Archive of SID

تاثیر میکروکپسول‌های حاوی پپتید به‌عنوان جاذب تغذیه دو گونه ماهی زینتی آنجل (*Pterophyllum scalare*) و دیسکوس (*Symphysodon aequifasciatus*)

- **مهدی رضایی‌سیاهکوچه:** گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **ژاله خوشخو:** گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **نرگس مورکی** *: گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ١٣٩٧ تاریخ پذیرش: بهمن ١٣٩٧

چکیده

کاربرد موثرتر پروتئین نظیر استفاده از هیدرولیز پروتئینی به‌عنوان جزئی از جیره می‌تواند سبب بهبود کارائی جیره و بهبود شاخص‌های رشد شود. تحقیق حاضر باهدف تغذیه دو گونه‌ماهی زینتی *Pterophyllum scalare* و *Symphysodon aequifasciatus* با هیدرولیز پروتئینی بافت ماهی‌کولی با استفاده از عصاره آناناس و پوشش‌دهی آن با استفاده از آلژینات سدیم ٣درصد و افزودن به‌میزان ١/٥ و ٣ درصد به جیره و ارزیابی شاخص‌های رشد و تغذیه در طی ٦٠ روز انجام شد. برای تعیین سطح بهینه عصاره برای هیدرولیز مقایسه با آنزیم پروتئیناز K مقایسه صورت گرفت و با استفاده از روش بردفورد وSDS PAGE میزان پروتئین هیدرولیز شده بررسی گردید. هیدرولیز تهیه شده با استفاده از آلژینات سدیم پوشش‌دهی گردید و به جیره فرمول شده با نرم‌افزار Winfeed اضافه و استفاده شد. نتایج نشان داد پروتئیناز سیستئین موجود در عصاره توانایی بالایی در هیدرولیز پروتئین، معادل ٤٥ درصد دارد. نتایج ارزیابی کپسولاسیون با آلژینات سدیم نیز مشخص کرد که ٧٠ درصد هیدرولیز تولید شده پوشش‌دهی شده است، در بررسی به‌روش بردفورد میزان جذب قرائت شده معادل ٠/٦٤٩ و غلظت پروتئین معادل ١٤١/٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شد. بیش‌ترین میزان نرخ رشد ویژه (SGR) در رابطه با ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ٣ درصد میکروکپسول به‌ترتیب معادل ٢/٢٨ و ٢/٧١ گرم برای آنجل و دیسکس مشاهده شد و این تیمار با سایر گروه‌های آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<٠/٠٥). هم‌چنین کم‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی نیز در این گروه به‌ترتیب معادل ٠/٩٤ و ١/١ درصد محاسبه شد.

کلمات کلیدی: هیدرولیز پروتئینی، ماهیان زینتی، *Pterophyllum scalare*، *Symphysodon aequifasciatus*، جاذب تغذیه‌ای

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: n_mooraki@iau-tnb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولید و تجارت ماهیان زینتی یک جایگزین سودآور در بحث تکثیر و پرورش آبزیان می‌باشد. علی‌رغم اهمیت اقتصادی این بخش اطلاعات تغذیه‌ای برای ماهیان زینتی به‌اندازه ماهیان خوراکی پرورشی در دسترس نیست. بیش‌ترین مطالعات از گروه ماهیان زینتی آب‌شیرین بر روی گوپی و ماهی طلائی و از گروه نمونه‌های آب‌شور و دریازی دلقک‌ماهی مرجع مطالعات تغذیه‌ای می‌باشد (Corredor-Santamaria و Velasco-Santamaria، ۲۰۱۱). بخش قابل توجه اطلاعات موجود در این زمینه نیز به‌طور خاص در رابطه با ماهیان زینتی نمی‌باشد و بر مبنای نتایج حاصل از تحقیق بر روی ماهیان خوراکی پرورشی در شرایط مختلف پرورش به‌دست آمده است (Lovell، ۲۰۰۰). پیشنهاد شده است که ماهی دیسکوس به سبب رژیم گوشت‌خواری، نیازمند سطح بالائی از پروتئین در جیره (۴۴ تا ۵۰ درصد) است (Chong و همکاران، ۲۰۰۰). در جیره این گونه، کازئین، پودرماهی و قلب گاو از اهمیت بالائی در مقایسه با مواد اولیه نظیر آرد گندم و سویا در تهیه جیره دارد (Chong و همکاران، ۲۰۰۰). درخصوص ماهی آنجل نیز مشخص شده است که حداقل نیاز این گونه به پروتئین در جیره حدود ۳۰٪ بوده و کازئین از مواد اولیه حائز اهمیت در فرمولاسیون جیره محسوب می‌شود (Zuanon و همکاران، ۲۰۰۹). به‌منظور جلوگیری از آلودگی آب، ماهیان زینتی نیازمند مصرف موثر پروتئین جیره به شکلی هستند که تولید و ترشح آمونیاک را به‌حداقل رسانده و هم‌چنین در هزینه‌های تولید و تامین صرفه‌جویی به‌عمل آید (Janssens و Sales، ۲۰۰۳). از این‌رو در تحقیقاتی در خصوص جایگزینی پودرماهی با سایر انواع مواداولیه و یا استفاده از موادجاذب در جیره‌های غذایی و هم‌چنین استفاده از انواع هیدولیزهای پروتئنی به‌منظور افزایش مطلوبیت غذا، افزایش هضم و جذب و دسترسی زیستی موثر و در نهایت بهبود بازده تغذیه در دو دهه اخیر صورت گرفته است (Sudagar و همکاران، ۲۰۰۵؛ Corredor-Santamaria و Velasco-Santamaria، ۲۰۱۱؛ Janssens و Sales، ۲۰۰۳). Rodrigues و Kochenborger (۲۰۰۶) گزارش کردند که امکان تغذیه ماهی آنجل با جیره اکسترود به شکل پلت با محتوی پروتئین ۲۸٪ امکان‌پذیر است، اما رشد در ماهی ضعیف بوده و رشد ویژه کم‌تری در مقایسه با ماهیان تغذیه شده با غذای زنده مشاهده شد. از این‌رو استفاده از جاذب‌های شیمیایی در محیط آبی می‌تواند با پذیرش بهتر غذا از طریق تحریک سیستم بویایی و چشایی، افزایش سرعت تغذیه و در نتیجه جلوگیری از هم گسیختگی مواد و انحلال مواد مغذی و بهبود ضریب بازده تغذیه‌ای و در نهایت سبب کاهش هزینه‌های تولید جیره و غذادهی گردد. در سال‌های اخیر از مواد جاذب مختلفی مانند فین استیم (مخلوط بتائین و اسیدآمینه) و بتائین (تری متیل گلیسین) و انواع اسیدهای آمینه برای خوش‌خوراک کردن غذا استفاده شده است (Niroomand و همکاران، ۲۰۱۱؛ Mohanta و همکاران، ۲۰۰۹؛ Sudagar و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به توضیحات ارائه شده هدف از تحقیق حاضر تولید هیدرولیز پروتئینی از بافت کامل ماهی کولی (*Vimba vimba*) با استفاده از عصاره میوه آناناس و سپس پوشش‌دهی آن با استفاده از آلژینات سدیم و افزودن آن به جیره دوگونه ماهی آنجل و دیسکوس به‌میزان ۱/۵ و ۳ درصد وزن جیره مصرفی در راستای کاهش ضریب تبدیل غذایی و هدرروی غذا، و افزایش بازده رشد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه هیدرولیز پروتئینی: به‌منظور تهیه هیدرولیز پروتئینی از ماهی کولی (*Vimba vimba*) صید شده از ساحل استان مازندران که به‌صورت منجمد در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به تهران منتقل گردید، استفاده شد. به‌منظور انجام هیدرولیز از آنزیم پروتئیناز K تهیه شده از نماینده شرکت نووزایم و عصاره میوه آناناس (به سبب محتوی بالای آنزیم برملائین) استفاده شد. برای تهیه عصاره میوه آناناس، قطعات میوه پس از پوست کنی داخل خردکن ریخته شد و پس از ریز شدن بافت عصاره آبی آن با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه گردید. آنزیم و عصاره تهیه شده تا زمان مصرف در دمای یخچال نگه‌داری شدند. ماهی کولی تهیه‌شده پس از انجماد زدایی، شست‌وشو و آبگیری در چرخ گوشت با مش ۲ میلی‌متر چرخ گردید و داخل ارلن مایر ریخته شد. سپس سوسپانسون گوشت ماهی و عصاره به‌شرح زیر به‌منظور تعیین بهترین حجم عصاره آناناس در مقایسه با آنزیم پروتئیناز K برای انجام عمل هیدرولیز تهیه شد:

