Journal of Marine Science and Technology

Summer 2025, Vol. 24, No.2, pp. 69-88.

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

Original Article

Effects of alfalfa (meal and extract) on digestive enzymes and liver composition in juveniles of common carp (*Cyprinus carpio*)

Iman Amirzadekani, Seyed Mohammad Mousavi *, Nasim Zanguee, Mohammad Zakeri

Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

* **Corresponding Author E-mail:** seied1356@yahoo.com

Received: 1 February 2020 **Revise Date:** 25 December 2020 **Accepted:** 26 December 2020

DOI: 10.22113/jmst.2020.218047.2347

Abstract

In the present study, the effects of different levels of alfalfa powder and alcoholic extract on the activity of digestive enzymes and liver compounds of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles were examined. For this purpose, 270 fish (with an average initial weight: 20.04±0.19 g) were randomly distributed in 27 polyethylene tanks and fed by the carp commercial diet. The experimental treatments of 9 groups (4 groups with 3, 6, 9, and 12% of alfalfa powder, 4 groups with 1, 2, 3, and 4% of alcoholic extract and one control group) with three replications were considered for 8 weeks. At the end of the experimental period, the activity of digestive enzymes was measured in terms of U/mg Protein and liver composition. Based on the results, the highest levels of activity of digestive enzymes, amylase (674.74±61.57), lipase (6.21±0.96), alkaline phosphatase (452.84±28.18), trypsin (252.05±19.98) and chymotrypsin (0.10±0.001) in the extracts of 3%, 3%, 3%, 4% and 4% extracts, respectively, and the lowest amount of these enzymes were observed respectively with values of 388.17±38.27 (control), 2.51±0.55 (control), 187.7±19.36 (12% powder), 0.030±0.004 (12% powder) and 132.47±11.47 (9% powder) ($P < 0.05$). The highest amount of hepatic glycogen (3383.35±192.13 µg/g tissue) was measured in the 3% extract treatment and the lowest amount of hepatic glycogen (607.01±101.23 µg/g tissue was in the control treatment ($P < 0.05$). The highest level of liver lipids (146.51±6.05 mg/g tissue) was observed in the treatment of 6% powder and the lowest level of liver lipids (72.99±4.46 mg/g tissue) was observed in the treatment of 12% powder ($P < 0.05$). According to the present study, adding powder and especially alfalfa extract to the diet of common carp can increase the activity of digestive enzymes and increase liver lipid and glycogen at certain levels. A diet containing 3% alfalfa extract had a significant effect on the activity of digestive enzymes and liver glycogen levels. Also, a diet containing 9% alfalfa powder significantly increased the activity of lipase enzyme and liver lipid levels. According to the results, the use of alfalfa extracts up to a level of 3% in the diet of common carp, as a growth supplement and nutrition are recommended.

Key words: *Cyprinus carpio*, alfalfa (*Medicago sativa*), Gastric enzymes, liver composition.

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. INTRODUCTION

Improving feed efficiency in aquaculture is a critical factor in reducing production costs and enhancing growth performance, as a substantial proportion of total expenses is associated with feed. In recent years, increasing attention has been directed toward the use of natural and plant-based additives, particularly phytobiotics, as safe alternatives to synthetic growth promoters. Digestive enzyme activity and nutrient absorption play a crucial role in providing a stable energy supply and promoting fish growth, as higher secretion and activity of these enzymes enhance nutrient availability and efficient digestion (Blier et al., 1997; Nya and Austin, 2011; Awad et al., 2012). Medicinal plants such as alfalfa contain bioactive compounds, including flavonoids, alkaloids, and essential fatty acids, which can serve as growth promoters, appetite stimulants, and enhancers of digestive enzyme activity in aquafeeds (Sivaram et al., 2004; Yu et al., 2008). Previous studies have demonstrated that supplementation of fish diets with alfalfa extract can significantly increase the activity of amylase, lipase, trypsin, and chymotrypsin, thereby improving digestion and nutrient utilization (Zhang et al., 2009; Kolivand, 2020; Falamarzi et al., 2016). Given that common carp (Cyprinus carpio) is one of the most important cultured fish species worldwide and that digestive enzyme activity and hepatic metabolism play crucial roles in its growth, the present study aimed to evaluate the effects of dietary alfalfa powder and extract on digestive enzyme activity and liver glycogen and lipid levels in juvenile common carp during an eight-week feeding trial.

2. MATERIALS AND METHODS

An eight-week feeding trial was conducted to evaluate the effects of alfalfa (Medicago sativa) powder and ethanolic extract on digestive enzyme activity and liver biochemical composition in juvenile common carp (Cyprinus carpio; 20.04 ± 0.19 g). A total of 270 fish were randomly distributed into 27 tanks (10 fish/tank) and acclimated for two weeks. Nine dietary treatments, including graded levels of alfalfa powder (3–12%) and extract (1–4%), along with a control, were formulated from a commercial carp diet. Fish were fed to satiation three times daily, with water quality monitored throughout the trial. At the end, intestinal and liver samples were collected to measure enzyme activities (amylase, lipase, trypsin, chymotrypsin, alkaline phosphatase) and liver glycogen and lipid content using standard biochemical assays. Data were analyzed using one-way ANOVA and Duncan's post hoc test. This study provides a controlled evaluation of alfalfa as a phytobiotic feed additive, highlighting its potential to enhance digestive efficiency and liver metabolic status in common carp.

