اثر عصاره پلی ساکارید جلبک الوا (*Ulva rigida*) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی میگوی پاسفید غربی (*Litopeneaus vannamei*)

زهرا امینی خویی[1] و پریا اکبری[2*]
Email: paria.akbary@gmail.com

1 مرکز تحقیقات آب‌های دور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.
2. گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

چکیده:

این مطالعه به بررسی اثر عصاره پلی ساکارید محلول در آب جلبک (*Ulva rigida*) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، پروتئاز، لیپاز) و فراسنجه های بیوشیمیایی (آسپارتات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز، آلانین آمینوترانسفراز، تری‌گلیسیرید، کلسترول، گلوکز، پروتئین تام، آلبومین، گلوبولین) میگوی پاسفید غربی (*Litopeneaus vannamei*) پرداخته است. لارو میگوها با متوسط وزن 0±1/1 گرم با 4 رژیم غذایی حاوی 0، 0/5، 1و 1/5 گرم بر کیلوگرم عصاره جلبکبه مدت 60 روز غذا دهی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره جلبک بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تاثیر معنی داری داشته است و بالاترین فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگوهای تغذیه شده با 1/5 گرم عصاره جلبک قابل مشاهده است. همچنین در رژیم‌های آزمایشی در هر سه سطح عصاره جلبک مورد استفاده میزان گلوکز، کلسترول، تری گلیسیرید، آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز بصورت معنی‌داری کاهش یافت (P<0/05). در حالی که، سطح پروتئین تام و گلوبولین در میگوهای تغذیه شده با 1 و 1/5 گرم عصاره جلبک به‌طور معنی‌دار بیشتر از تیمار شاهد بود (P<0/05). بنابراین استفاده از عصاره پلی ساکارید محلول در آب جلبک *U. rigida* در سطح 1/5 گرم بر کیلوگرم غذا برای بهبود عملکرد آنزیم‌های گوارشی، متابولیسم چربی و قند و سیستم ایمنی غیر اختصاصی میگوی پاسفید غربی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: عصاره پلی ساکارید محلول در آب، جلبک*Ulva rigida*، آنزیم‌های گوارشی، ، فراسنجه های بیوشیمیایی، *Litopeneaus vannamei*

1-مقدمه:

جلبک‌ها و عصاره آن‌ها به‌دلیل داشتن ترکیبات فعال بیولوژیکی دارای خواص مفید برای انسان، حیوانات و گیاهان در گذشته و در حال حاضر شناخته شدند (Chojnacka et al., 2012). گزارشات متعدد نشان می‌دهد که ترکیبات زیست فعال مشتق شده از جلبک‌های دریایی دارای خواص آنتی باکتری، ضد ویروسی، ضد تومور، ضد هیپرگلیسمی و هیپوگلیسمی هستند(Osman et al., 2013) جلبک-های دریایی محتوی پلی ساکاریدهای مختلف هستند که فعالیت بیولوژیکی آن‌ها وابسته به ویژگی ساختمانی، وزن مولکولی، تعداد اتصالات گلیکوزید، الگوی توزیع سولفات و ترکیب مونوساکارید می‌باشد (Ferreira et al., 2012; Wijesinghe et al., 2012). پلی ساکارید سولفاته فعالیت تعدادی گونه‌های باکتری و ویروس را مهار می‌کند. همچنین به‌عنوان پربیوتیک عمل نموده و باعث رشد باکتری مفید در لوله گوارش، اثرات مثبت بر رشد و ارتقاء سلامتی می‌شوند. بسیاری از آن‌ها از دسته فیبرهای محلول در رژیم غذایی هستند که نقش مثبتی بر لوله گوارش حیوانات (به‌عنوان مثال اسید آلژینیک) ایفاء می‌نمایند. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره پلی ساکارید محلول در آب جلبک *U. rigida* بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های بیوشیمیایی میگوی *L. vannamei* می-باشد.

2-مواد و روش:

شرایط پرورش میگو

1000 قطعه پست لارو میگوی پاسفید غربی با میانگین وزنی 0/1±1گرم از مرکز خصوصی تکثیر میگو خریداری و به مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار انتقال داده شد. قبل از شروع آزمایش،2 هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند و با جیره تجاری حاوی

(39 درصد پروتئین، 7 درصد چربی، 8 درصد خاکستر و 5 درصد رطوبت) غذا دهی شدند. پس از سازگاری، پست لاروها به‌صورت تصادفی با تراکم 50 پست لارو به 12 مخزن پلاستیکی 60 لیتری انتقال داده شدند. پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب به‌صورت روزانه در طول دوره آزمایش اندازه‌گیری شد. دمای آب 2±29 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن 0/5±7 میلی‌گرم بر لیتر، اسیدیته 7/5 و شوری 0/35±33/2 گرم بر لیتر ثبت شد. چهار جیره غذایی حاوی 0، 0/5، 1 و 1/5 گرم بر کیلوگرم عصاره جلبک *U. rigida* مورد استفاده میکوهای مورد آزمایش قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی

جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و فراسنجه‌های بیوشیمیایی، در پایان دوره آزمایش، پس از 24 ساعت قطع غذا، به‌صورت تصادفی 12 قطعه میگو از هر تیمار نمونه‌برداری شد و به صورت تصادفی کالبد شکافی صورت گرفت و با دقت روده آن‌ها برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی خارج گردید. از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون تهران و دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CA-400، شرکت Furuno ژاپن)برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی استفاده شد. فعالیت آنزیم‌های کبدی از قبیل آسپارتات آمینوترانسفراز (ASP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، گلوکز، آلبومین و گلوبین (Thomas,1998)، کلسترول و تری‌گلیسیرید (Rifai et al.,1999) با استفاده از کیت‌های تهیه شده از شرکت پارس آزمون تهران و با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CA-400، شرکت Furuno ژاپن) انجام شد.

آنالیز آماری

داده‌های آماری به‌صورت میانگین± خطای استاندارد گزارش شد تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) در سطح اطمینان 95 درصد ($P<0/05$) و با استفاده از نرم افزار SPSS19 انجام شد. نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون کالموگراف اسمیرنف مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

3-نتایج و بحث:

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و پروتئاز روده میگوی پاسفید غربی تغذیه شده با رژیم‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (روز60) در جدول 1 آورده شده است. فعالیت آنزیم-های گوارشی به‌عنوان شاخص نقش مهمی در تعیین قابلیت هضم و وضعیت تغذیه داشته و از این طریق می‌توان به فرمولاسیون مناسب جیره غذایی گونه‌های مختلف ماهی و سخت پوستان دسترسی یافت. در این تحقیق، اضافه نمودن سطوح مختلف عصاره پلی ساکارید محلول در آب جلبک الوا در جیره غذایی موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مقایسه با تیمار شاهد شد. می‌توان گفت که فیبرهای محلول در آب علی الخصوص اسید آلژنیک جلبک الوا احتمالا به‌عنوان پربیوتیک اثر مثبتی بر رشد باکتری مفید روده و هضم بهتر مواد غذایی داشتند (Li and kim, 2011). Mollazaei (2017) نشان داد که استفاده از 10 گرم عصاره جلبک الوا (*U. rigida*) منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم-های گوارشی در ماهی کفال خاکستری شد که با تحقیق حاضر همخوانی داشت.Morshedi و همکاران (2017) نشان دادند که استفاده از 9 درصد جلبک گراسیلاریا (*G. puluvinata*) در جیره غذایی ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) منجر به کاهش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و پروتئاز در مقایسه با تیمار شاهد شد که با نتایج این تحقیق همخوانی نداشت که دلیل تفاوت در نتایج می‌تواند احتمالا مربوط به میزان فیبر موجود در جلبک باشد که هر چه میزان فیبر بالا باشد مانع قابلیت دسترسی آنزیم‌های گوارشی به مواد مغذی (کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها) می‌شود (Potty, 1996). همچنین مواد ضد تغذیه ای موجود در جلبک‌های دریایی نظیر اسید فیتیک، ساپونین و تانن‌ها باشد که بر هضم و کارایی مصرف غذا تاثیرگذار می‌باشند (Franci *et al.*, 2001).. ساپونین‌ها به‌دلیل مزه تلخ و اختلال در جذب لیپیدها و نمک‌های صفراوی می‌توانند در روند مصرف و هضم مواد غذایی تاثیرگذار باشند (Guillaume and Choubert, 2001). همچنین شرایط پرورشی، غلظت استفاده از عصاره جلبک و میزان ترکیبات زیست فعال خاص هر جلبک و گونه آبزی می‌تواند در اختلاف نتایج تاثیر گذار باشد (Peixioto *et al.*, 2016).

جدول 2- تغییرات میانگین فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی پاسفید غربی در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش (روز 60)

فعالیت آنزیم‌ها	تیمار			
(واحد بر میلی‌گرم	1	2	3	4

پروتئین)				
لیپاز	11/1±05/51^{c}	1±12/57^{c}	16/3±64/52^{b}	1±20/21^{a}
پروتئاز	1±87/02^{c}	88/1±66/15^{bc}	90/4±64/52^{b}	1±94^{a}
آمیلاز	281/5±60/76^{c}	1±289/07^{c}	303/5±33/77^{b}	320/2±33/51^{a}

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است ($P<0/05$). تیمار1 تا 4 به‌ترتیب حاوی 0، 0/5، 1 و 1/5 گرم عصاره جلبک الوا بر کیلوگرم غذا است.