۴ گرم ماهی کولی چرخ شده+۱ میلی‌لیتر عصاره آناناس+۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴ گرم ماهی کولی چرخ شده+۳ میلی‌لیتر عصاره آناناس +۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴ گرم ماهی کولی چرخ شده+۵ میلی‌لیتر عصاره آناناس+۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴ گرم ماهی کولی چرخ شده +۱۰ میلی‌لیتر عصاره آناناس+۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴ گرم ماهی کولی چرخ شده+۳ میکرولیتر پروتئیناز K با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر+۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴ گرم ماهی کولی چرخ شده +آب به عنوان شاهد+۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر

با توجه به‌روش تعدیل شده Taheri و همکاران (۲۰۱۰) ارلن‌ها برای انجام عمل هیدرولیز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس به‌منظور توقف عمل فرآیند هضم در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه میکروفیوژ شدند. بعد از جدا کردن فاز رویی حاصل از سانتریفوژ به‌منظور اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا

www.SID.ir

Archive of SID

معرف بردفورد با اضافه کردن ۱۰۰ میلی‌گرم رنگ کوماسی بلو به ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ و هم‌زدن تا حصول رنگ، سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفوریک ۸۵٪ را آرام به محلول اضافه کرده و حل می‌گردد. حجم محلول با آب مقطر به ۱ لیتر رسانده می‌شود و روی شیکر کاملاً حل شده و پس از آن با کاغذ صافی، محلول صاف می‌گردد. برای رسم منحنی استاندارد بردفورد از آلبومین سرم گاوی (bovine serum albumin) استوک ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه می‌گردد. از این استوک رقت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ ، ۵۰ و ۶۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه می‌شود و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت را به‌صورت جداگانه به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته و به هر کدام ۲ میلی‌لیتر معرف بردفورد اضافه کرده و به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته می‌شود و سپس در OD برابر ۵۹۵ قرائت شد. در نهایت ۲۸۵۰ میکرولیتر معرف بردفورد + ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون در کووت اضافه می‌گردد. سپس ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگه داشته و میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر بررسی گردید. اعداد به‌دست آمده را در برنامه اکسل قرار داده و منحنی مربوط رسم شد. جهت ساخت بلانک منحنی استاندارد، ۱۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر با ۲ میلی‌لیتر معرف بردفورد مخلوط می‌شود. پس از اندازه‌گیری محتوی پروتئین، به‌منظور تعیین کیفیت هیدرولیز تهیه شده از روش SDS PAGE استفاده گردید. برای این هدف ابتدا چاهک‌ها و پیج با استفاده از ژل، قطعات شیشه‌ای و تانک الکتروفورز تهیه گردید. نمونه‌های سوسپانسیون، به ازای هر ۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر لودینگ زده و حدود ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد. سپس به‌آرامی درون چاهک ریخته و با ولتاژ ۷۰ به‌مدت ۴۰ دقیقه ران شد. پس از این زمان، ژل از تانک جدا کرده و داخل محلول رنگ‌آمیزی که از قبل بر روی شعله گرم شده به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ژل را خارج کرده و درون بشر حاوی آب که در دمای جوش قرار دارد انداخته شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه آب را خارج کرده و آب‌جدید به روی ژل‌ریخته شد و دوباره آرام حرارت داده شد. این کار چند بار تکرار می شود و در انتها در آب قرار داده و ۱ الی ۲ روز در دمای آزمایشگاه نگه داشته شد تا ژل رنگ را از دست بدهد.

پوشش‌دهی هیدرولیز تهیه شده (میکروکپسولاسیون): پس از ارزیابی کمی و کیفی هیدرولیز تهیه شده از بافت کامل بدنی ماهی‌کولی و انتخاب بهترین حالت از بین ۶ گروه معرفی شده در بخش قبل، با استفاده از آلژینات‌سدیم ۳٪ و کلریدکلسیم پوشش‌دهی هیدرولیز تولیدی به‌منظور افزودن به جیره ماهیان در مرحله بعد انجام شد. سوسپانسیون حاصل از هیدرولیز با ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آناناس که بهترین حالت را از نقطه نظر محتوی پروتئین محلول و هم‌چنین تشکیل باند در SDS PAGE نشان داد (نتایج در ادامه ارائه شده است)، به ۱۰۰ میلی‌لیتر آلژینات سدیم ۳٪ تهیه شده در مرحله قبل اضافه گردید و خوب مخلوط می‌گردد تا یک محلول کاملاً یکدست و شفاف حاصل گردید. محلول حاصل به‌درون ظروف مخصوص سرم، انتقال داده شد. روش انتقال محلول به ظرف حاوی کلریدکلسیم ۳ مولار طوری طراحی گردید که محلول از بالا به پایین و با یک ست سرم به‌آرامی و قطره قطره به کلریدکلسیم اضافه گردید. در حین اضافه شدن و تشکیل کپسول، ظرف حاوی کلریدکلسیم بر روی شیکر به آرامی شیک می‌شود تا کپسول‌های کاملاً یکدست تهیه گردد. در انتها کپسول‌های تشکیل شده، به‌آرامی با آب شست‌وشو داده و در یخچال نگه‌داری می‌گردد.