3. RESULTS

The effects of different levels of alfalfa powder and ethanolic extract on digestive enzyme activities and liver composition in juvenile common carp (Cyprinus carpio) were evaluated at the end of the feeding trial. Digestive enzymes measured included amylase, lipase, alkaline phosphatase, trypsin, and chymotrypsin. The highest amylase activity was observed in treatment E3 (57.74 ± 61.674 U/mg protein), while the control exhibited the lowest (27.17 ± 38.388 U/mg protein). Lipase activity peaked in treatments E3 and P9, whereas the control had the lowest value. Alkaline phosphatase activity was highest in E3 and lowest in P12. Trypsin and chymotrypsin activities reached their maximum in E4, while the lowest activities were observed in P9, P12, and the control. Liver biochemical analysis showed that glycogen content was highest in E3 (192.3383 ± 13.35 µg/g tissue) and lowest in the control, with significant differences between treated groups and control. Liver lipid content was highest in P9 (146.6 ± 5.51 mg/g tissue) and lowest in P12, with significant differences among treatments. These results indicate that specific levels of alfalfa supplementation can enhance digestive enzyme activity and liver energy reserves in juvenile common carp.

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

Supplementing juvenile common carp diets with alfalfa, especially as extract, enhanced digestive enzyme activities (amylase, lipase, trypsin, and chymotrypsin), improving carbohydrate and protein digestion. Alfalfa extract increased liver glycogen, likely via enhanced glucose absorption and insulin stimulation, while liver lipid content was moderately affected, correlating with lipase activity. Powdered alfalfa showed weaker or sometimes inhibitory effects, probably due to anti-nutritional factors. Overall, alfalfa, particularly as extract, improved nutrient utilization and energy storage, supporting growth in common carp .Adding alfalfa powder and especially extract to the diet of common carp, particularly at 3% extract, increased digestive enzyme

activities and liver reserves (glycogen and lipids), which can enhance growth and nutritional indices; thus, using alfalfa extract up to 3% of the diet is recommended.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors of this paper express their sincere gratitude to the Research and Technology Deputy of Khorramshahr University of Marine Science and Technology for their financial support and for providing the necessary equipment for this study.

REFERENCES

Awad, E., Austin, D. and Lyndon, A.R., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture, 388*, pp. 193-197. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.008

Blier, P., Bergeron, and Montigny, C.D., 1997. Selective activation of postsynaptic 5-HT 1A receptors induces rapid antidepressant response. *Neuro Psychopharmacology, 16*(5), pp. 333-338. doi: 10.1016/S0893-133X(96)00242-4

Falamarzi, Z., Mousavi, S.M., Zakeri, M. and Zanguee, N., 2016. Effects of different levels of Alfalfa meal and alcoholic extract on growth, nutrition, biochemical carcass composition and some serum biochemical parameters of Common Carp, *Fisheries Journal (Iranian Journal of Natural Resources), 69*(2), pp. 235-251. (In Persian). doi: 0.22059/jfisheries.2016.59854

Kolivand, A., 2020. Effects of different dietary levels of Medicago sativa on growth performance, survival and immune parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. PhD's degree thesis, Khorramshahr University of Marine Sceince and Technology, (In Persian).

Nya, E.J. and Austin, B., 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydriphila* after the dietary application of garlic. *Fish and Shellfish Immunology, 30*(3), pp.845-850. doi: 10.1016/j.fsi.2011.01.008

Sivaram, V., Babu, M.M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass S. and, Marian, M.P., 2004. Growth andimmune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture, 237*, pp. 9-20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.03.014

Yu, M.C., Li, Z.J., Lin, H.Z., Wen, G.L. and Ma, S., 2008. Effects of dietary Bacillus and medicinal herbs on the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International, 16*, pp. 471-480. doi: 10.1007/s10499-007-9159-1

Zhang, G.F., Yang, Z.B., Wang, Y., Yang, W.R., Jiang, S.Z. and Gai, G.S., 2009. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status and serum metabolites of broiler chicken, *Poultry Science, 88*, pp. 2159-2166. doi: 10.3382/ps.2009-00165

مجله علوم وفنون دریایی، فصل نامه ی علمی پژوهشی

دوره ۲۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۴، صفحات ۶۹ تا ۸۸.

