Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

Comparison of digestive enzymes activity of trypsin, chymotrypsin and amylase in four species of Cyprinidae (*Rutilus frisii kuttum*, *Rutilus rutilus caspicus*, *Capoeta capoeta*, and *Cyprinus carpio*)

Marzieh Abolfathi[1], Sajjad Pourmozaffar[*2], Saeid Tamadoni Jahromi[3], Reza Nahavandi[4], Soghra Mehravar[5]

1. Dept. of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran. E-mail: marziehabolfathi34@gmail.com
2. Corresponding Author, Persian Gulf Mollusks Research Station, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Lengeh, Iran. E-mail: sajjad5550@gmail.com
3. Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran. E-mail: stamadoni@gmail.com
4. Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail: rezanahavandi91@gmail.com
5. Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: s.mehravar.1985@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 07.02.2023
Revised: 08.04.2023
Accepted: 07.17.2023

Keywords:
Amylase,
Digestive somatic index,
Feeding habit,
Protease

ABSTRACT

The aim of this study was to compare digestive enzymes activity (alkaline proteases and amylase) in four species of Cyprinidae including one herbivorous species, the Caucasian scraper (*Capoeta capoeta*), and three omnivorous species, common carp (*Cyprinus carpio*), roach (*Rutilus rutilus*), and Caspian kutum, (*Rutilus frisii kutum*). All four species were fed with similar diet. The results showed that the enzyme profile was similar in four species and amylase enzyme activity was higher compared to protease enzymes (trypsin and chymotrypsin). However, there was a significant difference in the activity of these enzymes among the studied species. The highest trypsin and chymotrypsin activities were observed in roach, while common carp had the highest amylase enzyme and digestive somatic index. Therefore, the amylase activity was independent of feeding habit, while protease activity was relatively more dependent on feeding habit. The highest amylase / protease ratio was recorded in common carp which indicates the higher capacity of this species to utilize carbohydrates, therefore cost-effective feed can be used for its commercial production.

Cite this article: Abolfathi, Marzieh, Pourmozaffar, Sajjad, Tamadoni Jahromi, Saeid, Nahavandi, Reza, Mehravar, Soghra. 2024. Comparison of digestive enzymes activity of trypsin, chymotrypsin and amylase in four species of Cyprinidae (*Rutilus frisii kuttum*, *Rutilus rutilus caspicus*, *Capoeta capoeta*, and *Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (3), 59-74.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.21519.1796
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز در چهار گونه کپور ماهیان (سفید، کلمه، سیاه ماهی و کپور معمولی)

مرضیه ابوالفتحی[۱]، سجاد پورمظفر*[۲]، سعید تمدنی جهرمی[۳]، رضا نهاوندی[٤]، صغری مهرآور[٥]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران. رایانامه: marziehabolfathi34@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، ایستگاه تحقیقات نرم‌تنان خلیج‌فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران. رایانامه: sajjad5550@gmail.com
۳. پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران. رایانامه: stamadoni@gmail.com
٤. مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: rezanahavandi91@gmail.com
٥. گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: s.mehravar.1985@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۰٤/۱۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۲/۰٥/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۰٤/۲٦

واژه‌های کلیدی:
آمیلاز،
پروتئاز،
شاخص گاستروسوماتیک،
عادت غذایی

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، مطالعه مقایسه‌ای فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و آمیلاز دستگاه گوارش چهار گونه از خانواده کپورماهیان (یک گونه گیاهخوار: سیاه‌ماهی- سه گونه همه‌چیزخوار: کپور معمولی، کلمه و ماهی سفید) تغذیه‌شده با یک جیره غذایی واحد بود. نتایج نشان داد که پروفیل آنزیمی در هر چهار گونه مورد مطالعه یکسان و علی‌رغم استفاده از یک جیره غذایی با پروتئین نسبتاً بالا (۳۸-٤۱ درصد)، میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در مقایسه با آنزیم‌های پروتئازی تریپسین و کیموتریپسین بالاتر بود. هر چند اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم‌ها در بین گونه‌های مختلف مشاهده شد، به‌طوری‌که بالاترین میزان فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین مربوط به ماهی کلمه بود، در حالی‌که بالاترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و شاخص سوماتیک دستگاه گوارش در ماهی کپور معمولی اندازه‌گیری شد. بنابراین، فعالیت آمیلاز در مطالعه حاضر مستقل از عادت غذایی ماهی بود، در حالی‌که فعالیت آنزیم پروتئازی تریپسین تا حدودی وابسته به عادت غذایی ماهی بود. هم‌چنین بالاترین شاخص نسبت آمیلاز به پروتئاز مربوط به ماهی کپور معمولی بود که نشان‌دهنده توانایی بالاتر این گونه برای استفاده از کربوهیدرات‌ها و امکان استفاده از جیره‌های غذایی با مواد مغذی ارزان‌تر جهت پرورش و تولید اقتصادی این گونه می‌باشد.

استناد: ابوالفتحی، مرضیه، پورمظفر، سجاد، تمدنی جهرمی، سعید، نهاوندی، رضا، مهرآور، صغری (۱۴۰۳). مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز در چهار گونه کپور ماهیان (سفید، کلمه، سیاه ماهی و کپور معمولی). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۳)، ۷۴-۵۹.
DOI: 10.22069/japu.2023.21519.1796

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

درحال حاضر چالش عمده آبزی‌پروری تجاری به‌خصوص در مورد معرفی گونه‌های جدید، فرمولاسیون جیره غذایی متناسب با نیازهای تغذیه‌ای ماهی در جهت بهینه‌سازی رشد و ارتقاء سلامت آبزیان می‌باشد. رشد و راندمان تغذیه در ماهی به ظرفیت بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آن‌ها برای گوارش و جذب مواد غذایی خورده شده بستگی دارد. بنابراین گوارش، فرآیند کلیدی در متابولیسم موجودات می‌باشد و بازدهی خالص تمام فرآیندهای گوارشی به میزان زیادی متکی به نوع و عملکرد آنزیم‌های گوارشی می‌باشد (۱).

ماهی‌ها بر اساس رژیم غذایی غالب خود به چهار گروه پوده خوار، گیاه‌خوار، گوشت‌خوار و همه‌چیزخوار طبقه‌بندی می‌شوند. (۲). هر چند آن‌ها با تغییر متابولیسم و رفتار خود، تا حدودی قادر به تغییر رژیم غذایی در پاسخ به نوع ماده غذایی در دسترس می‌باشند (۳). این به ماهی اجازه می‌دهد تا طیف وسیعی از منابع غذایی را کشف و از منابع غذایی موجود در محیط زیست حداکثر استفاده را ببرد (٤). به عنوان مثال، ماهی‌ها می‌توانند رژیم غذایی خود را از پلانکتون‌خواری در تابستان به ماهی‌خواری در زمستان تغییر دهند (۵). اغلب مطالعات در مورد عادات غذایی ماهیان بر اساس مشاهده محتویات معده است که نمی‌تواند بین استراتژی‌های عام و فرصت‌طلب تمایزی قایل شود (٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ١٤).