بررسی محتوی پروتئین کپسول‌ها: پس از پوشش‌دهی سوسپانسیون و تشکیل کپسول، بررسی محتوی پروتئین محصور شده در داخل کپسول انجام شد. ابتدا ۱ گرم از کپسول آماده شده در مرحله قبل، به‌داخل میکروتیوپ انتقال داده شد. پس از شکستن کپسول‌ها، یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و پروتئین در آب حل گردید. تست بردفورد و SDS PAGE مطابق آن‌چه در مرحله قبل توضیح داده شد، به‌طور مجدد انجام شد.

آماده‌سازی جیره‌های آزمایشی: سه جیره غذایی ایزوکالریک و ایزوپروتنینوس با سطح مشخص ۴۰٪ پروتئین با استفاده از مواد اولیه به‌شرح جدول ۱ و برمبنای فرمول تهیه شده توسط نرم‌افزار Win feed ۲،۸ تهیه شدند. مواد اولیه در ابتدا توسط آسیاب برقی خرد و الک (قطر ۱ میلی‌متر) شدند سپس میزان هرکدام براساس فرمول تهیه شده محاسبه و وزن گردید سپس با یکدیگر به‌صورت همگن مخلوط شده همراه با افزودن میکروکپسول‌ها و در نهایت با اضافه کردن آب و روغن به‌شکل خمیر درآورده شدند. خمیرهای موردنظر به‌رشته‌های اکسترود تبدیل و در داخل کیسه‌های پلاستیک در یخچال نگه‌داری شدند. ماهیان متناسب با میزان اشتها روزانه حدود ۲/۵ تا ۳ درصد بیوماس سه مرتبه در روز (۹، ۱۵و۲۰) تغذیه شدند. جیره‌های غذایی مورد نظر پس از آماده‌سازی برای حصول اطمینان از کیفیت و ترکیب تقریبی به آزمایشگاه منتقل شدند و میزان پروتئین با استفاده از روش کجلدال، چربی خام مطابق با روش سوکسله توسط دستورالعمل AOAC (۱۹۹۰) اندازه‌گیری گردید. رطوبت، فیبر، خاکستر، کربوهیدرات نیز به‌روش ارائه‌شده توسط دستورالعمل AOAC (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شدند، نتایج در جدول ۱ ارائه شدند.

معرفی تیمارهای غذایی: در این بخش آزمایش جیره‌های غذایی در قالب سه تیمار و یک گروه شاهد براساس درصد میکروکپسول‌های تولیدی و افزودن هیدرولیز پروتئینی به جیره و هم‌چنین لحاظ بعد اقتصادی استفاده از این نوع مکمل تعریف شد. هریک از گروه‌های آزمایشی در ۳ تکرار بررسی شد. گروه شاهد (C): جیره پایه فاقد

www.SID.ir

Archive of SID

میکروکپسول و هیدرولیز پروتئینی، تیمار اول (T1): جیره پایه حاوی ۱/۵ درصد هیدرولیز پوشش‌دهی شده، تیمار دوم (T2): جیره پایه حاوی ۳ درصد هیدرولیز پوشش‌دهی شده، تیمار سوم (T3): جیره پایه حاوی ۱/۵ درصد هیدرولیز فاقد پوشش.

جدول۱: اجزای غذایی و آنالیز شیمیایی تقریبی هریک از جیره‌های آزمایشی برحسب درصد، فرموله شده توسط نرم‌افزار Win Feed 2/8

تیمار / مواد غذایی	جیره پایه حاوی ۴۰ درصد پروتئین
پودر ماهی	۲۶/۴۵
آرد مخمر	۲۲/۵۶
گلوتن گندم	۱۷/۰۴
روغن سویا	۱
آرد گندم	۳
لسیتین	۲
دی‌کلسیم فسفات	۱۲/۹۵
مجموع افزودنی‌ها*	۱۵
آنالیز شیمیایی:	
ماده خشک (درصد)	۹۴/۰۸
پروتئین خام	۴۰/۳۲
چربی خام	۵/۹۶
فیبر	۱/۶۰
خاکستر	۴/۵۶
کربوهیدرات	۷/۴۰
انرژی (گرم/کیلوکالری)	۲۴۴/۵۲

*مواد افزودنی: آستاگزانتین ۰/۰۴۹درصد، فلفل قرمز۲درصد، آنتی‌اکسیدان ۰/۰۷۶ درصد، هم‌بند ۱درصد، مخلوط مواد معدنی ۱/۵ درصد، مخلوط مواد ویتامینی ۲ درصد، ال‌کارنیتین ۱/۱۷۶ درصد، ضدقارچ ۰/۳۳درصد، متیونین ۱ درصد، لیزین ۱ درصد، سبوس گندم ۰/۵درصد، پودرسیر ۲/۳ درصد، کولین کلراید ۲ درصد

تهیه ماهیان و آماده‌سازی آکواریوم‌ها: برای انجام این بررسی تعداد ۱۲۰ عدد بچه‌ماهی زینتی آنجل (*Pterophyllum scalare*) با میانگین وزنی ۲/۵ گرم و میانگین طول چنگالی ۳/۹ سانتی‌متر و ۱۲۰ عدد بچه‌ماهی زینتی دیسکوس (*Symphysodon aequifasciatus*) با میانگین وزنی ۲/۳ گرم و میانگین طول چنگالی ۳/۸ سانتی‌متر مورد استفاده قرار گرفت. ماهی‌ها در مخازن ۵۰ لیتری حاوی آب شیرین بدون کلر قرار گرفتند و به‌مدت یک هفته با محیط سازگار شدند در طول هفته ماهی‌ها از لحاظ آلودگی انگلی و باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تهیه جیره‌های آزمایشی ماهی‌ها براساس ۲ درصد وزن بدن در قالب سه وعده در روز، به‌مدت ۴۵ روز غذادهی شدند. تلفات به‌صورت روزانه بررسی و یادداشت شد. درصد غذادهی با توجه به‌اندازه بچه‌ماهی‌ها و بیومتری هفتگی ماهیان دستخوش تغییر بود. هر ۱۵ روز یک‌بار ۵۰ درصد ماهیان هر تکرار بعد از بی‌هوشی با اسانس گل میخک (۱۰۰ تا ۱۲۰ پی‌پی‌ام) به‌صورت تصادفی صید شده و بیومتری شدند. ۱۸ ساعت قبل از بیومتری غذادهی قطع گردید. آب آکواریوم به‌صورت روزانه تعویض شد. برای هوادهی و تأمین اکسیژن به هر تانک سنگ هوا متصل به منبع هواده استفاده شد (جدول ۲). طول دوره غذادهی ۶۰ روز درنظر گرفته شد.