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

اثرات گیاه یونجه (پودر و عصاره) بر آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات کبد ماهی کپور معمولی جوان (*Cyprinus carpio*)

ایمان امیرزادکانی، سید محمد موسوی*، نسیم زنگویی، محمد ذاکری

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: seied1356@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲ **تاریخ بازنگری:** ۱۳۹۹/۱۰/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/jmst.2020.218047.2347

چکیده

در مطالعه حاضر اثرات سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی گیاه یونجه بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات کبد ماهیان جوان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی (با میانگین وزن اولیه: ۰/۱۹±۲۰/۰۴ گرم) به‌طور تصادفی در ۲۷ تانک پلی‌اتیلن ۳۰۰ لیتری توزیع و با جیره تجاری کپور تغذیه شدند. تیمارهای آزمایشی ۹ گروه (۴ گروه با درصدهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ درصد پودر، ۴ گروه با درصدهای ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد عصاره و یک گروه شاهد) با سه تکرار به مدت ۸ هفته، در نظر گرفته شدند. در پایان دوره آزمایشی میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی بر حسب U/mg Protein و ترکیبات کبد اندازه‌گیری گردید. بر اساس نتایج حاصله، بالاترین میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز (۶۷۴/۷۴±۶۱/۵۷)، لیپاز (۶/۲۱±۰/۹۶)، آلکالین فسفاتاز (۴۵۲/۸۴±۲۸/۱۸)، تریپسین (۲۵۲/۰۵±۱۹/۹۸) و کیموتریپسین (۰/۰±۱۰/۰۰۱) به‌ترتیب در تیمارهای ۳٪، ۳٪، ۳٪، ۴٪ و ۴٪ عصاره و کمترین میزان این آنزیم‌ها به‌ترتیب با مقادیر ۳۸۸/۳۸±۱۷/۲۷ (شاهد)، ۲/۰±۵۱/۵۵ (شاهد)، ۱۸۷/۷±۱۹/۳۶ (۱۲٪ پودر)، ۰/۰۳۰±۰/۰۰۴ (۱۲٪ پودر) و ۱۳۲/۴۷±۱۱/۴۷ (۹٪ پودر)، مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بیشترین میزان گلیکوژن کبد (۳۳۸۳/۳۵±۱۹۲/۱۳ µg/g tissue) در تیمار ۳٪ عصاره و کمترین میزان گلیکوژن کبد (۶۰۷/۰۱±۱۰۱/۲۳ µg/g tissue) در تیمار شاهد اندازه گیری گردید (P<۰/۰۵). بیشترین میزان لیپید کبد (۱۴۶/۵۱±۶/۰۵ mg/g tissue) در تیمار ۶ درصد پودر و کمترین میزان لیپید کبد (۷۲/۹۹±۴/۴۶ mg/g tissue) در تیمار ۱۲ درصد پودر، مشاهده شد (P<۰/۰۵). براساس نتایج تحقیق حاضر، افزودن پودر و خصوصا عصاره یونجه به جیره غذایی ماهی کپور معمولی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و افزایش لیپید و گلیکوژن کبد در سطوح معینی می‌گردد. جیره حاوی ۳ درصد عصاره یونجه، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان گلیکوژن کبد داشت. همچنین جیره حاوی ۹ درصد پودر یونجه باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیپاز و میزان لیپید کبد گردید. با توجه به نتایج حاصله، استفاده از عصاره یونجه حداکثر تا سطح ۳ درصد در جیره غذایی ماهی کپور معمولی، به عنوان یک مکمل رشد و تغذیه توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: کپور معمولی، یونجه، آنزیم‌های گوارشی، ترکیبات کبد

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

۱. مقدمه

اولویت اصلی در پرورش آبزیان برای افزایش کارایی جیره‌های غذایی، استفاده از روش‌هایی است که منجر به بهبود فرآیند هضم مواد غذایی موجود در جیره غذایی می‌شود (Francis et al., 2005). با توجه به اینکه در مزارع آبزی‌پروری ۴۰ الی ۵۰ درصد هزینه‌های تولید مربوط به تأمین غذا می‌باشد (Abowei and Ekubo, 2011)، از این‌رو تغذیه مناسب برای افزایش تولید و بهبود راندمان اقتصادی در تغذیه آبزیان بسیار ضروری است (Craig and Helfrich, 2002). آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، ویتامین‌ها، همبندها، آنتی‌اکسیدانت‌ها و محرک‌های رشد از جمله افزودنی‌هایی هستند که در جیره غذایی آبزیان استفاده شده و باعث افزایش رشد می‌گردند (De Silva and Anderson, 1995; Baruah et al., 2008). در سال‌های اخیر، تحقیقات مختلفی بر استفاده از داروهای با منشاء گیاهی روی آبزیان صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به اثرات ضدقارچی اسانس ترکیبی گیاهی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Mousavi et al., 2012) و اثر عصاره الکلی زنجبیل بر پارامترهای سرمی، خون شناسی و باکتری-های بیماری‌زای آبزیان (Asadi et al., 2015; Asadi et al., 2016) اشاره نمود. در کنار ترکیبات گیاهی، محرک‌های رشد طبیعی باعث افزایش رشد، تحریک و بلوغ سریع سیستم ایمنی، کاهش میزان مرگ و میر، بهبود فرآیند هضم، رشد سریع میکروفلورهای مناسب روده، تأثیر بر میزان اشتها و افزایش میزان تغذیه می‌شوند (Steiner, 2006). افزودنی‌های گیاهی با افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی موجب افزایش اشتها، افزایش میزان تغذیه و کارایی تغذیه شده (Jiang et al., 2007) و منجر به افزایش رشد و میزان تولید می‌شوند (Saravana Bhavan et al., 2012).