آنالیز فعالیت آنزیم‌های گوارشی یک روش ساده و مطمئن است که می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای فرآیند گوارش و شرایط تغذیه‌ای ماهی استفاده شود (۱۵). در همه گونه‌های آبزی، از جمله ماهی‌ها، پروفیل و فعالیت آنزیم‌های گوارشی نشان‌دهنده اکولوژی تغذیه و جایگاه[1] تغذیه‌ای آن‌ها در شرایط طبیعی و تا حدود زیادی مرتبط با رژیم غذایی آن‌ها است (١٦).

مطالعه آنزیم‌های گوارشی به‌طور گسترده‌ای در فرمولاسیون جیره غذایی ماهیان و جلوگیری از اتلاف انرژی و در نتیجه کاهش هزینه‌های تولید استفاده می‌شود (۱۷). به‌عنوان مثال، حتی در گونه‌های با پتانسیل تولیدی بالا از جمله تیلاپیا، استفاده بیش از حد پروتئین در جیره غذایی می‌تواند منجر به هزینه‌های اضافی انرژی، افزایش دفع نیتروژن و حتی کاهش رشد ماهی شود (۱۸ و ۱۹). بنابراین مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه‌های مختلف می‌تواند برخی از جنبه‌های فیزیولوژی تغذیه آن‌ها را روشن سازد و با درک بهتر نیازهای تغذیه‌ای هر گونه و پیش‌بینی ظرفیت استفاده از مواد مغذی مختلف به حل مشکلات تغذیه‌ای از جمله بهینه‌سازی درصد نسبی ماکرومغذی‌های جیره (پروتئین، کربوهیدارت و لیپید) و متناسب بودن جیره غذای مصنوعی با ظرفیت تغذیه‌ای ماهی به‌خصوص در مورد گونه‌های پرورشی جدید کمک کند (۲۰). مطالعات متعددی در مورد مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه‌های مختلف ماهی انجام شده است. به‌طورکلی گونه‌های گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار توانایی بالایی برای گوارش کربوهیدرات‌ها دارند. به‌طوری‌که فعالیت آمیلاز در سرتاسر سیستم گوارشی آن‌ها مشاهده می‌شود (۳، ۲۱، ۲۲ و ۲۳). در حالی‌که ماهی‌های گوشت‌خوار فعالیت پروتئازی بالاتری دارند. هر چند، آنزیم‌های پروتئازی نه تنها در ماهی‌های گوشت‌خواران بلکه در ماهیان گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار، مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی محسوب می‌شوند و اغلب گزارش شده است که توانایی ماهی‌ها برای هضم پروتئین مستقل از عادت غذایی آن‌ها می‌باشد (۵، ٢٤ و ۲۵). بنابراین،

1- Niche

مطالعات مقایسه‌ای فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند توانایی گونه‌های مختلف را برای استفاده از پروتئین و کربوهیدرات جیره پیش‌بینی نماید و برخی از مشکلات مربوط به فرموله کردن جیره غذایی متناسب با نیازهای تغذیه‌ای و متابولیسم ماهی را حل کند (۲۶).

اغلب ماهی‌ها دارای چهار گروه آنزیم گوارشی اصلی شامل آنزیم‌های پروتئولیتیک (تریپسین و کربوکسی پپتیدازها)، آنزیم‌های کربوهیدراتاز (مالتاز، آمیلاز)، آنزیم‌های لیپولیتیک (لیپاز) و فسفاتازها (آلکالین فسفاتاز) می‌باشند. مهم‌ترین آنزیم‌های گوارشی پروتئولیتیکی نیز پروتئازهای اسیدی از جمله پپسین ترشح شده توسط مخاط معده و پروتئازهای سرین شامل تریپسین و کیموتریپسین ترشح شده توسط پانکراس می‌باشند (۲۷). خانواده کپورماهیان از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی گرمآبی در ایران محسوب می‌شوند. تکثیر این گونه‌ها به آسانی و با هزینه کم در مراکز تکثیر انجام و در بیش‌تر نقاط کشور به صورت کشت توأم پرورش (کپور معمولی و آمور) و یا جهت بازسازی ذخایر ژنتیکی به حوزه‌های آبی دریای خزر رهاسازی می‌گردند (ماهی کلمه و سفید) (۲۸). با توجه به این‌که کپورماهیان فاقد معده حقیقی و آنزیم‌های پروتئازی آسپارتیک (پپسین یا کاتپسین) هستند، گوارش پروتئین‌ها در آن‌ها متکی به پروتئازهای سرین شامل تریپسین و کیموتریپسین مترشحه از پانکراس می‌باشد که در محیط قلیایی روده فعال می‌شوند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، سنجش فعالیت آنزیم‌های پروتئازی سرین و آمیلاز دستگاه گوارش چهار گونه از خانواده کپور ماهیان (یک گونه گیاه‌خوار: سیاه‌ماهی *Capoeta capoeta* – سه گونه همه‌چیزخوار: کپور معمولی *Cyprinus carpio*، ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* و ماهی کلمه *Rutilus rutilus*) تغذیه شده با یک جیره غذایی واحد و بررسی ارتباط بین عادت غذایی و آنزیم‌های گوارش گونه‌های مورد مطالعه بود

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی: سه گونه کپور معمولی، کلمه و سفید به ترتیب با میانگین وزن ۲/۲۹ ± ۱۴/۷، ۱/۸۴± ۵/۵۵ و ۲/۷۲ ± ۱۶/۱۳ گرم از مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان استخوانی گلستان و گونه سیاه‌ماهی با میانگین وزن ۰/۳۱ ± ۶/۳ گرم از پارک ملی گلستان تهیه و به سالن تکثیر و پرورش شهید فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ابتدا ماهیان جهت انگل‌زدایی با آب نمک ۲ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت جهت کاهش تلفات احتمالی و استرس، غذادهی نشدند. پس از طی دوره سازگاری، هر چهار گونه به‌مدت یک ماه با یک جیره واحد (خوراک اکسترود شرکت فرادانه، شهرکرد- ایران) تغذیه شدند (۲۹). درصد غذادهی مطابق با دستورالعمل شرکت فرادانه و بر اساس میانگین وزن ماهی و دمای آب بود. تراکم نگهداری ماهی ۵ گرم به‌ازای هر لیتر آب بود. تعویض آب به‌صورت یک روز در میان با استفاده از آب شهری کلرزدایی شده انجام شد. پارامترهای کیفی آب شامل دما (۰/۷۶ ± ۲۶/۱)، اکسیژن محلول (۰/۳۳ ± ۶/۸۱) و pH (۰/۱۸ ± ۷/۴) به‌صورت روزانه و با استفاده از دستگاه مولتی‌پارامتر پرتابل (مدل HQ10D- کمپانی HACH- کشور سازنده آمریکا) اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- آنالیز تقریبی خوراک اکسترود کپور ماهیان- شرکت فرادانه.