جدول ۲: دامنه تغییرات پارامترهای آب آکواریوم‌ها در طول دوره پرورش

فاکتور	pH	دما (سانتی‌گراد)	اکسیژن محلول (ppm)	نیتریت (میلی‌گرم بر لیتر)	سختی کل (میلی‌گرم بر لیتر)
مقدار	۵/۵-۶/۷	۱±۲۷	۵-۶/۸	۰/۰۲	۱۷۰±۰/۵

بررسی پارامترهای رشد و تغذیه‌ای: برای محاسبه بازده رشد، تغذیه و میزان بقاء از فرمول‌های زیر استفاده گردید (Tacon، ۱۹۸۷؛ Ergun و همکاران، ۲۰۱۰؛ Erdogan و همکاران، ۲۰۱۲):

٪WG (درصد افزایش وزن بدن) =

[وزن اولیه (گرم) / وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)] ×۱۰۰

$SGR\ (\%\ day^{-1})$ (نرخ رشد ویژه) =

[تعداد روزهای غذادهی/ لگاریتم وزن اولیه(گرم)- لگاریتم وزن نهایی (گرم)] ×۱۰۰

FCR= (ضریب تبدیل غذایی) غذای مصرفی(گرم) / وزن بدن (گرم)

CF (فاکتور چاقی) =

[طول نهایی ماهیان در انتهای پرورش (سانتی‌متر)/وزن نهایی ماهیان در انتهای پرورش (گرم)] ×۱۰۰

٪LG (درصد افزایش طول بدن) =

[طول اولیه (میلی‌متر)/طول اولیه (میلی‌متر)- طول نهایی (میلی‌متر)] × ۱۰۰

آنالیز آماری: آنالیز آماری با ورود داده‌های حاصل از انجام زیست‌سنجی به صفحات گسترده اکسل آغازگردید. در نرم‌افزار اکسل میانگین داده‌ها محاسبه گردید و سپس به نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ منتقل شد تا از نظر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بررسی شوند. بااستفاده‌از آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال‌بودن پراکنش داده‌ها مشخص شد و سپس با استفاده از آزمون One-Way ANOVA وجود یا عدم وجود اختلاف بررسی گردید و پس از مشاهده اختلاف معنی‌دار از آزمون Post hoc LSD در سطح معنی داری ($P<0/05$) برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها استفاده گردید.

نتایج

هیدرولیز پروتئینی: نتایج حاصل از هیدرولیز بافت کامل ماهی کولی (*Vimba vimba*) با استفاده از عصاره آناناس در مقایسه با آنزیم پروتئیناز K در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه به جدول ۳ مشاهده می‌گردد، بالاترین میزان غلظت پروتئین مربوط به تیمار با ۳ میکرولیتر پروتئیناز k (۲۳۶/۷۷ میکروگرم/میلی‌لیتر) می‌باشد اما به‌دلیل هزینه

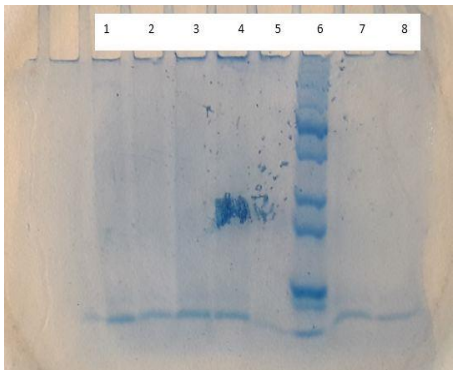
www.SID.ir

Archive of SID

بالای استفاده از این آنزیم، هیدرولیز پروتئین با استفاده از عصاره آناناس انجام گردید. هیدرولیز تهیه شده با ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آناناس بالاترین میزان غلظت پروتئین تیمار شده را (۲۰۲/۳۴ میکروگرم/میلی‌لیتر) به‌دست آورد. با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌گردد که اندازه پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آناناس بسیار کوچک می‌باشد.هم‌چنین در ناحیه پروتئین‌ها اسمیر (کشیدگی باند) مشاهده می‌گردد که این اسمیر به‌دلیل هیدرولیز شدن پروتئین‌ها به اندازه‌های مختلف می‌باشدکه باعث شده درطول‌ژل SDS به‌صورت‌خطی کشیده دیده شود. اما بیش‌تر پروتئین‌ها به‌طور کامل هیدرولیز شده‌اند و یک باند شارپ در پائین لدر ایجاد نموده‌اند.

جدول ۳: نتایج حاصل از بررسی کمی پروتئین‌های نمونه‌های مورد نظر به‌روش بردفورد حاصل از هیدرولیز بافت کامل ماهی کولی (*Vimba vimba*)

نمونه	میزان سوسپانسیون	مقدار جذب	غلظت پروتئین (میکروگرم/میلی‌لیتر)
شاهد	۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴ میلی لیتر بدن ماهی	۰/۲۳۶	۶۹/۲۰
تیمار با ۱ میلی لیتر آناناس	۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴ میلی لیتر بدن ماهی	۰/۲۵۴	۷۴/۶
تیمار با۳ میلی لیتر آناناس	۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴ میلی لیتر بدن ماهی	۰/۳۵۸	۱۰۵/۸۴
تیمار با ۵ میلی لیتر آناناس	۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴ میلی لیتر بدن ماهی	۰/۶۱۹	۱۸۴/۲۲
تیمار با ۵ میلی لیتر آناناس	۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴ میلی لیتر بدن ماهی	۰/۷۶۹	۲۰۲/۳۴
تیمار با ۳ میکرولیتر پروتئیناز k	۲۰ میلی لیتر آب مقطر و ۴ میلی لیتر بدن ماهی	۰/۸۲۳	۲۳۶/۷۷



شکل۱: بررسی کیفی پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از SDS PAGE، ۵-۱: پروتئین هیدرولیز شده، ۶: لدر پروتئین، ۷و۸: پروتئین هیدرولیز شده

پوشش‌دهی هیدرولیز تهیه شده: با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی میکروکپسول‌های تولیدی از نقطه‌نظر محتوی پروتئین مشاهده می‌گردد که تقریباً ۷۰ درصد پروتئین‌های هیدرولیز شده بافت ماهی کولی با ۱۰ میلی‌لیتر عصاره آناناس، با استفاده از آلزینات سدیم ۳ درصد پوشش‌دهی شده‌اند، به گونه‌ای که در بررسی به‌روش بردفورد میزان جذب قرائت شده معادل ۰/۶۴۹ و غلظت پروتئین معادل ۱۴۱/۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.