کپورماهیان آب‌شیرین از لحاظ ارزش غذایی از برخی ماهیان دریایی با ارزش‌تر می‌باشند (Buchtova et al., 2011). به-طوری‌که کپورماهیان به خصوص کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌عنوان یک غذای مطلوب در سرتاسر جهان استفاده می‌گردد (FAO, 2013). سرعت رشد مناسب، پرورش در محیط-های آبی با کیفیت نه چندان مطلوب، هزینه‌های پایین تغذیه و نگهداری و تطابق‌پذیری با گونه‌ها و شرایط اقلیمی متفاوت، این گونه را در زمره سه گونه مهم پرورشی در جهان قرار داده است (FAO, 2008). به‌طوری‌که در حال حاضر به عنوان یک گونه مناسب در صنعت آبزی‌پروری برای پرورش در مزارع پرورشی در سطح جهان می‌باشد (FAO, 2013).

گیاه یونجه (*Medicago sativa*) گیاهی است علفی و چند ساله از تیره بقولات (Fabaceae)، که در انگلیسی به آن Alfalfa گفته می‌شود. یونجه از راسته Fabales و خانواده Fabaceae است (Lin et al., 1999). یونجه سرشار از ویتامین‌های B_1، B_6، K، E، C و A بوده و همچنین دارای آنزیم آمیلاز است که آنزیم مخصوص هضم مواد نشاسته‌ای می‌باشد (Talei and Meshkatalsadat, 2007). آنزیم‌های بسیاری در یونجه یافت می‌شود، به عنوان مثال می‌توان از اینورتاز و پکتیناز نام برد. یونجه دارای حدود ۲۰٪ پروتئین می‌باشد. اسید آمینه‌های موجود در یونجه شامل لیزین، آرژنین، هیستیدین، آدنین، فنیل آلانین، آسپاراژین و سیستئین است. همچنین در یونجه مقادیری اسید فسفریک وجود دارد. یونجه همچنین دارای روی، کلسیم، کاروتن، پتاسیم، منیزیم، آهن و مقدر جزئی آرسنیک و سیلیس است (Pinarosa et al., 2006). گیاه یونجه حاوی آنزیم‌های ضروری است که می‌تواند باعث هضم بهتر غذا در فرآیند گوارش و در نهایت باعث بهبود رشد و تغذیه گردد (Khare, 2007). از دلایل عمده استفاده از یونجه به عنوان فیتوبیوتیک به عنوان یک افزاینده رشد و راندمان تغذیه، می‌توان به این نکته اشاره نمود که گیاه یونجه با افزایش فعالیت آمیلاز و پروتئاز، به عنوان آنزیم‌های گوارشی، عملکرد گوارشی کپور معمولی را بهبود می‌بخشد (Zhang et al., 2009).

همانند سایر مهره داران، توانایی ماهی در استفاده از مواد غذایی به حضور آنزیم‌های مناسب در دیواره و در امتداد مجرای دستگاه گوارش بستگی دارد. به طور کلی، توزیع و شدت فعالیت آنزیم‌ها در طول روده به عادات غذایی و ریخت‌شناسی روده مرتبط است (Kuz'mina and Smirnova, 1992; Sabapathy and Teo, 1993).

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه‌های پرورشی ممکن است در انتخاب اجزای غذایی مفید بوده (Lan and Pan, 1993) و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ریخت‌شناسی سیستم گوارش ماهی ارتباط نزدیکی با رژیم غذایی ماهی دارد (Chakrabarti et al., 1995). آنزیم لیپاز به‌طور عمده توسط پانکراس ترشح می‌شود و نقش مهمی در تجزیه لیپیدها به ویژه تری–اسیل گلیسرول‌ها ایفا می‌کند که منجر به هضم و جذب آن‌ها می‌شود (Ugwumba, 1993; Jun-sheng et al., 2006). آنزیم آلکالین فسفاتاز در هیدرولیز و سنتز استرهای اسیدفسفریک و انتقال گروه‌های فسفات از اسید فسفریک به سایر ترکیبات در pH قلیایی نقش دارد و آن را تسریع می‌نماید (Nya and Austin, 2011). آنزیم تریپسین از بافت پانکراس یا لوزالمعده ترشح می‌شود و بیشترین میزان آن در ابتدای روده و همچنین روده کور می‌باشد