ترکیب شیمیایی (درصد)	SFC
پروتئین خام	۴۱-۳۸
چربی خام	۴/۸
فیبر خام	۶-۳
خاکستر	۱۱-۷
رطوبت	۱۱-۵
فسفر	۱/۵-۱
فرم خوراک	فرورونده
اندازه خوراک (میلی‌متر)	۲-۰/۲
وزن ماهی (گرم)	۲۰-۱

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: غذادهی ماهیان یک روز قبل از انجام نمونه‌برداری قطع شد. از هر گونه، ۱۰ ماهی به‌طور تصادفی صید و دستگاه گوارش آن‌ها به‌طور کامل (از مری تا مخرج) خارج شد. در صورت وجود غذا در روده، آن‌ها را به‌آرامی خارج کرده و پس از شستشو با آب مقطر سرد نمونه‌ها وزن شدند (ترازو با دقت ۰/۰۰۱، مدل Sartorius BP310P). سپس تا حجم ۵ برابر (وزنی- حجمی) با کلرید سدیم ۰/۲ مولار رقیق و با استفاده از هموژنایزر (مدل IKA T25 Digital, ULTRA TURRAX) عمل یکنواخت‌سازی انجام شد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ (مدل 5810R Eppendrof centrifuge) شد. پس از سانتریفوژ، سوپرناتانت حاصل را به‌آرامی با سمپلر جمع‌آوری کرده و بسته به میزان لازم برای هر آنزیم، در میکروتیوپ‌هایی به حجم ۱/۵ سی‌سی تقسیم‌بندی شد. تمام مراحل فوق در مجاورت یخ و دمای پایین انجام شد. نمونه‌ها تا زمان سنجش آنزیمی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۳۰).

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: قبل از ارزیابی فعالیت آنزیمی، غلظت پروتئین نمونه‌های روده به‌منظور محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم مطابق با روش لوری و همکاران (۳۱) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم تریپسین مطابق با روش ارلانگر و همکاران (۳۲) با استفاده از بنزویل- DL- آرژنین- پارانیتروآنیلید- هیدروکلراید[1] به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. ۲/۱۴۰ میلی‌لیتر محلول سوبسترا با ۴۵ میکرولیتر نمونه رقیق شده با اسیدکلریدریک ۰/۰۰۱ مولار مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۳۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد به‌منظور متوقف کردن واکنش آنزیمی به لوله‌ها اضافه و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین با استفاده از سوبسترای N- بنزویل- L- تیروزین- اتیل استر[2] مطابق با روش هامل و همکاران (۳۳) انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده با اسیدکلریدریک به ۱/۴ میلی‌لیتر محلول سوبسترای اضافه و پس از مخلوط

1- BAPNA
2- BTEE

کردن محتویات کووت، جذب نوری نمونه‌ها در فواصل ۳۰ ثانیه به‌مدت ۵ دقیقه در طول موج ۲۵٦ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. ۲۵۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده با آب مقطر سرد به لوله آزمایشی حاوی ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته ۱ درصد اضافه گردید. پس از ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف رنگی دی نیتروسالسیلیک اسید به لوله‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. سپس ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه و محتویات لوله به‌خوبی مخلوط و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ٥٤٠ نانومتر اندازه گیری و میزان فعالیت آنزیم با استفاده از منحنی استاندارد مالتوز محاسبه شد (۳٤).

تمام سنجش‌های آنزیمی در ٦ تکرار و به روش رنگ‌سنجی با استفاده از اسپکتروفتومتر (Biochrom Libra S12 UV-Vis Spectrophotomete) اندازه‌گیری شد. فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها بر اساس واحد بین‌المللی $U/mg\ protein.min^{-1}$ بیان شد که عبارت است از میکرومول محصولی که در هر دقیقه توسط آنزیم، به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین محلول حاوی عصاره آنزیمی تولید می‌شود.

شاخص سوماتیک دستگاه گوارش[1]: به‌منظور محاسبه شاخص سوماتیک دستگاه گوارش، ٦ نمونه از هر گونه انتخاب و پس از بی‌هوشی در عصاره گل میخک، طول و وزن ماهیان ثبت شد. سپس بلافاصله بعد از خالی کردن روده ماهیان، دستگاه گوارش (از مری تا مخرج) به دقت جدا و توزین گردید و شاخص دستگاه گوارش (DSI) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۲۳):

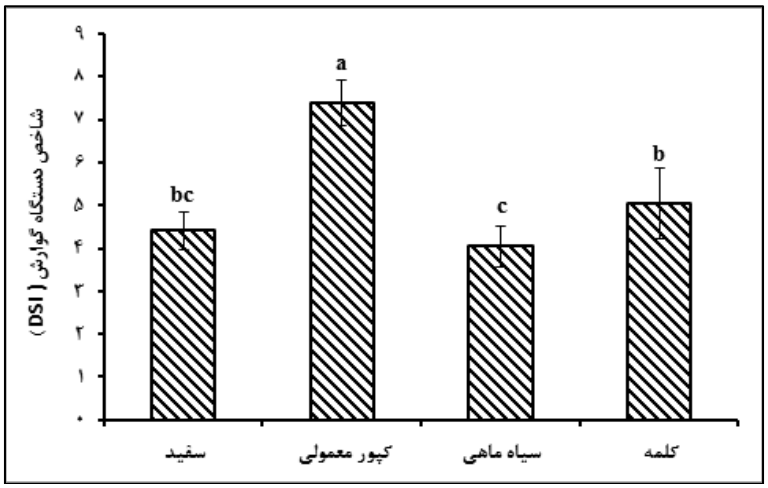
شاخص سوماتیک دستگاه گوارش (DSI) = وزن دستگاه گوارش (گرم) / وزن کل ماهی (گرم) × ۱۰۰

روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها: قبل از انجام آزمون‌های آماری، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک بررسی گردید. پس از حصول اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، مقایسه فعالیت آنزیم‌های گوارشی چهار گونه از کپور ماهیان به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان α=۰/۰۵ انجام شد. تمام آنالیزها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS، نسخه ۲۲ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 انجام و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± Standard deviation) بیان شد.