پارامترهای رشد و تغذیه‌ای: با توجه به جدول ۴، بیش‌ترین میزان نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار ۲ که در آن ماهیان آنجل با جیره حاوی ۳ درصد میکروکپسول تغذیه شده بودند (۲/۲۸) به‌دست آمد و این تیمار با سایر تیمارهای آزمایشی و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی (FCR) ماهیان آنجل نیز در این تیمار دارای کم‌ترین میزان بود و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای‌آزمایشی نشان داد(p<۰/۰۵).نتایج به‌دست آمده درخصوص فاکتور وضعیت (CF) ماهیان آنجل هیچ اختلاف معنی‌داری نشان نداد (p<۰/۰۵). کم‌ترین میزان درصد افزایش وزن (WG) و ضریب رشد روزانه (DGC) ماهیان آنجل در تیمار شاهد به‌ترتیب معادل ۱۵۸/۳۶ و ۱۸۳/۰۱ به‌دست آمد و بیش‌ترین میزان این شاخص‌ها در تیمار ۳ درصد میکروکپسول معادل ۱۸۰ و ۱۸۸/۰۷ به‌دست آمد و این تیمار اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد (p<۰/۰۵). درصد افزایش طول (LG) ماهیان آنجل در تیمارهای شاهد، ۱/۵ درصد میکروکپسول و ۱/۵ درصد هیدرولیز فاقد کپسول هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ولی این سه تیمار با تیمار ۳ درصد میکروکپسول اختلاف معنی‌داری نشان دادند (p<۰/۰۵) و این شاخص در این تیمار دارای بالاترین میزان بود. با توجه به جدول ۵، بیش‌ترین میزان نرخ رشد ویژه (SGR) ماهیان دیسکوس در تیمار ۳ درصد میکروکپسول تغذیه شده (۲/۷۱) به‌دست آمد و این تیمار با سایر تیمارهای آزمایشی و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). ضریب تبدیل غذایی (FCR) ماهیان دیسکوس نیز در این تیمار کم‌ترین میزان را (۱/۱) به‌دست آورد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد(p<۰/۰۵).درخصوص فاکتور وضعیت (CF) ماهیان دیسکوس هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید(p<۰/۰۵).کم‌ترین میزان درصدافزایش وزن (WG) و ضریب رشد روزانه (DGC) ماهیان دیسکوس در تیمار شاهد به‌ترتیب ۲۱۶/۰۴ و ۱۹۰/۵۷ به‌دست آمد و بیش‌ترین میزان این شاخص‌ها در تیمار ۳ درصد میکروکپسول ۲۳۹/۵۶ و ۱۹۵/۲۷ به‌دست آمد و این تیمار اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد (p<۰/۰۵). درصد افزایش طول (LG) ماهیان دیسکوس نیز در تیمار ۳ درصد میکروکپسول اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارهای‌آزمایشی‌داشته(p<۰/۰۵)ودارای بالاترین میزان‌بودولی‌سایر تیمارهای آزمایشی با یکدیگر و تیمار شاهد اختلافی از این لحاظ نشان ندادند (p<۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴: نتایج مربوط به پارامترهای رشد بچه‌ماهی آنجل تغذیه شده با مقادیر مختلف میکروکپسول‌ها

پارامتر	تیمارها			
	شاهد	۱/۵ درصد میکروکپسول	۳ درصد میکروکپسول	۱/۵ درصد اسپری
نرخ رشد ویژه (SGR)	۲/۱±۰/۱۵^{c}	۲/۱۷±۰/۱۲^{bc}	۲/۲۸±۰/۱۴^{a}	۲/۲۱±۰/۱۵^{b}
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	۱/۰۷±۰/۱۲^{a}	۱/۰۲±۰/۰۹^{ab}	۰/۹۴±۰/۱^{c}	۰/۹۹±۰/۱۱^{bc}
فاکتور وضعیت (CF)	۴/۰۴±۰/۳۶^{a}	۴/۱۳±۰/۵^{a}	۴/۱۷±۰/۳۶^{a}	۴/۲۳±۰/۴۷^{a}
درصدافزایش وزن (WG)	۱۵۸/۳۶±۱۷/۹۸^{c}	۱۶۵/۹۱±۱۴/۶۹^{bc}	۱۸۰±۱۷/۸۲^{a}	۱۷۰/۶۲±۱۷/۷۶^{b}
درصدافزایش طول (LG)	۳۹/۲۹±۳/۴۲^{b}	۳۹/۸۲±۴/۹۸^{ab}	۴۱/۵۹±۳/۵۹^{a}	۳۹/۴۳±۴/۳۴^{ab}
ضریب رشد روزانه (DGC)	۱۸۳/۰۱±۴/۳^{c}	۱۸۴/۸۳±۳/۴۷^{bc}	۱۸۸/۰۷±۴/۰۷^{a}	۱۸۵/۹۱±۴/۱۳^{b}

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۵: نتایج مربوط به پارامترهای رشد بچه‌ماهی دیسکوس تغذیه شده با مقادیر مختلف میکروکپسول‌ها