(Xiong et al., 2009). ترشح این آنزیم منجر به افزایش کارایی تغذیه و نرخ رشد می‌گردد که این کار را با اثر گذاشتن بر نرخ هضم پروتئین و تفاوت در میزان جذب اسیدهای آمینه و انتقال آنها انجام می‌دهد (Jobling, 1995; Souza et al., 2007; Silva et al., 2011). میزان فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین به عنوان شاخص وضعیت تغذیه‌ای ماهیان محسوب می‌شود و ترشح آن متناسب با میزان فعالیت پانکراس می‌باشد (Sunde et al., 2001). کیموتریپسین، آنزیمی است که از سلول‌های پانکراس به‌صورت پروآنزیم ترشح می‌شود و به هضم پروتئین‌ها کمک می‌کند (Chakrabarti et al., 2006). در برخی مطالعات از این آنزیم به عنوان نشان‌گر تغذیه‌ای استفاده شده است و استفاده از آن به‌عنوان نشانگر تغذیه‌ای منجر به این می‌شود که بتوان از وضعیت گوارشی آگاهی پیدا کرد (Applebaum and Holt., 2003).

کبد اندام اصلی متابولیسم، ترشح و دفع مواد بوده و به طور مداوم در معرض انواع مختلف ترکیب‌های درونی و بیرونی قرار می‌گیرد (Luper, 1998). در ماهیان، کبد منبع اصلی ذخیره کربوهیدرات با منبع گلوکز خون می‌باشد. بعد از این‌که غلظت گلیکوژن کبدی به ۵ تا ۶ درصد می‌رسد سنتز گلیکوژن را مهار می‌کند و گلوکز اضافی صرف تشکیل لیپید در کبد می‌شود. از اثرات احتمالی دیگر، افزایش استفاده از گلوکز برای تأمین انرژی می‌باشد، که در نتیجه لیپید جیره در بافت‌هایی نظیر کبد و عضلات ذخیره می‌شود (Guyton and Hall, 2006). از طرفی یونجه حاوی ویتامین A می‌باشد که به ریتنوئید تبدیل شده و موجب افزایش ذخیره لیپید به صورت تری‌گلیسرید می‌شود (Johari et al., 2009).

با این وجود اطلاعات موجود در زمینه تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی با تغییر سطوح اجزای جیره غذایی اندک است. از آنجا که مطالعه فرآیند گوارش بدون در نظر گرفتن آنزیم‌های موثر در فعالیت هضم و گوارش بی‌معنی است، لذا معمولاً فرآیندهای گوارشی و فعالیت‌های آنزیمی به عنوان یک مفهوم و هم ردیف در نظر گرفته می‌شوند. در نتیجه می‌توان در بیشتر موارد فعالیت گوارشی را معادل فعالیت آنزیمی در نظر گرفت (Rungruangsak-Torrissenen et al., 2006). ظرفیت گوارشی و فعالیت‌های آنزیمی از عوامل مهم تأثیرگذار در نرخ رشد بوده و می‌تواند نقش مهمی در فیزیولوژی جانور داشته و در صورت اختلال در عملکرد آنها، اثرات محدود کننده‌ای بر رشد داشته باشد (Belanger et al., 2002). از تحقیقات صورت گرفته روی اثرات گیاه یونجه و یا عصاره آن در سایر آبزیان به موارد زیر می توان به بررسی روی ماهی کپور معمولی (Kiantaheri, 2015) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Najafi et al., 2018; Kolivand, 2020) اشاره نمود. با توجه به نتایج حاصل از تحقیق Falamarzi et al. (2016)، که به بررسی اثرات سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه بر عملکرد رشد، تغذیه، ترکیبات بیوشیمیایی لاشه و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خونی ماهی کپور معمولی پرداختند و در تحقیق آنها، اثرات مثبت پودر و عصاره در سطوح معینی مشاهده گردید و با توجه به اینکه با بررسی فرآیندهای گوارشی مبتنی سطوح آنزیم‌های گوارشی، می‌توان به اطلاعات دقیق‌تری نسبت به کیفیت و میزان رشد در ماهی دست پیدا کرد. پس بر این اساس، هدف از این مطالعه بررسی اثرات گیاه یونجه (*Medicago Sativa*) به صورت پودر و عصاره بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان گلیکوژن و لیپید کبد ماهی کپور معمولی جوان (*Cyprinus carpio*) در یک دوره تغذیه‌ای (۸ هفته ای) بوده است.