نتایج

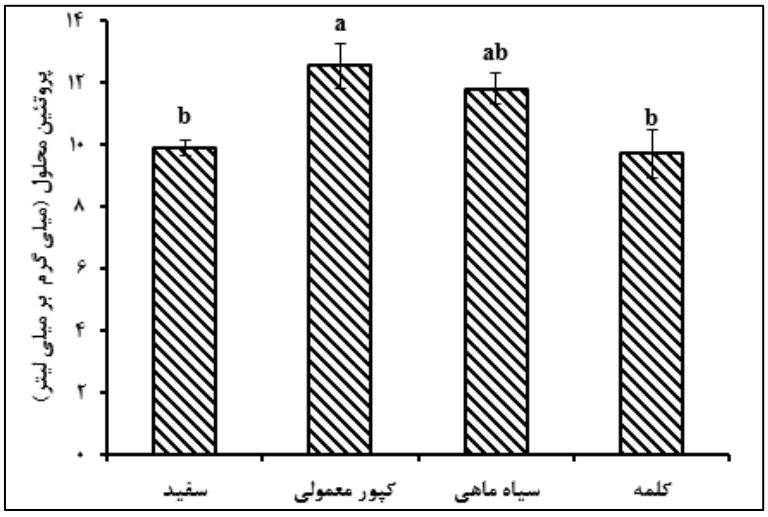
همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده می شود، میزان شاخص سوماتیک دستگاه گوارش در کپور معمولی به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گونه‌های کپور مورد مطالعه بود (P<۰/۰۵)، درحالی‌که، پایین‌ترین میزان شاخص مربوط به سیاه‌ماهی بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین بالاترین میزان غلظت پروتئین محلول روده به‌طور مشترک مربوط به دو گونه کپور معمولی و سیاه‌ماهی بود (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری بین غلظت پروتئین محلول روده ماهی سفید و کلمه مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۲).

1- Digestive Somtic Index (DSI)



شکل ۱- شاخص سوماتیک دستگاه گوارش چهار گونه کپور مورد مطالعه.

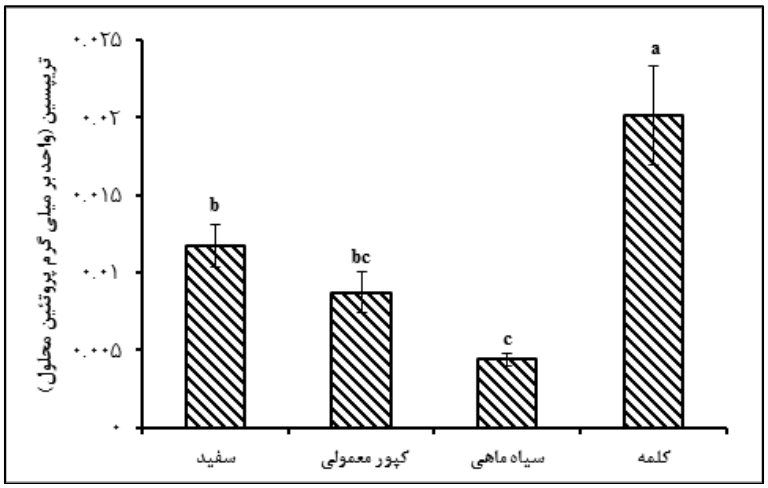
مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (n=٦). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>٠/٠٥).



شکل ۲- پروتئین محلول دستگاه گوارش چهار گونه کپور مورد مطالعه.

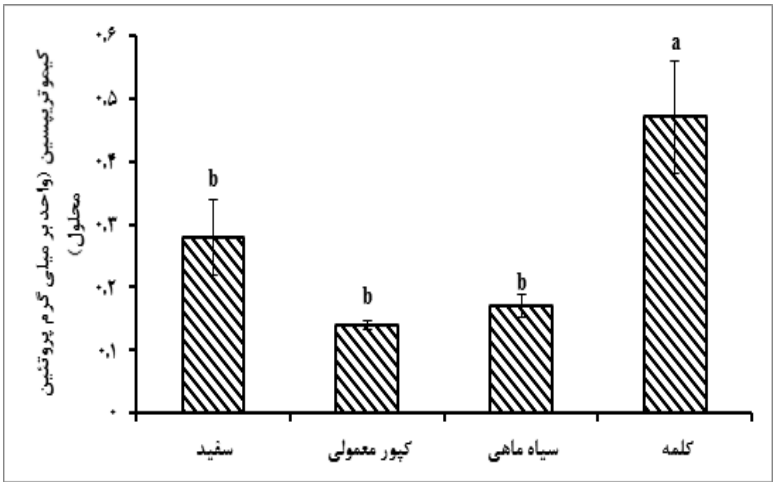
مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (n=٦). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>٠/٠٥).

نتایج سنجش آنزیم‌های پروتئازی نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم تریپسین در هر چهار گونه مورد مطالعه بسیار پایین بود و بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت به ترتیب مربوط به ماهی کلمه و سیاه‌ماهی بود (P<٠/٠٥)، درحالی‌که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم بین دو گونه کپور معمولی و ماهی سفید مشاهده نشد (P>٠/٠٥) (شکل ۳). مقایسه فعالیت آنزیم کیموتریپسین نیز نشان داد که فعالیت این آنزیم در ماهی کلمه به‌طور معنی‌داری بالاتر از سه گونه کپور مورد مطالعه بود (P<٠/٠٥) (شکل ٤).



شکل ۳- فعالیت ویژه آنزیم تریپسین چهار گونه کپور مورد مطالعه.

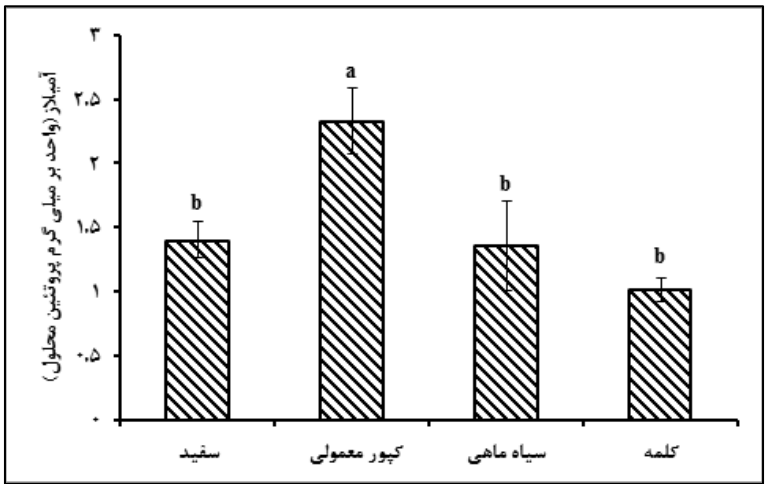
مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (n=٦). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).



شکل ٤- فعالیت ویژه آنزیم کیموتریپسین چهار گونه کپور مورد مطالعه.

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (n=٦). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).

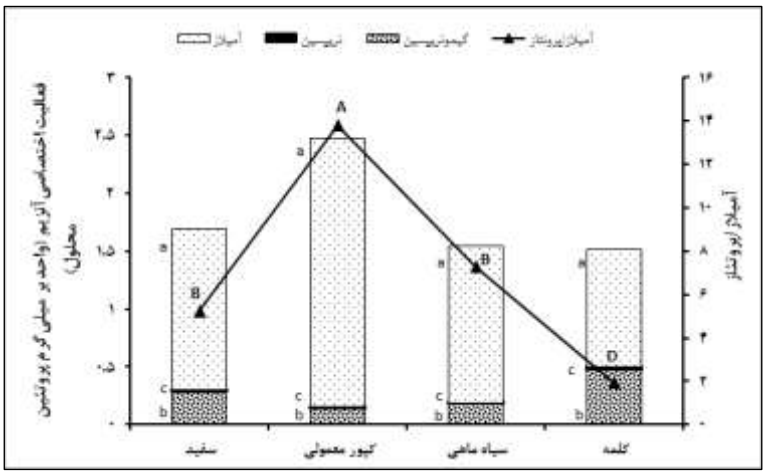
بالاترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز مربوط به ماهی کپور معمولی بود (P<۰/۰۵)، در حالی‌که اختلاف معنی‌داری در فعالیت این آنزیم در میان سایر گونه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۵).