پارامتر	تیمارها			
	شاهد	۱/۵ درصد میکروکپسول	۳ درصد میکروکپسول	۱/۵ درصد اسپری
نرخ رشد ویژه (SGR)	۲/۵۵±۰/۱۴^{c}	۲/۶۱±۰/۱۱^{bc}	۲/۷۱±۰/۱۳^{a}	۲/۶۵±۰/۱۳^{b}
ضریب تبدیل غذایی (FCR)	۱/۲۲±۰/۱۱^{a}	۱/۱۷±۰/۰۸^{b}	۱/۱±۰/۰۹^{c}	۱/۱۵±۰/۱^{b}
فاکتور وضعیت (CF)	۲/۸۵±۰/۲۲^{a}	۲/۹۱±۰/۳۱^{a}	۲/۹۴±۰/۲۲^{a}	۲/۹۷±۰/۲۹^{a}
درصدافزایش وزن (WG)	۲۱۶/۰۴±۱۹/۵۴^{c}	۲۲۴/۲۴±۱۵/۹۶^{bc}	۲۳۹/۵۶±۱۹/۳۷^{a}	۲۲۹/۳۷±۱۹/۳^{b}
درصدافزایش طول (LG)	۶۶/۹±۳/۵۱^{b}	۶۷/۴۵±۵/۱۱^{ab}	۶۹/۲۶±۳/۶۸^{a}	۶۷/۰۴±۴/۴۶^{ab}
ضریب رشد روزانه (DGC)	۱۹۰/۵۷±۳/۹۷^{c}	۱۹۲/۲۶±۳/۲۱^{bc}	۱۹۵/۲۷±۳/۷۸^{a}	۱۹۳/۲۶±۳/۸۳^{b}

*حروف متفاوت در هر ردیف نشانه تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

در پژوهش حاضر، با استفاده از عصاره آناناس و پروتئیناز k، هیدرولیز پروتئین‌های ماهی انجام شد. پروتئیاز سیستئین موجود در عصاره‌آناناس توانایی بالایی در هیدرولیز پروتئین دارد. در این پژوهش عصاره آناناس باعث هیدرولیز ۴۵ درصدی پروتئین و پروتئیناز k باعث هیدرولیز تقریباً ۷۵ درصدی پروتئین گردید. اما به‌دلیل آن که عصاره آناناس طبیعی بوده و مقرون به‌صرفه است در این پژوهش استفاده گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که با افزودن مکمل هیدرولیزی به جیره غذایی، میزان رشد و افزایش‌وزن در جیره پایه حاوی ۳ درصد هیدرولیز پروتئین پوشش‌دار به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که دلیل آن می‌تواند این باشد که کارآیی رشد ماهی با میزان مصرف این جیره غذایی ارتباط مستقیمی دارد. این افزایش رشد می‌تواند از این جهت موردبررسی‌قرار گیرد که این محتوی پروتئینی هیدرولیز شده احتمالاً دارای پپتیدهای آروماتیک بوده است که سبب افزایش جذابیت غذا از نقطه نظر ایجادبوی مطبوع برای آبزی‌هدف گردیده است.در بیش‌تر مطالعات و تحقیقات صورت گرفته افزایش میزان رشد با افزایش سطح محتوی پروتئین در جیره صورت می‌گیرد، در این خصوص لازم به‌ذکر است که افزایش پروتئین در جیره‌غذایی‌ماهی‌باید به‌صورت کنترل شده و تا یک سطح معینی باشد چرا که باعث کاهش تغییر مسیر قسمتی از انرژی رشد و مصرف شدن آن برای آمین‌زدایی می‌شود. در پژوهشی که Lee و همکاران (۲۰۱۰) انجام دادند از سطوح مختلفی از پروتئین جهت تغذیه ماهیان استفاده شد. نتایج این تحقیقات نشان داد که با افزایش سطح پروتئین جیره غذایی از ۴۰ به ۵۰ درصد میزان کارایی رشدبه‌طورمعنی‌داری‌افزایش‌می‌یابد.هم‌چنین‌در پژوهشی که Ozório و همکاران (۲۰۰۹) بر روی *Diplodus vulgaris* انجام دادند، نشان داده شد که با افزایش پروتئین جیره عملکرد رشد کاهش یافت. دو احتمال برای این یافته وجود دارد که می‌توان این گونه بیان نمود، که سطح بالای پروتئین در جیره منجر به تجمع آمینواسیدهای آزاد در بدن گردیده و تولید سم می‌کند و یا این‌که هزینه‌ای که بابت دفع آمینو اسیدهای اضافی داده می‌شود ممکن است باعث کاهش میزان رشد گردد. بنابراین باید به این موضوع نیز توجه گردد که میزان پروتئین جیره غذایی نباید از درصد مشخصی بالاتر رود. Jauncey و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای که بر روی گربه‌ماهی آسیایی انجام‌دادند به این نتیجه رسیدند که ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۳۵٪ پروتئین دارای بالاترین میزان رشد و افزایش وزن بودند درحالی‌که با افزایش درصد پروتئین از ۳۵ درصد به ۴۵ درصد، میزان رشد کاهش یافت. از این‌رو کاربرد مکمل‌هایی که بتواند جذابیت غذا را برای مصرف