۲. مواد و روش‌ها

تعداد ۲۷۰ قطعه ماهی کپور معمولی حدود یک ساله (با میانگین وزن ۰/۱۹±۲۰/۰۴ گرم) در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۳ با استفاده از کپسول اکسیژن و مخازن مخصوص حمل و نقل آبزیان همراه با هوادهی مداوم از یکی از مزارع پرورش ماهی واقع در مجتمع پرورش ماهیان گرمابی دشت آزادگان در ۱۳ کیلومتری جاده اهواز–آبادان تهیه و به آزمایشگاه خیس دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انتقال داده شدند و به طور کاملاً تصادفی بین ۲۷ تانک پلی‌اتیلن (با ظرفیت آب‌گیری ۲۷۰ لیتر) توزیع شدند (۱۰ قطعه ماهی به ازای هر تانک). دوره‌ی سازگاری ماهیان جهت سازگار شدن با شرایط جدید به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش در خود تانک‌ها به طول انجامید. در طول دوره‌ی سازگاری، روزانه ۳ بار در روز در ساعات ۸:۰۰، ۱۴:۰۰ و ۱۸:۰۰ و به میزان سیری با غذای پلت تجاری ماهی کپور (تهیه شده از شرکت ۲۱ بیضاء شیراز، با آنالیز بیوشیمیایی موجود در جدول ۱)، غذادهی انجام شد. در این مطالعه به منظور بررسی مقایسه اثر پودر و عصاره الکلی یونجه بر آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات کبد، ۹ تیمار با ۳ تکرار، برای یک دوره آزمایشی ۸ هفته‌ای، در نظر گرفته شدند.

استفاده در فصل رویشی و قبل از مرحله گلدهی بودند. پس از جداسازی برگ و جوانه‌ها از ساقه، قسمت برگ یونجه‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس با دستگاه آسیاب برقی کاملاً خرد شده و پس از عبور دادن از الک (۰/۵ میکرون) مقداری از آن جهت تهیه جیره‌های حاوی پودر و

مابقی جهت تهیه عصاره الکلی در نظر گرفته شدند. برای مرحله عصاره‌گیری، پودر حاصل به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی)، به اتانول ۹۸ درصد اضافه شد (یک قسمت پودر یونجه و ۹ قسمت اتانول). این مخلوط در ارلن که با فویل آلومینیوم پوشیده شده بود به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه روی دستگاه هات پلیت با دور ۱۲۰ دور در دقیقه (به وسیله مگنت مغناطیسی موجود در آن) در دمای اتاق نگهداری و کاملاً مخلوط گردید. ۸۰ کیلو گیاه یونجه به صورت تازه از مزارع کشاورزی استان خوزستان در فروردین ماه ۱۳۹۳ تهیه و به آزمایشگاه شیلات انتقال داده شد. یونجه‌های مورد پس از اتمام ۷۲ ساعت به وسیله‌ی کاغذ صافی واتمن (شماره۱، سایز چشمه ی ۴۲ میکرون) صاف شد. به منظور صاف کردن و تهیه‌ی عصاره‌ی الکلی خام از قیف بوخنر و پمپ مکنده برای جداسازی ذرات ریز آن استفاده شد. برای اطمینان از گرفته شدن تمام ذرات، عمل صاف کردن در ۳ مرحله انجام شد. سپس مایع بدست آمده در روتاری (۳۰ درجه سانتی گراد) با ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا الکل آن تقطیر و از آن جدا گردد. پس از تقطیر، عصاره‌ی گیاه مورد نظر در شیشه‌های در بسته اتوکلاو شده ریخته شد و اطراف شیشه‌ها فویل آلومینیومی پیچیده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (Falamarzi, 2015). آنالیز بیوشیمیایی پودر یونجه، طبق روش کار استاندارد (AOAC, 2000) صورت پذیرفت. همچنین اجزای مختلف عصاره الکلی یونجه (جدول ۲) و مقادیر هر کدام از آنها در ترکیب توسط گاز کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری جرمی، توسط آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز و بر اساس پروتکل مشخص تعیین گردید (Mousavi, 2009; Falamarzi, 2015). نتایج مربوط به آنالیز GC/Mass در جدول ۲ آمده است. بر این اساس بیش-ترین میزان ترکیبات موجود در عصاره یونجه به ترتیب مربوط به فیتول (۲۱/۲۷ درصد)، اسید لینولئیک (۱۶/۷۸ درصد)، اسیدپالمیتیک (۱۲/۹۱ درصد)، موم اینوزیتول (۱۱/۳۱ درصد)، نئوفیتادین (۷/۸۶ درصد) و اسید اولئیک (۷/۴۰) می‌باشد. همچنین بر اساس آنالیز بیوشیمیایی صورت گرفته روی پودر یونجه، میزان پروتئین، ۲۳/۹۷ درصد، میزان لیپید، ۴/۲۲ درصد، میزان کربوهیدرات، ۸/۱۸ درصد، میزان خاکستر، ۸/۴۷ درصد بود.

جیره‌های غذایی مطالعه حاضر که شامل ۹ تیمار با سه تکرار بودند به روش زیر تهیه شدند.

