با روش (Gawlicka *et al.*, 2000) و فعالیت آنزیم کربوکسی پپتیداز با سوبسترای (N-4-methoxyphenylazofornyl-Phe-OH) با روش

(Worthington, 1991) اندازه گیری شد. میزان پروتئین عصاره‌ی آنزیمی به‌وسیله‌ی روش (Bradford, 1976) با استفاده از آلومین گاو 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-اسمیرنوف 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<sup>-1</sup> dry diet)

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

<sup>۱</sup> موارد تهیه‌شده از شرکت خوراک دام، طیور و آبزیان ۲۱- بیضا. <sup>۲</sup> تهیه‌شده از شرکت مرک. <sup>۳</sup> موارد تهیه‌شده از شرکت فلوکا. <sup>a</sup> ویتامین A: ۲۰۰۰ IU/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: ۳ mg/kg، ویتامین B12: ۰/۱۶ mg/kg، ویتامین H2: ۰/۱۴ mg/kg، سلنیم: ۱۶۸ mg/kg، سولفات آهن ۲۰ mg/kg، سولفات مس ۲ mg/kg، یدات کلسیم: ۲ mg/kg، اکسیدمنگنز: ۱۶/۸ mg/kg، اکسیدروی: ۳۳/۲ mg/kg، کبالت: ۰/۳۳۶ mg/kg. <sup>b</sup> ترکیب اسیدهای آمینه‌ی غیرضروری برحسب درصد شامل: 10 L-proline; 10 L-serine; 15 L-glycine; 32 sodium glutamate; 20 L-aspartic acid; 13 L-alanine.

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

VAL	ILE	LEU	Control	
۹۱/۹۷±۰/۱	۹۲/۱±۰/۰۸	۹۱/۹۵±۰/۴	۹۲/۹۱±۰/۴	ماده خشک
۲۰/۵۶±۰/۰۱	۲۰/۳۸±۰/۰۹	۲۰/۴۲±۰/۰۴	۲۰/۹۲±۰/۰۵	انرژی ناخالص <sup>۱</sup>
۴۸/۱۷±۰/۰۷۵	۴۷/۳۷±۰/۰۹۲	۴۷/۴۴±۰/۰۳۲	۴۶/۶۷±۰/۰۵۷	پروتئین
۲۰/۱۶±۰/۰۲۱	۱۹/۴۷±۰/۰۲	۱۹/۲۶±۰/۰۰۸	۲۰/۱۴±۰/۰۰۱	چربی
۰/۳۶±۰/۰۰۴	۰/۶۸±۰/۰۰۷	۰/۴۶±۰/۰۰۸	۱/۰۸±۰/۰۰۴	فیبر خام
۱۷/۱۲±۰/۰۴۶	۱۸/۹۳±۱/۱۵	۱۹/۰۶±۰/۰۳۶	۱۹/۱۴±۰/۰۵	عصاره‌ی عاری از ازت <sup>۲</sup>
۶/۳۱±۰/۰۰۸	۶/۳۲±۰/۰۰۳	۶/۱۸±۰/۰۰۵	۶/۷۵±۰/۰۰۷	خاکستر

<sup>۱</sup> 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). <sup>۲</sup> عصاره عاری از نیتروژن = ۱۰۰ - (فیبر+خاکستر+رطوبت+چربی+پروتئین).

جدول ۳. ترکیب اسیدآمینهای جیره‌های آزمایش (n = 1), g 100 g<sup>-1</sup>Diet

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

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

## نتایج

در طول این آزمایش همه‌ی ماهی‌ها سالم بودند. نرخ بقا در همه‌ی تیمارها بالا بود و تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. فاکتورهای رشد، تغذیه و شاخص‌های بیومتری مربوط به این آزمایش در جدول شماره ۴ گزارش شده است. همه‌ی جیره‌های آزمایشی به‌خوبی توسط ماهی‌ها پذیرفته شدند و همه‌ی ماهی‌ها در طول آزمایش به مدت ۴۲ روز به‌خوبی به‌صورت فعال به تغذیه پرداختند. شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، نرخ کارایی پروتئین و تثبیت نیتروژنی در همه‌ی

تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه نسبت به شاهد به صورت معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). بالاترین ضریب تبدیل غذایی در تیمار کمبود اسیدآمینه والین ( $3/03 \pm 0/09$ ) و کمترین آن در تیمار شاهد ( $2/00 \pm 0/11$ ) مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). میزان مصرف غذا تنها در تیمار کمبود اسیدآمینه لوسین ( $14/20 \pm 0/14$ ) در مقایسه با شاهد ( $16/27 \pm 0/41$ ) به صورت تیمارهای لوسین و ایزولوسین نسبت به شاهد به صورت معنی دار کاهش یافتند ( $P < 0.05$ ). شاخص احشایی در تیمارهای کمبود لوسین و والین و شاخص چربی احشایی در معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

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 معنی داری را نشان نداد. میزان رطوبت به صورت معنی داری در تیمار لوسین ( $73/44 \pm 0/89$ ) بیشتر از تیمار شاهد ( $69/65 \pm 0/67$ ) بود ( $P < 0.05$ ). میزان پروتئین خام تنها در تیمار کمبود والین ( $17/86 \pm 0/3$ ) نسبت به شاهد ( $16/44 \pm 0/26$ ) افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). چربی خام و انرژی ناخالص در همه تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه نسبت به شاهد با کاهش معنی داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴. رشد، مصرف غذا، بقا و پارامترهای بیومتریک ماهی صبیتی جوان در انتهای دوره‌ی آزمایش ( $n=3$ ) (means $\pm$ SE).

تیمارهای غذایی				عملکرد رشد و تغذیه
VAL	ILE	LEU	Control	
				IBW (g) <sup>a</sup>
4/78 $\pm$ 0/06	4/64 $\pm$ 0/01	4/67 $\pm$ 0/06	4/64 $\pm$ 0/08	
				FBW (g) <sup>b</sup>
10/02 $\pm$ 0/42 <sup>b</sup>	10/41 $\pm$ 0/37 <sup>b</sup>	9/94 $\pm$ 0/21 <sup>b</sup>	12/84 $\pm$ 0/53 <sup>a</sup>	
				WG (%) <sup>c</sup>
109/66 $\pm$ 7/9 <sup>b</sup>	124/16 $\pm$ 1/9 <sup>b</sup>	112/88 $\pm$ 3/1 <sup>b</sup>	177/03 $\pm$ 5/9 <sup>a</sup>	
				SGR <sup>d</sup>
1/76 $\pm$ 0/13 <sup>b</sup>	1/92 $\pm$ 0/20 <sup>b</sup>	1/80 $\pm$ 0/03 <sup>b</sup>	2/39 $\pm$ 0/12 <sup>a</sup>	
				S (%) <sup>e</sup>
97/8 $\pm$ 2/22	95/6 $\pm$ 2/94	95/6 $\pm$ 2/94	100	
				FCR <sup>f</sup>
3/03 $\pm$ 0/09 <sup>a</sup>	2/58 $\pm$ 0/05 <sup>b</sup>	2/80 $\pm$ 0/06 <sup>b</sup>	2/00 $\pm$ 0/11 <sup>c</sup>	
				PER <sup>g</sup>
0/76 $\pm$ 0/07 <sup>b</sup>	0/85 $\pm$ 0/08 <sup>b</sup>	0/83 $\pm$ 0/07 <sup>b</sup>	1/12 $\pm$ 0/11 <sup>a</sup>	
				FC (g fish <sup>-1</sup> ) <sup>h</sup>
15/33 $\pm$ 0/34 <sup>ab</sup>	14/96 $\pm$ 0/47 <sup>ab</sup>	14/20 $\pm$ 0/14 <sup>b</sup>	16/27 $\pm$ 0/41 <sup>a</sup>	
				N Retention <sup>i</sup>
12/55 $\pm$ 0/63 <sup>b</sup>	12/36 $\pm$ 0/69 <sup>b</sup>	12/6 $\pm$ 0/24 <sup>b</sup>	17/06 $\pm$ 0/97 <sup>a</sup>	
				K <sup>j</sup>
2/13 $\pm$ 0/11	2/37 $\pm$ 0/02	2/16 $\pm$ 0/09	2/4 $\pm$ 0/00	
				HSI <sup>k</sup>
1/85 $\pm$ 0/22	2/03 $\pm$ 0/17	2/00 $\pm$ 0/26	2/04 $\pm$ 0/02	
				VSI <sup>l</sup>
7/29 $\pm$ 0/37 <sup>b</sup>	8/09 $\pm$ 0/80 <sup>ab</sup>	7/61 $\pm$ 0/20 <sup>b</sup>	9/49 $\pm$ 0/43 <sup>a</sup>	
				IPF <sup>m</sup>
1/06 $\pm$ 0/09 <sup>ab</sup>	0/75 $\pm$ 0/28 <sup>b</sup>	0/50 $\pm$ 0/05 <sup>b</sup>	1/80 $\pm$ 0/16 <sup>a</sup>	