www.SID.ir

Archive of SID

کننده افزایش دهد به‌مراتب راهکار منطقی‌تر در مقایسه با افزایش سطح پروتئین جیره می‌باشد، که در تحقیق حاضر ملاحظه می‌شود. در این پژوهش با توجه به آنالیزهای انجام شده بر روی پروتئین‌های هیدرولیزشده‌مشخص گردید که حدود ۷۰ درصد از پروتئین هیدرولیز شده‌در میکروکپسول‌ها محصور گشته‌اند. این میکروکپسول‌ها به‌عنوان جاذب غذایی مورد استفاده قرار گرفت که باعث افزایش وزن ماهیان مورد آزمایش گردید. ضریب تبدیل غذایی در این مطالعه تحت تأثیر سطوح مکمل جیره قرار گرفت و کم‌ترین میزان آن در ماهیان تغذیه شده با میکروکپسول‌ها ۳ درصد، در ماهی آنجل (۰/۹۴) و در ماهی دیسکوس (۱/۱) به‌دست آمد. مشابه چنین روندی در تحقیقات انجام شده‌توسط Mohanta و همکاران(۲۰۰۹) بر روی بارب نقره‌ای به‌دست آمد. در پژوهش Mohanta و همکاران (۲۰۰۹)، از میکروکپسول‌های تهیه‌شده با کراتین حاوی پروتئین‌های محصور شده در آن برای تغذیه بارب نقره‌ای استفاده گردید. نتایج حاصل از این پژوهش مشخص نمود که‌تغذیه‌بارب نقره‌ای با این میکروکپسول‌ها باعث افزایش ۴۵ درصدی وزن ماهیان شد. در پژوهشی که Coutinho و همکاران (۲۰۱۲) بر روی تغذیه ماهیان زینتی سیلور انجام دادند، از میکروکپسول‌های آلژینات سدیم حاوی چربی و پروتئین به‌منظور تغذیه ماهی استفاده نمود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جیره حاوی ۳۵ درصد پروتئین با چربی ۱۵ درصد به‌عنوان یک جیره غذایی کاربردی برای رشد بهینه ماهی سیلور می‌باشد. هم‌چنین در مطالعه‌ای که Lee و Kim (۲۰۰۵) بر روی بهینه‌سازی تغذیه ماهیان زینتی انجام دادند از میکروکپسول‌های حاوی آمینواسیدهای ضروری جهت رشد ماهیان دیسکوس *Symphysodon aequifasciatus* استفاده نمودند. برطبق نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین میزان نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمار ۲ که در آن ماهیان آنجل با جیره حاوی ۳ درصد میکروکپسول تغذیه شده بودند (۲/۲۸) و در ماهی دیسکس (۲/۷۱) به‌دست آمد و این تیمار با سایر تیمارهای آزمایشی و شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی، به‌دست آوردن حداکثر بازیافت اجزای قابل دسترس با حفظ کیفیت بالا (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بالا) در آن‌هاست. در بسیاری از تحقیقات، هیدرولیزهای پروتئینی را فارغ از منبع تهیه آن‌ها جایگزین سهمی از مهم‌ترین ماده اولیه سازنده جیره یعنی پودر ماهی و یا سایر منابع پروتئینی می‌نماید که این جایگزینی معمولاً بیش از ۱۰ تا حدود ۳۰ درصد می‌باشد. این جایگزینی از دو بعد قابل بررسی است، اول هزینه تولید این جایگزین هیدرولیزی با توجه به حجم مصرف و درصد کاربرد در جیره، و وجه دیگر آن است که در برخی مطالعات مشخص شده که با افزایش درصد جایگزینی‌شاخص‌های‌رشد و تغذیه‌ای ماهی کاهش‌می‌یابد، برای مثال در تحقیق طاهری و همکاران (۱۳۹۰) تغذیه آلوین‌های قزل‌آلا با هیدرولیز پروتئینی صورت گرفت و مشخص شد که بهترین نتیجه در سطح ۱۰ درصد جایگزینی حاصل شده و با افزایش سهم هیدرولیز در جیره شاخص رشد دست‌خوش کاهش می‌شود. از سوی دیگر تغذیه لارو ماهی کپور معمولی با پروتئین هیدرولیز شده ماهی سبب افزایش رشد و بهبود کارائی تغذیه شد (Carvalho و همکاران، ۱۹۹۷). این روند در تغذیه لاروماهی آزاد اقیانوس اطلس نیز دیده شد (Storebakken و Berge، ۱۹۹۶). نتایج تحقیق حاضر برخلاف نتایج به‌دست آمده توسط طاهری و همکاران (۱۳۹۰) که عنوان نمودند اسیدهای آمینه آزاد سبب افزایش‌مقبولیت غذای حاوی پروتئین هیدرولیز شده برای آلوین‌های قزل‌آلا نمی‌شود، است. از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد دو ماهی آنجل و دیسکوس در واکنش به پپتیدهای آروماتیک در غذا مثبت می‌باشد. این واکنش مثبت بدان جهت قابل توجیه است که سطح کاربرد هیدرولیز پروتئینی در تحقیق حاضر کم‌تر از سطح اشباع‌کننده‌انتقال‌دهنده‌های پپتیدی‌روده بوده است.جذب‌مواد مغذی در روده‌عمدتاً توسط‌سلول‌های انتروسیت در ترکیب با انتقال‌دهندگان مختلف صورت می‌گیرد (Mailliard و همکاران، ۱۹۹۵). اشباع شدن و رقابت اسیدهای آمینه برای انتقال باتوجه به محدود بودن انتقال دهنده‌های پپتیدی می‌تواند از دلایل کاهش رشدماهی تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطح بالای آمینواسیدهای آزاد باشد (Bakke-McKellep وهمکاران، ۲۰۰۰؛ Kokovski و همکاران، ۲۰۰۰). براساس نتایج مطالعه اخیر استفاده از منابع مختلف پروتئینی موجب افزایش رشد در دو گونه ماهی مورد مطالعه (ماهی آنجل و دیسکوس) شد. نقش اسیدآمینه آزاد و پپتیدهای زنجیر کوتاه در رشد لاروها توسط چندین نویسنده مورد بررسی قرار گرفته است. Pezzato و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که تائورین و پیش‌سازهای آن متیونین و سیستئین و لوسین ممکن است رشد در لاروهای کفشک را محدود کند. با این وجود، افزودن اسیدهای آمینه آزاد به رژیم غذایی باعث افزایش ترشح ترپسین در مراحل اولیه لارو می‌شود، که نشان می‌دهد عملکرد هضم پانکراس بهبود می‌یابد (Cahu، ۲۰۰۱). علاوه بر عملکرد تغذیه‌ای خود، اسیدهای آمینه آزاد ممکن است نقش مهمی در تغذیه اول با عمل به‌عنوان جذب کننده‌های شیمیایی داشته باشند. Williams و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که جایگزینی ۲۰ درصدغذای ماهی با تریپپتیدهای‌رژیم غذایی، از پودر هیدرولیز ماهی در رژیم غذایی باعث بهبود پارامترهای اصلی بیولوژیکی (رشد، بقا و شکل‌گیری اسکلت) در پرورش لارو سی‌باس می‌شود هم‌چنین ترکیب دو و سه پپتید با رژیم غذایی موجب بهبود رشد شد، هنگامی‌که یک ترکیب آمینواسید موفق‌به ایجادهمان اثر نشد. اثر مفید پپتیدهای رژیم غذایی را می‌توان در وجود حمل و نقل خاص بین لایه‌های مختلف و افزایش فعالیت پپتیداز سیتوزولی در لاروها بیان کرد. هم‌چنین در بچه‌ماهی‌ها،

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت سیتوزولی کاهش می‌یابد و هیدرولیز برای رشد کم‌تر کارآمد می‌باشد.این پژوهش برای‌اولین‌بار در ایران با هدف تولید میکروکپسول حاوی پپتید با قابلیت‌افزایش اشتهای آبزی به تغذیه انجام شد. با تاکید بر این نکته که افزودن پپتید نیز به جیره غذایی آبزیان گوشت‌خوار و همه‌چیزخوار بسیار قابل توجه می‌باشد. تحت تاثیر ماهیت پروتئین مورد استفاده، تولید پپتید می‌تواند به‌عنوان جاذب در محیط، ماهی را به تغذیه بیش‌تر ترغیب نماید که این خود، سبب کاهش ضریب تبدیل غذایی و احتمالاً افزایش رشد، در بازه زمانی مشخص می‌گردد. از سوی دیگر مصرف پپتیدها برای ماهی با توجه به نیاز به هضم کم‌تر و جذب سریع‌تر، سبب افزایش میزان رشد (از طریق تاثیر بر شرایط متابولیسمی) و بازده اقتصادی بیش‌تر برای پرورش‌دهنده خواهد شد.