- تیمار ۱ (۱ درصد عصاره یونجه) (E1) :۸۸۰ گرم جیره پایه +۱۰ گرم عصاره یونجه + ۱۱۰ گرم پودر سنگ+ ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۲(۲ درصد عصاره یونجه) (E2) : ۸۸۰ گرم جیره پایه +۲۰ گرم عصاره یونجه + ۱۰۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۳(۳ درصد عصاره یونجه) (E3) : ۸۸۰ گرم جیره پایه +۳۰ گرم عصاره یونجه + ۹۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۴(۴ درصد عصاره یونجه) (E4) : ۸۸۰ گرم جیره پایه +۴۰ گرم عصاره یونجه + ۸۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۵(۳ درصد پودر یونجه) (P3) : ۸۸۰ گرم جیره پایه +۳۰ گرم پودر یونجه + ۹۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۶(۶ درصد پودر یونجه) (P6) : ۸۸۰ گرم جیره پایه +۶۰ گرم پودر یونجه + ۶۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۷(۹ درصد پودر یونجه) (P9) : ۸۸۰ گرم جیره پایه +۹۰ گرم پودر یونجه + ۳۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۸(۱۲درصد پودر یونجه) (P12) :۸۸۰ گرم جیره پایه +۱۲۰ گرم پودر یونجه + ۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب
- تیمار ۹ (شاهد): ۸۸۰ گرم جیره پایه + ۱۲۰ گرم پودر سنگ + ۵۰۰ سی‌سی آب

جدول ۱: ترکیب (آنالیز بیوشیمیایی) جیره پایه مورد استفاده (تهیه شده از کارخانه ۲۱ بیضاء شیراز)
Table 1: Biochemical analysis of basic diet prepared from 21-Biza Company-Shiraz)

Nutrients	Rate
Moisture (%)	**10**
Crude Protein (%)	**32-38**
Digestible Energy (Cal/Kg)	**3600-3800**
Crude fibre (%)	**5.5**
Lipid (%)	**5-8**
Ash (%)	**12**
TVN (mg/100g)	**50**
Lysin (%)	**1.6-1.8**
Metionin (%)	**0.42-0.48**
Treonin (%)	**1.25-1.5**

جدول ۲: ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره یونجه

Table 2: Chemical composition of alfalfa extract

No.	Ingredient Name	Percent	No.	Ingredient Name	Percent	No.	Ingredient Name	Percent
1	Phytol	21.27	22	2-Methyl-4-ethoxycarbonyl-isoxazole	0.37	43	propane 2,2 dimethoxy	0.20
2	Linoleic acid	16.78	23	2-Amylfuran	0.36	44	Loliolide	0.20
3	Palmitic acid	12.91	24	8-Oxa-9-ketotricyclo [5/3/1/0(2,6)]undecane	0.36	45	3-Heptadecanone	0.19
4	Mome inositol	11.31	25	Cyclopentadecanolide	0.34	46	Propylamine	0.19
5	Neophytadiene	7.86	26	Phenic acid	0.33	47	2-Methyl-2-butenolide	0.19
6	Oleic acid	7.40	27	Benzeneacetonitrile, 3-fluoro	0.33	48	Methyl pentadecyl ether	0.18
7	2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol	2.69	28	Beta-Ionone	0.31	49	2-Vinyl-9-[/beta/-d-ribofuranosyl]hypoxanthine	0.18
8	Cyclopentadecanone, 2-hydroxy	1.16	29	Methyl vinyl maleimide	0.30	50	Methyl /beta/-d-galactopyranoside	0.17
9	Phytene	1.09	30	1,7-dimethyl-2-oxo-7-(4'-formyl-butyl)-norbornane	0.30	51	Decanoic acid	0.16
10	4,6-Di-O-methyl-/alpha/-d-galactose	1.08	31	2-Dodecanon	0.30	52	2,6,6-trimethyl-4-hydroxy-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde	0.15
11	Skatole	1.06	32	Propane, 2,2-diethoxy	0.29	53	1,2-diaza-1-phenyl-3-methyl-4-(3,4,5-trimethoxy phenyl carbonyl amino methyl)-cyclopent-3-en-5-one	0.15
12	3-Mercapto-2(1H)-pyridinone	0.92	33	5-Methyl-1-heptene	0.28	54	Monoolein	0.15
13	Phenol, 2-methoxy-4-vinyl	0.90	34	Methyl heptadecyl ketone	0.27	55	Cyclohepta siloxane, tetradeca methyl	0.15
14	Octoil	0.70	35	N-(4-Fluorophenyl)-N-(4-nitrophthalimidomethyl)benzamide	0.27	56	7-Hexadecenoic acid, methyl ester	0.14
15	Trans-(+)-Carveol	0.67	36	1-(3,6,6-Trimethyl-1,6,7,7a-tetrahydrocyclopenta[c]pyran-1-yl)ethanone	0.27	57	1,2-Epoxy-1-vinylcyclododecene	0.13
16	Propiophenone	0.63	37	Undecene,10-methyl	0.26	58	Toluene	0.13
17	Dihydroactinidiolide	0.58	38	1,3,12-Nonadecatriene	0.24	59	Dodecamethylcyclohexasiloxane	0.12
18	2-Ethyl-3-methylmaleimide	0.56	39	2-ethylbutanoate	0.24	60	1,3,12-Nonadecatriene	0.12
19	4-methyl-7-methylethenyl-3,8-dioxatricyclo[5/1/0(2-4)] octane	0.47	40	Hexadecane	0.24	61	Bis(trimethylsiloxy)acetone	0.12
20	Styrene epoxide	0.47	41	Farnesyl acetone	0.21			
21	Tributyl amine	0.41	42	Tetradecane	0.21			