<sup>۱</sup> حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری ( $P < 0.05$ ) و عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف در پارامترهای مذکور است. <sup>a</sup> وزن اولیه. <sup>b</sup> وزن نهایی. <sup>c</sup> درصد افزایش وزن. <sup>d</sup> نرخ ویژه رشد. <sup>e</sup> نرخ بقا. <sup>f</sup> ضریب تبدیل غذایی. <sup>g</sup> نرخ کارایی پروتئین. <sup>h</sup> میزان مصرف غذا. <sup>i</sup> تثبیت نیتروژنی. <sup>j</sup> فاکتور وضعیت. <sup>k</sup> شاخص کبدی. <sup>l</sup> شاخص احشایی. <sup>m</sup> شاخص چربی احشایی.

جدول ۵. آنالیز ترکیب کل لاشه (درصد وزن تر) ماهی صبیتی جوان در انتهای آزمایش (means  $\pm$  SE, n=3)

اولیه	Control	LEU	ILE	VAL	
۷۲/۳۷ $\pm$ ۱/۱۶	۶۹/۶۵ $\pm$ ۰/۶۷ <sup>b</sup>	۷۳/۴۴ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>a</sup>	۷۲/۷۸ $\pm$ ۰/۹۵ <sup>ab</sup>	۷۱/۹۱ $\pm$ ۰/۶۰ <sup>ab</sup>	رطوبت
۱۷/۵۵ $\pm$ ۰/۶۰	۱۶/۴۴ $\pm$ ۰/۲۶ <sup>b</sup>	۱۶/۷۹ $\pm$ ۰/۴۳ <sup>ab</sup>	۱۶/۲۷ $\pm$ ۰/۲۵ <sup>b</sup>	۱۷/۸۶ $\pm$ ۰/۳ <sup>a</sup>	پروتئین خام
۵/۱۱ $\pm$ ۰/۲۸	۷/۶ $\pm$ ۰/۲۲ <sup>a</sup>	۴/۴۱ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>b</sup>	۵/۱۲ $\pm$ ۰/۱ <sup>b</sup>	۴/۶۱ $\pm$ ۰/۲۸ <sup>b</sup>	چربی خام
۴/۲۹ $\pm$ ۰/۱۶	۴/۷۲ $\pm$ ۰/۲۱	۴/۵۷ $\pm$ ۰/۱۷	۴/۸۷ $\pm$ ۰/۱۸	۴/۶۶ $\pm$ ۰/۰۸	خاکستر
۶/۲۲ $\pm$ ۰/۰۲	۶/۹۴ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۵/۸۰ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>c</sup>	۵/۹۳ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۶/۱۵ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>b</sup>	انرژی ناخالص (MJ/kg) <sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری ( $P < 0.05$ ) و عدم وجود حروف در ردیف‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن اختلاف در پارامترهای مذکور است. <sup>۲</sup> 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 شماره ۶ ترکیب اسیدآمینهای لاشه ماهیان بر اساس گرم بر صد گرم پروتئین هم در تیمارهای آزمایشی و هم در ابتدای آزمایش بیان شده است؛ که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده و مقایسه تیمارهای مورد مطالعه در انتهای آزمایش، اسیدهای آمینه هیستیدین، لوسین، متیونین، فنیل آلانین، گلیسین، پرولین، تیروزین و سیستین بدون تغییر معنی‌دار مشاهده شدند ( $P > 0.05$ ). در میزان کل اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری نیز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. علی‌رغم کاهش چهل درصدی اسیدهای آمینه 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 اسیدآمینه لوسین نسبت به شاهد کاهش اسیدهای آمینه آرژنین و ایزولوسین و افزایش اسیدهای آمینه لایزین و آلانین به‌صورت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در تیمار کمبود اسیدآمینه ایزولوسین نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار میزان اسیدهای آمینه ترئونین، اسپارتیک اسید، سرین و آلانین مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). در تیمار تغذیه شده با جیره دارای کمبود اسیدآمینه ترئونین اسیدهای آمینه لوسین، فنیل آلانین، گلوتامیک اسید، اسپارتیک اسید، سرین و تیروزین کمتر و اسیدهای آمینه والین و گلیسین بیشتر از تیمار شاهد گزارش گردید ( $P < 0.05$ ). در لاشه ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی کمبود اسیدآمینه والین به‌صورت معنی‌داری تنها اسیدهای آمینه لایزین کمتر و اسیدآمینه آلانین بیشتر از تیمار شاهد مشاهده شدند ( $P < 0.05$ ).