میزان شاخص‌های بیوشیمیایی میگوی پا سفید غربی در تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش در جدول 2 آورده شده است.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که اضافه نموده 1 و 1/5 گرم عصاره پلی ساکارید مجلول در آب جلبک الوا به هر کیلوگرم غذا منجر به افزایش معنی‌دار سطوح پروتئین و گلوبولین در مقایسه با تیمار شاهد شد و تنها میزان آلبومین در غلظت 1/5 گرم عصاره جلبک بر کیلوگرم غذا اختلاف معنی‌دار را با سایر تیمارها نشان داد. Akbary و همکاران (2018) نشان دادند که بیشترین میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین در تیمارحاوی 10 گرم عصاره جلبک الوا بر کیلوگرم غذا در ماهی کفال خاکستری مشاهده شد. همچنین Kaleeswaran و همکاران (2012) نشان دادند که استفاده از 5 درصد عصاره اتانولی جلبک *Cynodon dactylon* منجر به افزایش معنی‌دار میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم ماهی کاتلا (*Catla catla*) در مقایسه با تیمار شاهد شد که با تحقیق حاضر همخوانی داشتند. می‌توان گفت پلی ساکارید های موجود در جلبک الوا نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی دارند و دارای خواص آنتی اکسیدانی موثری هستند (Souza et al., 2012) و با افزایش آلبومین انتقال ترکیب زیست فعال جلبک به بافت هدف را تحریک نموده و همچنین با افزایش الفا و بتا گلوبولین به‌عنوان حامل یا گاما گلوبولین منجر به تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی می‌گردند (Banaee *et al.*, 2011).

حساسترین و پر مصرف‌ترین آنزیم‌های کبدی آمینوترانسفرازها هستند (Zeinab *et al.*, 2015). ()همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از سطوح مختلف عصاره پلی ساکارید محلول در آب جلبک الوا در جیره غذایی میزان فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز کاهش معنی‌داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند که تیمارحاوی 1/5 گرم عصاره پلی ساکارید محلول در آب جلبک الوا بر کیلوگرم غذا کمترین میزان فعالیت را از نظر آنزیم‌های مذکور نشان داد. Zeinab و همکاران (2015) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Orechromis niloticus*) منجر به کاهش معنی‌دار آنزیم‌های آمینوترانسفراز شد. همچنین Madibana و همکاران (2017) نشان دادند که استفاده از جلبک الوا در جیره غذایی ماهی *Agrosomus japonicas* منجر به افزایش معنی‌دار سطوح آنزیم‌های آمینوترانسفراز و کاهش معنی‌دار میزان آلکالین فسفاتاز شد که تنها از نظر آلکالین فسفاتاز با تحقیق حاضر همخوانی داشت. می‌توان گفت احتمالا خواص آنتی اکسیدانی موثر پلی ساکاریدهای محلول در آب جلبک الوا می‌توانند منجر به افزایش فعالیت آنزیم-های آنتی اکسیدانی کبد و حفاظت از عملکرد کبد گردد (Souza et al., 2012).Khalafalla و El- Hais (2015) نشان دادند که استفاده از سطوح مختلف (2/5 و 5 درصد) جلبک سبز الوا (*U. lactuca*) و جلبک قرمز *Pterocladia capillacea* تفاوت معنی-داری در میزان آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز کبدی در مقایسه با تیمار شاهد در ماهی (*Orechromis niloticus*) ایجاد نکرد که با تحقیق حاضر همخوانی نداشت می‌توان دلیل این تفاوت را به اختلاف در میزان ترکیبات زیست فعال موجود در جلبک و گونه ماهی مرتبط دانست.

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه،، می‌توان گفت که تجویز خوراکی عصاره پلی ساکارید جلبک الوا در جیره غذایی میگوی پاسفید غربی منجر ممکن است منجر به بهبود عملکرد آنزیم‌های گوارشی، سیستم ایمنی غیر اختصاصی (پروتئین تام، گلوبولین و آلبومین) و سلامت بدن با بهبود متابولیسم قند و چربی شود. لذا استفاده از 1/5 گرم عصاره پلی ساکارید الوا در جیره غذایی در مزارع پرورش میگوی پاسفید غربی توصیه می‌گردد

جدول2. تغییرات میانگین (میانگین± خطای معیار) شاخص‌های بیوشیمیایی میگوی پا سفید غربی در تیمارهای مختلف درپایان دوره آزمایش