شکل ۵- فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز چهار گونه کپور مورد مطالعه.

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (n=٦). حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).

آنالیز مقایسه‌ای فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئازی مورد مطالعه نیز نشان داد میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در هر چهار گونه مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری بالاتر از میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئازی بود (P<۰/۰۵). مقایسه بین دو آنزیم پروتئازی نیز نشان داد میزان فعالیت آنزیم تریپسین به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از آنزیم کیموتریپسن بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین بالاترین نسبت آنزیم آمیلاز به پروتئاز مربوط به ماهی کپور معمولی بود، درحالی‌که پایین‌ترین نسبت آنزیم آمیلاز به پروتئاز در ماهی کلمه مشاهده شد (P<۰/۰۵).



شکل ٦- مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در چهار گونه کپور مورد مطالعه.

بحث

فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهی با توجه به ترکیب جیره یا عادات غذایی تغییر و می‌تواند به‌عنوان شاخص مؤثری از اکولوژی تغذیه‌ای ماهی در نظر گرفته شود (۳، ۲۱، ۲۲، ۳۵، ۳۶، ۳۷ و ۳۸). روابط تبارزایی[1] نقش مهمی در فعالیت آنزیم‌های گوارشی جوندگان (۳۹) و پرندگان (۴۰ و ۴۱) دارد، اما در ماهی‌ها، اغلب جیره به‌عنوان مهم ترین فاکتور مؤثر بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در نظر گرفته می‌شود (۲۱). هر چند، در گونه‌هایی که رژیم غذایی آن‌ها با رشد تغییر می‌کند، فعالیت آنزیم‌های گوارشی احتمالاً بیش‌تر تحت‌تأثیر روابط تبارزایی می باشد (۳۵ و ۴۲). در مطالعه حاضر، پروفیل فعالیت آنزیمی در هر چهار گونه کپور تغذیه شده با یک جیره واحد یکسان و میزان فعالیت آنزیم آمیلاز به‌طور معنی‌داری بالاتر از آنزیم‌های پروتئازی ترپیسین و کیموترپیسین بود. هم‌چنین مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم‌های پروتئاز (ترپیسین وکیموترپیسن) و آمیلاز به‌ترتیب مربوط به ماهی کلمه و کپور معمولی بود که نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم آمیلاز مستقل از عادت غذایی ماهی بود.

آنزیم آلفا- آمیلاز از از گروه آنزیم‌های کربوهیدرازی است که پیوندهای آلفا (۱←۴) نشاسته و گلیگوژن را تجزیه و در مراحل ابتدایی هضم و جذب کربوهیدارت‌ها نقش دارد. در ماهیان گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار پانکراس منبع اصلی تولید آلفا- آمیلاز است. هر چند مخاط روده و ضمائم آن نیز می‌توانند در تولید آن مؤثر باشند. ولی در ماهیان گوشتخوار تنها منبع تولید آلفا- آمیلاز پانکراس می‌باشد (۴۳). به‌طور کلی، فعالیت آنزیم آمیلاز با عادات غذایی ماهی در ارتباط می‌باشد (۲۰) و فرض بر این است که ماهیان گیاه‌خوار یا همه‌چیزخوار فاقد معده و ماهیانی که کربوهیدرات بیش‌تری را در یکی از مراحل تکاملی شان مصرف می‌کنند، فعالیت آمیلاز بالاتری در مقایسه با ماهیان گوشتخوار و در نتیجه توانایی بالاتری برای گوارش کربوهیدارت‌ها دارند (۲۰، ۴۲، ۴۴ و ۴۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در ماهی همه‌چیزخوار کپور معمولی مشاهده شد، درحالی‌که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در بین سایر گونه‌های همه‌چیزخوار (سفید و کلمه) و سیاه‌ماهی وجود نداشت. هر چند با توجه عادات غذایی، انتظار می‌رفت میزان فعالیت این آنزیم در سیاه‌ماهی به‌عنوان یک گونه گیاه‌خوار بالاتر باشد. بنابراین می‌توان گفت که فعالیت آنزیم آمیلاز در مطالعه حاضر تا حدودی مستقل از عادت غذایی ماهی بود و عوامل دیگری مانند ظرفیت گوارش هر گونه در ارتباط با شرایط فیزیولوژیک و هم‌چنین ژنتیک گونه می‌توانند در میزان فعالیت آنزیم آمیلاز نقش داشته باشند. بر خلاف مطالعه حاضر، روزا گیودا و همکاران (۴۶) در مطالعه تأثیر عادت غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی چهار گونه ماهی آب شیرین گزارش کردند که ماهی گیاه‌خوار آمور بالاترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و مالتاز را در مقایسه با گونه‌های گیاه‌خوار و گوشتخوار مورد مطالعه داشت. هر چند در تأیید مطالعه حاضر، ارتباط‌های غیرمنتظره و متناقضی بین فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و عادت غذایی یا رژیم غذایی ماهی نیز توسط پژوهش‌گران متعددی گزارش شده است. حتی در برخی موارد، میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در گونه‌های همه‌چیزخوار یا گیاه‌خوار پایین‌تر از گونه‌های گوشتخوار بود (۲۴، ۲۶ و ۳۵). به‌عنوان مثال، مطالعه آنزیم‌های گوارشی در ۱۱ گونه ماهی استخوانی آب شیرین و ۸ گونه ماهی استخوانی آمازون نشان داد که هیچ ارتباطی بین میزان فعالیت آمیلاز و عادت غذایی ماهیان مورد مطالعه وجود

1- Phylogenetic

نداشت (۵ و ۲۵). چان و همکاران (۳۵) نیز در مطالعه تأثیر روابط تبارزایی و عادت غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی دو گونه گوشتخوار *Xiphister atropurpureus* و *Anoplarchus purpurescens* و دو گونه گیاه‌خوار *Cebidichthys violaceus* و *Xiphister mucosus* از خانواده ماهیان خاردار دریافتند که فعالیت آنزیم آمیلاز در دو گونه *X. atropurpureus* و *X. mucosus* علی‌رغم عادت غذایی متفاوت مشابه و بالاتر از سایر گونه‌های مورد مطالعه بود. تفاوت مشاهده شده بین دو گونه گوشتخوار و شباهت بین دو تاکسای خواهر (*Xiphister*) نشان می‌دهد که فعالیت آمیلاز در ماهیان این خانواده از الگویی پیروی می‌کند که بیش‌تر تحت‌تأثیر روابط تبارزایی است تا عادت غذایی.