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی در روده و زوائد پیلوریک ( $U \text{ mg protein}^{-1}$ ) 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 همه تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه با شاهد به‌صورت معنی‌داری کمتر می‌باشد ( $P < 0.05$ )؛ اما در بین تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های موردسنجش مشاهده نشد.

جدول ۶: ترکیب اسیدآمینه‌ی لاشه ماهیان در ابتدا و انتهای آزمایش<sup>۱</sup>. (n = 3), g 16 g<sup>-1</sup> N

اولیه	Control	LEU	ILE	VAL
<b>اسیدهای آمینه ضروری</b>				
آرژنین	۷/۸۳ ± ۰.۰۳ <sup>a</sup>	۷/۵۸ ± ۰.۰۲ <sup>b</sup>	۷/۹۷ ± ۰.۰۹ <sup>a</sup>	۷/۹۵ ± ۰.۰۳ <sup>a</sup>
هیستیدین	۲/۶ ± ۰.۰۱	۲/۶۱ ± ۰.۰۳	۲/۶۱ ± ۰.۰۱	۲/۵۷ ± ۰
ایزولوسین	۴/۰۳ ± ۰.۰۸ <sup>ab</sup>	۳/۵۹ ± ۰.۲۱ <sup>b</sup>	۴/۴۴ ± ۰.۰۲ <sup>a</sup>	۳/۹ ± ۰.۱۹ <sup>ab</sup>
لوسین	۷/۵۹ ± ۰.۰۷	۷/۲۸ ± ۰.۳۲	۷/۴ ± ۰.۱	۷/۶۲ ± ۰.۱۸
لایزین	۷/۸ ± ۰.۰۳ <sup>b</sup>	۸/۱۵ ± ۰.۰۶ <sup>a</sup>	۷/۹ ± ۰.۰۵ <sup>b</sup>	۷/۴۹ ± ۰.۰۶ <sup>c</sup>
متیونین	۳/۱ ± ۰.۰۴	۲/۹۸ ± ۰.۰۳	۲/۹۹ ± ۰.۰۹	۲/۹۱ ± ۰.۰۸
فنیل آلانین	۴/۱۸ ± ۰.۰۸	۳/۹۵ ± ۰.۰۷	۳/۹۶ ± ۰.۰۴	۴/۱۶ ± ۰.۰۴
ترونین	۴/۷۸ ± ۰.۰۱ <sup>a</sup>	۴/۹۵ ± ۰.۱ <sup>a</sup>	۱/۷۹ ± ۱/۱۱ <sup>b</sup>	۴/۹۷ ± ۰.۰۹ <sup>a</sup>