منابع

۱. **Cahu, C. and Zambonino-Infante, J., 2001**. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture. Vol. 200, pp: 161-180.

۲. **Carvalho, A.P.; Escaffre, A.M.; Oliva Teles, A. and Bergot, P., 1997**. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. Aquaculture International. Vol. 5, pp: 361-367.

۳. **Chong, A.S.C.; Hashim, R. and Ali, A.B., 2000.** Dietary protein requirements for discus (*Symphysodon* spp.). Journal Aquaculture Nutrition. Vol. 6, pp: 275-278.

۴. **Chong, A.S.C.; Hashim, R. and Ali, A.B., 2002.** Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods. Aquacult Nutr. Vol. 8, No. 3, pp: 229-238.

۵. **Coutinho, F.; Peres, H.; Guerreiro, I.; Pousão-Ferreira, P. and Oliva-Teles, A., 2012**. Aug. Dietary protein requirement of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles. Aquaculture. Vol. 1, pp: 356-397.

۶. **Ergun, S.; Yigit, M. and Turker, A., 2003.** Growth and feed consumption of young Rainbow throut (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to different photoperiods. Journal of Aquacuture. Vol. 55, No. 2, pp: 132-138.

۷. **Erdogan, F.; Erdogan, M. and Gümüş, E., 2012.** Effects of Dietary Protein and Lipid Levels on Growth Performances of Two African Cichlids (*Pseudotropheus socolofi*) and (*Haplochromis ahli*), Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 12, pp: 453-458.

۸. **Ergün, S.; Güroy, D.; Tekeşoğlu, H., Güroy, B. and Çelik, İ., 2010**. Optimum dietary protein level for blue streak hap. Labidochromis caeruleus. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Vol. 10, pp: 27-31.

۹. **Jauncey, K.,** The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). Aquaculture. Vol. 27, No. 1, pp: 43-54.

۱۰. **Kim, L.O. and Lee, S.M., 2005.** Jan. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, Pseudobagrus fulvidraco. Aquaculture. Vol. 3, No. 1, pp: 323-329.

۱۱. **Kolkovski, S.; Czensny, S. and Dabrowski, K., 2000.** Use of krill hydrolysate as a feed attractant for fish larvae and juveniles. Journal of World Aquaculture Society. Vol. 31, pp: 81-88.

۱۲. **Lee, S.M. and Kim, K.M., 2005**. Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal Aquaculture Nutrition. Vol. 11, pp: 435-442.

۱۳. **Lee, K.J.; Powell, M.S.; Barrows, F.T.; Smiley, S.; Bechtel, P. and Hardy, R.W., 2010.** Evaluation of supplemental fish bone meal made from Alaska seafood processing byproducts and dicalcium phosphate in plant protein based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquaculture. Vol. 302, pp: 248-255.

۱۴. **Lovell, R.T., 2000.** Nutrition of ornamental fish. En: Bonagura, J., (Ed.), Kirk's Current Veterinary Therapy XIII-Small Animal Practice. W.B. Saunders, Philadelphia, USA. pp: 1191-1196.

۱۵. **Mailliard, M.E.; Stevens, B.R. and Mann, G.E., 1995.** Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. Gastroenterology. Vol. 108, pp: 888-910.

۱۶. **Mohanta, K.N.; Mohanty, S.N.; Jena, J. and Sahu, N.P., 2009.** A dietary energy level of 14.6 MJ kg− 1 and protein-to-energy ratio of 20.2 g MJ− 1 results in best growth performance and nutrient accretion in silver barb Puntius gonionotus fingerlings. Aquaculture nutrition. Vol. 1, No. 6, pp: 627-37.

۱۷. **Niroomand, M.; Sajadi, M.; Yahyavi, M. and Asadi, M., 2011.** Effects of dietary betaine on growth, survival, body composition and resistance of fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under environmental stress. isfj. Vol. 20, No. 1, pp :135-146.

۱۸. **Ozório, R.O.A.; Valente, L.M.P.; Correia, S.; Pousao Ferreira, P.; Damasceno-Oliveira, A., Escorcio, C. and Oliva-Teles, A., 2009.** Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-banded seabream (*Diplodus vulgaris*) juveniles. Aquaculture Nutrition. Vol. 15, No. 1, pp: 85-93.

۱۹. **Pezzato, L.E.; Fracalossi, D.M.; de Borba, M.R. and Menoyo, D. 2003.** Bautista, J.M., Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein & lipid concentrations. Aquatic Living Resources. Vol. 16, No. 4, pp: 362-369.

۲۰. **Rodrigues, L.A., 2006.** Kochenborger FJB. Influência do processamento da dieta no desempenho produtivo do acará bandeira (*Pterophyllum scalare*). Maringá. Vol. 28, No. 1, pp: 113-119.

۲۱. **Sales, J. and Janssens, G.P.J., 2003.** Nutrient requirements of ornamental fish. Aquat Living Resour. Vol. 16, No. 6, pp: 533-540.

۲۲. **Sudagar, M.; Azari Takami, Gh.; Pnomarev, C.A.; Mahmoudzadeh, H.; Abedian, A. and Hosseini, S.A., 2005**. The effects ofdifferent dietary levels of betaine and Downloaded methionine as attractant on the growth factor and survival rate of juvenile beluga (Huso huso), Iranian Scientific Fisheries Journal. Vol. 14, No. 2, pp: 41-50 (In Persian).

۲۳. **Tacon, A.G.I., 1987**. The nutrition and feeding of farm fish and shrimp a training manual. The essential nutrients. FAO Brasilia Brazil. Vol. 1, 11 p.

۲۴. **Taheri, A.; Abedian Kenari, A.; Motamedzadegan, A. and Habibi Rezaie, A.M., 2010**. Optimization of gold stripe sardine (*Sardinella gibossa*) protein hydrolysate using alcalase® 2.4L by RSM. CytA Journal of Food. pp: 1-7.

۲۵. **Zuanon, J.A.S.; Salaro, A.L.; Silveira Moraes, S.S.; de Oliveira-Alves, L.M.; Balbino, E.M. and Siqueira Araújo, E., 2009.** Dietary protein and energy requirements of juvenile freshwater angelfish. Rev Bras Zootecn. Vol. 38, No. 6, pp: 989-993.

www.SID.ir