نتایج آنالیز مقایسه‌ای فعالیت آنزیم‌های گوارشی نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در هر چهار گونه گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار مورد مطالعه علی‌رغم مضرف جیره غذایی حاوی پروتئین نسبتاً بالا (۴۱-۳۸ درصد) بالاتر از آنزیم‌های پروتئازی تریپسین و کیموتریپسین بود. در تأیید مطالعه حاضر، جرمن و همکاران (۱۶) نیز نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در گونه‌های گیاهخوار Xiphisterine، علی‌رغم مصرف جیره حاوی پروتئین بالا و نشاسته کم، هم‌چنان بالا بود. روزا گیودا و همکاران (۴۶) نیز گزارش کردند که میزان فعالیت آنزیم مالتاز در ماهیان همه‌چیزخوار *Rhamdia quelen* و *Leporinus obtusidens* بالاتر از آنزیم پروتئازی تریپسین بود.

آنزیم‌های پروتئازی به‌عنوان یکی از شاخص‌های شرایط تغذیه‌ای، میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی در ماهیان محسوب می‌شوند (۴۷). به‌طورکلی، گونه‌های گوشت‌خوار نیاز پروتئینی بیش‌تری در مقایسه با گونه های گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار دارند، بنابراین میزان فعالیت پروتئاز در آن‌ها بالاتر از گونه‌های گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار می باشد (۱۶، ۴۶ و ۴۸). در مطالعه حاضر نیز با توجه به یکسان بودن جیره غذایی و محتوی نسبتاً بالای پروتئین آن (۴۱-۳۸ درصد) و هم‌چنین میزان فعالیت پایین آنزیم تریپسین در سیاه‌ماهی به‌عنوان یک گونه گیاه‌خوار در مقایسه با گونه‌های همه‌چیزخوار مورد مطالعه می‌توان گفت فعالیت این آنزیم تا حد زیادی وابسته به عادت غذایی ماهی بود. درحالی‌که پژوهش‌گران معتقدند فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در مقایسه با کربوهیدرازها وابستگی کم‌تری به عادات غذایی ماهی دارد. به‌عنوان مثال، چان و همکاران (۳۵) در مطالعه چهار گونه از خانواده ماهیان خاردار شامل گونه‌های گوشتخوار *X. atropurpureus* و *A. purpurescens* و دو گونه گیاه‌خوار *C. violaceus* و *X. mucosus* نشان دادند که فعالیت ویژه آنزیم‌های پروتئازی شامل پپسین و تریپسین مستقل از عادت غذایی و در هر چهار گونه مورد مطالعه یکسان بود. سانتوس و همکاران (۵۱) نیز دریافتند که فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در تیلاپیای قرمز (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis mossambicus*) تحت‌تأثیر پروتئین جیره می‌باشد. هر چند ظرفیت تولید پروتئازها محدود می‌باشد و مقادیر پروتئین بیش از حد در جیره ممکن است منجر به کاهش فعالیت پروتئازها شود (۱۸ و ۱۹). چادهوری و همکاران (۴۲) نیز نشان دادند که هر ۱۰ گونه ماهی گوشتخوار مورد مطالعه، پاسخ خاص گونه‌ای را در فعالیت پروتئازی در پاسخ به رژیم غذایی نشان دادند.

نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پروتئازی تریپسین در هر چهار گونه کپور مورد مطالعه در مقایسه با کیموتریپسن پایین‌تر بود که می‌تواند به‌دلیل میل ترکیبی بالای این آنزیم در کپورماهیان در مقایسه با ماهیان دارای معده باشد و

قابلیت هضم پروتئین‌ها را به عنوان یک سازگاری با میزان پایین پروتئین جیره افزایش دهد (۵۰). با این‌حال، میزان فعالیت آنزیم تریپسین در ماهی کلمه بالاتر از دو گونه همه‌چیزخوار دیگر (سفید و کپور معمولی) بود. در حالی‌که سرعت رشد این ماهی در مقایسه با گونه‌های دیگر پایین می‌باشد و به‌عنوان یک ماهی با رشد بطئی تلقی می‌شود. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت بالای پروتئازها همیشه در ارتباط با رشد بالاتر ماهی نیست. هر چند، افزایش پروتئازها منجر به گوارش مؤثرتر پروتئین‌ها می‌شود، ولی پس از رسیدن به متابولیسم حد واسط، آمینواسیدهای جذب شده دآمینه می‌شوند و نمی‌تواند توسط ماهی برای تولید پروتئین‌های ساختاری استفاده شوند (٤٩). بنابراین فعالیت بالای پروتئاز در ماهی کلمه در مقایسه با دو گونه همه‌چیزخوار دیگر به‌عنوان یک استراتژی گوارشی برای سازگاری این ماهی در جهت حداکثر استفاده از منابع پروتئینی پایین موجود در رژیم غذایی طبیعی آن محسوب می‌شود. چون میزان فعالیت پروتئولیتیکی برای گوارش پروتئین مصرفی با منشأ گیاهی ۱۰ برابر بیش‌تر از همان مقدار پروتئین با منشأ حیوانی در ماهیان گوشتخوار می‌باشد (٤٢).

هر چند اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه در بین گونه‌های مختلف کپور مشاهده شد، اما پروفیل فعالیت آنزیمی آن‌ها یکسان بود. به‌عبارت دیگر نسبت فعالیت آمیلاز به پروتئاز در هر چهار گونه مورد مطالعه بالا و بیش‌ترین میزان این شاخص مربوط به ماهی کپور معمولی بود. با توجه به این‌که میزان ترشح آنزیم‌های گوارشی در پاسخ به یک ماده مغذی در ارتباط مستقیم با قابلیت گوارش آن ماده مغذی است، بنابراین نسبت آمیلاز به پروتئاز بالاتر در ماهی کپور معمولی نشان‌دهنده ظرفیت بالاتر این این گونه برای هضم کربوهیدرات‌ها در مقایسه با پروتئین‌ها می‌باشد. مطالعات متعددی نیز گزارش کرده‌اند که نسبت آمیلاز به پروتئاز در گونه‌های گیاهخوار و همه‌چیزخوار بالاتر از گونه‌های گوشتخوار می‌باشد (۲۵ و ۲٦).