والین	۴/۲۱ ± ۰.۱ <sup>ab</sup>	۳/۸۴ ± ۰.۲۱ <sup>b</sup>	۴/۷۴ ± ۰.۰۲ <sup>a</sup>	۴/۳۳ ± ۰.۱۸ <sup>ab</sup>
<b>اسیدهای آمینه غیرضروری</b>				
آسپارتیک اسید	۱۰/۵۴ ± ۰.۰۳ <sup>a</sup>	۹/۹۹ ± ۰.۱۸ <sup>ab</sup>	۹/۲۵ ± ۰.۵۳ <sup>b</sup>	۱۰/۳۳ ± ۰.۰۱ <sup>ab</sup>
گلوتامیک اسید	۱۴/۷۹ ± ۰.۰۸ <sup>ab</sup>	۱۴/۱۳ ± ۰.۲۴ <sup>b</sup>	۱۵/۲۳ ± ۰.۳۸ <sup>a</sup>	۱۴/۶۷ ± ۰.۰۸ <sup>ab</sup>
سربین	۴/۶ ± ۰.۰۳ <sup>a</sup>	۴/۵۴ ± ۰.۰۱ <sup>a</sup>	۴/۰۵ ± ۰.۰۳ <sup>b</sup>	۴/۵۸ ± ۰.۰۴ <sup>a</sup>
گلاسیسین	۶/۶۳ ± ۰.۲۴	۸/۵۳ ± ۱/۱۶	۱۰/۰۵ ± ۱/۵۶	۶/۶۲ ± ۰.۸۴
پرولین	۳/۴۳ ± ۰.۰۳	۳/۳۵ ± ۰.۰۸	۳/۴۲ ± ۰.۰۱	۳/۲۲ ± ۰.۰۸
آلانین	۷/۰۸ ± ۰.۰۳ <sup>b</sup>	۷/۸ ± ۰.۰۱ <sup>a</sup>	۶/۶۷ ± ۰.۱۳ <sup>c</sup>	۷/۸۳ ± ۰.۱ <sup>a</sup>
تیروزین	۳/۱۷ ± ۰.۰۲	۳/۰۷ ± ۰.۱	۳/۱۳ ± ۰.۰۵	۳/۱ ± ۰.۰۷
سیستین	۰/۹۶ ± ۰/۱۲	۱ ± ۰/۰۹	۱ ± ۰/۰۲	۱/۰۲ ± ۰/۰۴
<b>Total EAA</b>	۴۶/۰۹ ± ۰/۳۵	۴۴/۹۲ ± ۰/۷	۴۲/۷۷ ± ۰/۶۹	۴۵/۸۷ ± ۰/۷۲
<b>Total NEAA</b>	۵۱/۱۸ ± ۰/۲۹	۵۲/۳۹ ± ۰/۷۸	۵۲/۷۹ ± ۰/۸۳	۵۱/۳۵ ± ۰/۶۲
<b>Total AA</b>	۹۷/۲۷ ± ۰/۱۱	۹۷/۳۱ ± ۰/۱	۹۴/۵۶ ± ۰/۱۵	۹۷/۲۲ ± ۰/۱۱

<sup>۱</sup> میانگین ۳ تکرار، حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری ( $P < 0.05$ ) 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<sup>-1</sup>) ماهی صبیتی در انتهای آزمایش (n = 3) (means ± SE)