تیمار			
1	2	3	4

پروتئین تام (گرم بر دسی لیتر)	4/0±68/12^{c}	0±5/10^{b}	5/0±20/1^{b}	6/0±03/25^{a}
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	1±20^{a}	17/1±33/15^{b}	1±14/24^{c}	9/2±34/17^{d}
کلسترول(میلی‌گرم بر دسی لیتر)	1±17^{a}	14/0±23/57^{b}	11/1±66/53^{c}	1±7^{d}
تری گلیسیرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	1±66/06^{a}	65/1±07^{a}	67/1±66/58^{b}	56/2±66/08^{c}
آلبومین (گرم بر دسی لیتر)	2/0±89/11^{b}	2/0±90/10^{b}	3/0±03/40^{b}	3/0±30/18^{a}
گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)	1/0±79/12^{c}	2/0±10/17^{bc}	2/0±17/15^{b}	2/0±73/30^{a}
آلانین آمینو ترانسفراز (واحد بر لیتر)	1±66/02^{a}	62/3±66/52^{b}	1±59^{c}	55/1±33/29^{d}
آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد بر لیتر)	12±100/08^{a}	5±97/14^{b}	8±94/04^{b}	3±88/51^{c}
آلکالین فسفاتاز (واحد بر لیتر)	39/4±65/52^{a}	1±36/23^{b}	1±33/09^{c}	29/2±62/34^{d}

حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است ($P<0/05$). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یک طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. تیمار1 تا 4 به‌ترتیب حاوی 0، 0/5، 10 و 1/5 گرم عصاره جلبک الوا بر کیلوگرم غذا است.

4-منابع:

1. **Akbary, P.,| Aminikhoei, Z. 2018.** Effect of polysaccharides extracts of algae *Ulva rigida* on growth, antioxidant, immune response and resistance of shrimp,*Litopenaeus vannamei* against *Photobacterium damselae*. Aquaculture Research.49:2503–25101
2. **Akbary, P., MollaZei, E., Aminikhoe, Z. 2018**. Effect of dietary supplementation of *Ulva rigida* C. Agardh extract on several of physiological parameters of grey mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus).Iranian Journal of Aquatic Animal Health. 4(1) :59-68.
3. **Alam, S. M. N., Pokrant, B., Yakupitiyage, A., Phillips, M J. 2007**. Economic returns of disease affected extensive shrimp farming in southwest Bangladesh. Aquaculture International. 14: 363–370.
4. **Ali, A. 2000**. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. Ph.D Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Umea, Sweden
5. **Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. 2004**. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immunology. 16: 527-537
6. **Atli, G., Canli, M. 2010**. Response of antioxidante systemof freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal(Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73: 1884-1889.
7. **Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R., Rafei, G.R., 2011**. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry. 37: 887-896.
8. Choi, Y.H.; Lee, B.J. and Nam, T.J., 2015. Effect of dietary inclusion of *Pyropia yezoensis* extract on biochemical and immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus* Aquaculture, Vol.435, pp: 347-353
9. **Chojnacka, K.,, Agnieszka, S., Zuzanna, W., Tuhy, E. 2012.** Biologically Active Compounds in Seaweed Extracts - the Prospects for the Application.The Open Conference Proceedings Journal. 3: 20-28
10. **Debashi, F. 2017**. Effect of red seaweed, *Jania adhaerens* extract on the growth performance, feed utilization, body composition and digestive enzymatic activities of grey mullet *Mugil cephalus*. M.Sc thesis. Marine Sciences Department, Chabahar Maritime University. 60 p. (In Persion)

Effect of water soluble polysaccharides extracts of algae *Ulva rigida* on the activity of digestive enzymes and biochemical parameters of *Litopenaeus vanname* shrimp

Zahra Aminikhoei[1] Paria Akbary[2*]
Email: paria.akbary@gmail.com

1 Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Offshore Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Chabahar, Iran.

2. Fisheries Group, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Abstract:

This study was carried out to investigate the effect of water-soluble polysaccharides extract of algae *Ulva rigida* (WPU) on the activity of digestive enzymes and biochemical parameters of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Three replicate groups of shrimp (1.0 ± 0.1g) were fed four diets containing four levels, 0 or control, 0.5, 1 and 1.5 g/kg of WPU for 60 days. The results of this study showed that WPU was effective on the activity of digestive enzymes *L. vannamei*. The best the activity of digestive enzymes were observed in shrimp fed 1.5 g/kg of WPU diet. Regarding biochemical parameters, the diets supplemented with three levels of WPU reduced glucose, cholesterol, triglyceride, aspartat aminotransferase, alanin aminotransferase and alkaline phosphatase in experimental shrimps. Also, protein and globulin levels of shrimp receiving WPU at 1.0 and 1.5 level were significantly higher than those fed control treatment. In conclusion, the incorporation of water-soluble polysaccharides from green algae *U. rigidaat* 1.5 g/kg doses improves function of digestive enzymes, carbohydrate and lipid metabolisms and non specific immunity in shrimp *L. vannamei*.

Key Words: Digestive enzymes, Ulva algae, Biochemical parameters, Litopeneaus vannamei, Water soluble polysaccharide,