علاوه بر آنزیم‌های گوارشی، یکی دیگر از فاکتورهای مهم در پرورش آبزیان به‌خصوص گونه‌های جدید اندازه‌گیری شاخص‌های مورفولوژیکی دستگاه گوارش مانند شاخص سوماتیک دستگاه گوارش و طول نسبی روده می باشد (۲۹). شاخص طول نسبی روده به‌عنوان یک متغیر مورفولوژیکی اصلی برای طبقه‌بندی ماهی بر اساس عادت غذایی به‌عنوان گونه‌های گوشت‌خوار، گیاه‌خوار و همه‌چیزخوار محسوب می شود، در حالی‌که از شاخص سوماتیک دستگاه گوارش برای برآورد میزان تغذیه و عملکرد رشد ماهی استفاده می‌شود (۵۲ و ۵۳). در واقع وزن دستگاه گوارش از طریق توانایی جذب با سرعت رشد مرتبط است. شاخص سوماتیک دستگاه گوارش در ارتباط با رژیم غذایی با کیفیت پایین افزایش می‌یابد (۲۹). در مطالعه حاضر، بالاترین میزان شاخص سوماتیک دستگاه گوارش در ماهی کپور معمولی مشاهده که نشان‌دهنده بالاتر بودن میزان جذب مواد مغذی و استفاده بهینه از جیره آزمایشی بود.

مقایسه نتایج مطالعات مختلف در ارتباط با فعالیت آنزیم‌های گوارشی حتی در مورد گونه‌های مشابه دشوار می‌باشد، چون علاوه‌بر اختلاف گونه‌ای، شرایط فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و محیطی، تفاوت در روش سنجش آنزیم‌ها از جمله سوبسترای متفاوت (خراش دادن مخاط دستگاه گوارش یا همگن کردن کل دستگاه گوارش)، دمای ارزیابی، دستورالعمل مورد استفاده برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌ها و واحد فعالیت گزارش شده متفاوت می‌باشد (١٦، ۳۹ و ۵۱). بنابراین نتایج حاصل از مطالعه حاضر ممکن

است به‌طور مستقیم با مطالعات مقایسه‌ای آنزیم‌های گوارشی گونه‌های مشابه توسط پژوهش‌گران دیگر قابل مقایسه نباشد. اما ممکن است برخی ملاحظات مفید برای بهینه‌سازی پروتکل‌های تغذیه‌ای از کل مجموعه داده‌های به‌دست آمده در پژوهش استنباط شود.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان شاخص سوماتیک دستگاه گوارش در کپور معمولی به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر گونه‌های کپور مورد مطالعه (کلمه، سفید و سیاه‌ماهی) بود که نشان‌دهنده بالاتر بودن میزان جذب مواد مغذی و استفاده بهینه از جیره آزمایشی در این گونه می‌باشد. نتایج سنجش آنزیم‌های پروتئازی نیز نشان داد که بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم‌های ترپیسین به ترتیب مربوط به ماهی کلمه و سیاه‌ماهی بود. بالاترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در ماهی کپور معمولی اندازه‌گیری شد، در حالی‌که با توجه عادات غذایی، انتظار می‌رفت میزان فعالیت این آنزیم در سیاه‌ماهی به‌عنوان یک گونه گیاه‌خوار بالاتر باشد. بنابراین فعالیت آمیلاز در مطالعه حاضر مستقل از عادت غذایی ماهی بود، در حالی‌که فعالیت آنزیم پروتئازی ترپیسین با توجه به یکسان بودن جیره غذایی و محتوی نسبتاً بالای پروتئین آن (۴۱-۳۸ درصد) و هم‌چنین میزان فعالیت پایین آن در سیاه‌ماهی تا حدودی وابسته به عادت غذایی ماهی بود. هم‌چنین بالاترین نسبت آنزیم آمیلاز به پروتئاز مربوط به ماهی کپور معمولی بود که نشان‌دهنده ظرفیت بالاتر این گونه برای هضم کربوهیدرات‌ها در مقایسه با پروتئین‌ها می‌باشد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر می‌تواند به بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده از طریق استفاده از منابع غذایی ارزان‌تر با قابلیت هضم و جذب بالاتر مطابق با ظرفیت گوارشی گونه پرورشی موردنظر کمک و منجر به افزایش راندمان و تولید اقتصادی صنعت پرورش کپورماهیان شود.

منابع

1. Furne, M., Hidalgo, M. C., Lopez, A., Garcia-Gallego, M., Morales, A. E., Domezain, A., Domezainé, J., & Sanz, A. (2005). Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 250 (1-2), 391-398.
2. Rust, M. B. (2003). Nutritional physiology. In *Fish nutrition* (pp. 367-452). Academic Press.
3. Pérez-Jiménez, A., Cardenete, G., Morales, A. E., García-Alcázar, A., Abellan, E., & Hidalgo, M. C. (2009). Digestive enzymatic profile of Dentex dentex and response to different dietary formulations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 154 (1), 157-164.
4. Peretti, D., & Andrian, I. D. F. (2008). Feeding and morphological analysis of the digestive tract of four species of fish (Astyanax altiparanae, Parauchenipterus galeatus, Serrasalmus marginatus and Hoplias aff. malabaricus) from the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68, 671-679.
5. Chakrabarti, I., Gani, M. A., Chaki, K. K., Sur, R., & Misra, K. K. (1995). Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112 (1), 167-177.
6. Baker, R., Buckland, A., & Sheaves, M. (2014). Fish gut content analysis: robust measures of diet composition. *Fish and Fisheries*, 15 (1), 170-177.

7.Manko, P. (2016). Stomach content analysis in freshwater fish feeding ecology. *University of Prešov*, 116.
8.Buckland, A., Baker, R., Loneragan, N., & Sheaves, M. (2017). Standardising fish stomach content analysis: The importance of prey condition. *Fisheries Research*, 196, 126-140.
9.Simenstad, C. A., & Cailliet, G. M. (2017). Retrospective on the origin, intent, and impact of the Gutshops and some directions for the future. *Environmental Biology of Fishes*, 100, 299-308.
10.Tomojiri, D., Musikasinthorn, P., & Iwata, A. (2019). Food habits of three non-native cichlid fishes in the lowermost Chao Phraya River basin, Thailand. *Journal of Freshwater Ecology*, 34 (1), 419-432.
11.Habib, K. M., & Adugna, A. A. (2021). Stomach content analysis of feed and feeding habit of *Oreochromis niloticus* fish species in baro-akobo basin, South West Ethiopia in case of Alwero Dam. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 11 (3), 2212457.
12.Soe, K. K., Hajisamae, S., Sompongchaiyakul, P., Towatana, P., & Pradit, S. (2022). Feeding habits and the occurrence of anthropogenic debris in the stomach content of marine fish from Pattani Bay, Gulf of Thailand. *Biology*, 11 (2), 331.
13.Wagaw, S., Mengistou, S., & Getahun, A. (2022). Diet composition and feeding habits of Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) in Lake Shala, Ethiopia. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 25 (1), 20-30.
14.Tesfahun, A., & Alebachew, S. (2023). Food and feeding habits of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from Ribb reservoir, Lake Tana sub-basin, Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture*, 9 (1), 2212457.
15.Bolasina, S., Pérez, A., & Yamashita, Y. (2006). Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. *Aquaculture*, 252 (2-4), 503-515.
16.German, D. P., Horn, M. H., & Gawlicka, A. (2004). Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical zoology*, 77 (5), 789-804.
17.Hani, Y. M. I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J. M., Geffard, A., & Dedourge-Geffard, O. (2018). Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. *PLoS One*, 13 (4), e0194932.
18.Huang, Y. S., Wen, X. B., Li, S. K., Xuan, X. Z., & Zhu, D. S. (2017). Effects of protein levels on growth, feed utilization, body composition, amino acid composition and physiology indices of juvenile chu's croaker, Nibea coibor. *Aquaculture Nutrition*, 23 (3), 594-602.
19.Tu, Y., Xie, S., Han, D., Yang, Y., Jin, J., Liu, H., & Zhu, X. (2015). Growth performance, digestive enzyme, transaminase and GH-IGF-I axis gene responsiveness to different dietary protein levels in broodstock allogenogynetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) CAS III. *Aquaculture*, 446, 290-297.
20.Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, J., & Sanz, A. (2008). Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser* naccarii) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149 (4), 420-425.
21.Fernandez, I., Moyano, F. J., Dıaz, M., & Martınez, T. (2001). Characterization of α-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262 (1), 1-12.
22.Drewe, K. E., Horn, M. H., Dickson, K. A., & Gawlicka, A. (2004). Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid

fish Brycon guatemalensis from Costa Rican rain forest streams. *Journal of Fish Biology*, 64 (4), 890-902.

23. German, D. P., Neuberger, D. T., Callahan, M. N., Lizardo, N. R., & Evans, D. H. (2010). Feast to famine: the effects of food quality and quantity on the gut structure and function of a detritivorous catfish (Teleostei: Loricariidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155 (3), 281-293.
24. López-Vásquez, K. A. T. H. E. R. I. N. E., Castro-Pérez, C. A., & Val, A. L. (2009). Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. *Journal of Fish Biology*, 74 (7), 1620-1628.
25. Hidalgo, M. C., Urea, E., & Sanz, A. (1999). Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170 (3-4), 267-283.
26. Debnath, D., Pal, A. K., Sahu, N. P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., & Venkateshwarlu, G. (2007). Digestive enzymes and metabolic profile of Labeo rohita fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146 (1), 107-114.
27. García-Meilán, I., Ordóñez-Grande, B., Machahua, C., Buenestado, S., Fontanillas, R., & Gallardo, M. A. (2016). Effects of dietary protein-to-lipid ratio on digestive and absorptive processes in sea bass fingerlings. *Aquaculture*, 463, 163-173.
28. Salehi, H. (2004). An economic analysis of carp culture production cost in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 4, 1-24.
29. Mazumder, S. K., Das, S. K., Rahim, S. M., & Abd Ghaffar, M. (2018). Temperature and diet effect on the pepsin enzyme activities, digestive somatic index and relative gut length of Malabar blood snapper (*Lutjanus malabaricus* Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Reports*, 9, 1-9.
30. Abolfathi, M., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., & Zamani, A. (2012). Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in juvenile roach, *Rutilus rutilus caspicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 161 (2), 166-173.
31. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193 (1), 265-75.
32. 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 (2), 271-278.
33. Hummel, B. C. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (12), 1393-1399.
34. Bernfeld, P. (1951). Amylases α and β: In *method in enzymology*. in: Colowick, P. and Kaplan, N.O. (Eds). Vol. 1 Academic Press Newyork. pp. 149-157.
35. Chan, A. S., Horn, M. H., Dickson, K. A., & Gawlicka, A. (2004). Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *Journal of Fish Biology*, 65 (3), 848-858.
36. De Almeida, L. C., Lundstedt, L. M., & Moraes, G. (2006). Digestive enzyme responses of tambaqui (Colossoma macropomum) fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition*, 12 (6), 443-450.
37. Langeland, M., Lindberg, J. E., & Lundh, T. (2013). Digestive enzyme activity in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *J. Aquac. Res. Develop.* 5 (208), 2.
38. Solovyev, M. M., Kashinskaya, E. N., Izvekova, G. I., Gisbert, E., & Glupov, V. V. (2014). Feeding habits and ontogenic changes in digestive enzyme patterns in five freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 85 (5), 1395-1412.

39. Sabat, P., Lagos, J. A., & Bozinovic, F. (1999). Test of the adaptive modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 123 (1), 83-87.
40. Martínez del Rio, C. (1990). Dietary, phylogenetic, and ecological correlates of intestinal sucrase and maltase activity in birds. *Physiological Zoology*, 63 (5), 987-1011.
41. Caviedes-Vidal, E., Afik, D., del Rio, C. M., & Karasov, W. H. (2000). Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 125 (1), 11-24.
42. Chaudhuri, A., Mukherjee, S., & Homechaudhuri, S. (2012). Diet composition and digestive enzymes activity in carnivorous fishes inhabiting mudflats of Indian Sundarban estuaries. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12 (2).
43. Kumar, S., & Tembre, M. (1998). Digestive system. In: Kumar, S. & Tembre, M. (Eds). Anatomy and Physiology of Fishes. Chapter 6. UBS press. 56-76.
44. Moran, D., & Clements, K. D. (2002). Diet and endogenous carbohydrases in the temperate marine herbivorous fish Kyphosus sydneyanus. *Journal of Fish Biology*, 60 (5), 1190-1203.
45. Odedeyi, D. O., & Fagbenro, O. A. (2010). Feeding habits and digestive enzymes in the gut of Mormyrus rume (Valenciennes 1846) (*Osteichthyes Mormyridae*). *Tropical zoology*, 23 (1), 75.
46. Rosa Gioda, C., Pretto, A., Freitas, C. D. S., Leitemperger, J., Loro, V. L., Lazzari, R., Lissner, L. A., Baldisserotto, B., & Salbego, J. (2017). Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural*, 47.
47. Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A., & Waagbø, R. (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish physiology and Biochemistry*, 32, 7-23.
48. Bitterlich, G. (1985). Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, Hypophthalmichthys molitrix Val., and bighead carp, Aristichthys nobilis Rich. *Journal of Fish Biology*, 27 (2), 103-112.
49. Horn, M. H., Gawlicka, A. K., German, D. P., Logothetis, E. A., Cavanagh, J. W., & Boyle, K. S. (2006). Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology*, 149, 1237-1245.
50. Lemieux, H., Blier, P., & Dutil, J. D. (1999). Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (Gadus morhua)?. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20, 293-303.
51. Santos, W. M., Costa, L. S., López-Olmeda, J. F., Costa, N. C. S., Santos, F. A. C., Oliveira, C. G., Guilherme, H. O., Bahiense, R. N., Luz, R. K., & Ribeiro, P. A. P. (2020). Dietary protein modulates digestive enzyme activities and gene expression in red tilapia juveniles. *animal*, 14 (9), 1802-1810.
52. Kumar, V., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2011). Detoxified Jatropha curcas kernel meal as a dietary protein source: growth performance, nutrient utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 17 (3), 313-326.
53. Manorama, M. A. I. S. N. A. M., & Ramanujam, S. N. (2017). Diet of threatened fish Pethia shalynius (Yazdani and Talukdar 1975) in the Umiam River, Northeast India. *Asian Fisheries Science*, 30 (1).