Control	LEU	ILE	VAL
۳/۱۱ ± ۰.۰۲ <sup>a</sup>	۱/۳۹ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>	۱/۳۷ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>	۱/۳۸ ± ۰.۰۲ <sup>b</sup>
۲/۱۶ ± ۰.۰۱ <sup>a</sup>	۱/۲۲ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>	۱/۲۱ ± ۰ <sup>b</sup>	۱/۲۱ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>
۱/۳۵ ± ۰.۰۱ <sup>a</sup>	۰/۶ ± ۰ <sup>b</sup>	۰/۶ ± ۰ <sup>b</sup>	۰/۶ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>
۲/۹۸ ± ۰.۰۲ <sup>a</sup>	۱/۳۳ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>	۱/۳۱ ± ۰.۰۱ <sup>b</sup>	۱/۳۲ ± ۰.۰۲ <sup>b</sup>

<sup>۱</sup> حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت آماری ( $P < 0.05$ ) می‌باشد.

## بحث

اسیدهای آمینه می‌توانند به صورت پروتئین یا به صورت خالص به حالت کریستاله به‌عنوان مکمل غذایی فراهم گردند. افزایش استفاده از پروتئین‌های گیاهی در جیره 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

شناخته شده 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 به صورت کامل بیان نشده است و نتایج به دست آمده 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; Rodehutsord et al., 1997). هر چند Chance و همکاران (1964)، گزارش دادند که نیاز به ایزولوسین در ماهی آزاد چینوک (*Oncorhynchus tshawytscha*) با افزایش غلظت لوسین به آرامی افزایش یافت. تغذیه ماهی قزل‌آلای دریاچه‌ای (*Salvelinus namaychus*) با جیره‌های حاوی میزان افزایشی والین باعث تغییر در غلظت اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره می‌شود به گونه‌ای 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 به جز ضریب تبدیل غذایی در هیچ‌یک از تیمارهای دارای کمبود اسیدآمینه به صورت 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 به صورت معنی‌داری نسبت به دو تیمار ایزولوسین و لوسین افزایش یافت که این افزایش را با توجه به عدم تغییر 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 صیبتی 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 مطالعه‌ی در مورد تأثیر کمبود اسیدهای آمینه‌ی ضروری به خصوص اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره بر روی ماهیان در دسترس نمی‌باشد ولی مطالعات سنجش نیاز اسید آمینه‌ی بر اساس روش حذف اسید آمینه بر روی چندین گونه از ماهیان شامل قزل‌آلای رنگین کمان (Green and Hardy, 2002)، آزاد اطلس (Rollin et al., 2003)، سیم سرطلایی (*Sparus aurata*) (Peres and Oliva-Teles, 2009) و تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Diógenes et al., 2015) به انجام رسیده است که نتایج مشابه‌ی در عملکرد رشد در این مطالعات در جیره‌های دارای 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 از لحاظ 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

معنی داری 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 مشابهی در مورد اسیدهای آمینه 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 مواجهه 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 آنزیم‌های پانکراسی شامل تریپسین، لیپاز، آمیلاز و کربوکسی پپتیداز در روده و زوائد پیلوریک اندازه‌گیری شد که همه‌ی آنزیم‌های مورد مطالعه در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های دارای کمبود اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره به صورت معنی داری 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 به صورت کاملاً معنی داری همه‌ی فاکتورهای رشد و تغذیه‌ی ماهی تحت تأثیر قرار گرفت. این تغییرات در بین هر سه اسیدآمینه‌ی لوسین، ایزولوسین و والین بدون تغییر معنی دار 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 چهل درصدی هر یک از اسیدهای آمینه‌ی چند زنجیره در هر یک از جیره‌ها میزان این اسیدهای آمینه در لاشه ماهیان در بین تیمارها تغییر معنی داری را نشان ندادند که نشان‌دهنده ذخیره‌سازی این اسیدهای آمینه‌ی محدود شده 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 به گونه‌ای 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 فناوران کشور با کد شماره ۹۲۰۱۱۶۱۰ استخراج شده است. نویسندگان از پرسنل پژوهشکده آبی پروری جنوب کشور و ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی کمال تشکر و قدردانی را به جهت همکاری های صورت گرفته دارند.

## منابع

- 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'ia, 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.

- 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 eIF2 $\alpha$  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, Amsterdam. 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  $\alpha$ -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.

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