به منظور تهیه جیره‌های غذایی، ابتدا ۸۸۰ گرم غذای تجاری ماهی کپور از شرکت ۲۱ بیضا شیراز که توسط آسیاب پودر شده بود، در ظرفی ریخته شد. سپس پودر یا عصاره‌ی یونجه به همراه آب به غذای ماهی اضافه شد و ۳۰ دقیقه توسط همزن تجاری به هم زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد و آب، عصاره یا پودر با تمامی ذرات غذا مخلوط شود. از پودر سنگ به عنوان پر کننده استفاده گردید. سپس غذا کاملاً مخلوط گردید و مخلوط حاصل، دو بار توسط چرخ گوشت چرخ شد تا پلیت‌های غذایی یکنواخت حاصل شود. سپس جیره‌های غذایی به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند تا کاملاً خشک شوند. جیره‌های غذایی پس از خشک شدن، در کیسه‌های نایلونی بسته‌بندی، نام‌گذاری و تا زمان استفاده در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آنالیزهای تقریبی بیوشیمیایی جیره غذایی آزمایشی با استفاده از روش استاندارد (AOAC, 2000) با سه تکرار انجام گردید. میزان رطوبت به وسیله خشک‌کردن نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تعیین گردید. میزان پروتئین خام با ضرب محتوی نیتروژن نمونه در ۶/۲۵ و به روش کجلدال اندازه‌گیری گردید. میزان چربی خام توسط n-بوتیل الکل استخراج و به روش کروماتوگرافی تعیین گردید. میزان فیبر خام توسط هضم اسیدی و هضم قلیایی و سوزاندن نمونه‌های خشک شده در دمای ۵۵۰ درجه به مدت ۲ ساعت محاسبه گردید. خاکستر بوسیله سوزاندن نمونه‌ها در کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت محاسبه شد و در نهایت میزان انرژی کل بر اساس حاصلضرب ۰/۰۱۷، ۰/۰۳۹۸ و ۰/۰۲۳۷ مگاژول در کیلوگرم به‌ترتیب برای کربوهیدرات، چربی و پروتئین محاسبه گردید (جدول ۳).

در طول آزمایش ماهی‌ها ۳ بار در روز در ساعات ۸، ۱۳ و ۱۷ به میزان سیری تغذیه شدند. به منظور توزیع یکنواخت غذا، کاهش تلاطم آب، افزایش زمان ماندگاری غذا در آب و همچنین آرام شدن ماهی، از ۵ دقیقه قبل از شروع غذادهی، هوادهی در تانک‌ها قطع می‌گردید و پس از ۲۰ دقیقه از شروع غذادهی مجدداً هوادهی انجام می‌گرفت. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب، روزانه توسط دستگاه مولتی‌متر مدل (AZ instrument corp. AZ8731) بررسی شد و مقادیر درجه-حرارت، اکسیژن محلول و pH در آب به ترتیب ۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵±۷ میلی‌گرم در لیتر و ۱±۷/۵، ثبت گردید. در طول مدت آزمایش (۸ هفته) روزانه ۱۰٪ حجم آب تعویض می‌گردید.

جدول ۳: آنالیز بیوشیمیایی تقریبی جیره‌های غذایی آزمایشی مختلف ماهیان کپور معمولی جوان

Table 3: Proximate biochemical analysis of experimental diets used for juveniles of Cyprinus carpio

Nutrients	Experimental Treatments								
	Control	P3	P6	P9	P12	E1	E2	E3	E4
Protein (%)	31.50±1.01	34.12±1.10	34.85±1.51	35.17±1.72	36.05±1.63	32.20±1.56	32.35±1.69	33.07±1.73	**33.17±1.51**
Lipid (%)	4.86±0.51	4.92±0.51	5.78±0.60	5.86±0.59	5.88±0.66	4.56±0.07	4.80±0.040	6.02±0.26	**6.09±0.06**
Carbohydrate (%)	9.35±0.57	9.33±0.23	9.88±0.05	9.49±0.08	9.78±0.15	9.16±0.10	9.90±0.04	9.65±0.18	**9.90±0.04**
Ash (%)	17.33±0.39	16.83±0.54	15.45±0.73	15.97±0.38	16.46±0.38	17.12±0.13	17.05±0.75	16.30±0.89	**16.72±0.61**
Moisture (%)	36.95±0.55	34.78±1.77	34.02±2.86	33.49±2.09	31.82±1.65	36.94±1.80	35.88±2.23	34.95±1.54	**34.11±0.90**
Tot. Grand Energy (MJ/Kg)	15.68±0.15	15.96±0.23	16.34±0.12	16.36±0.20	16.29±0.26	15.73±0.09	15.68±0.19	16.17±0.32	**16.08±0.21**

* کلیه نتایج به صورت میانگین±خطای معیار بیان شده‌اند.

** عدم وجود حروف در جدول، نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵).

در انتهای دوره آزمایش، یک روز قبل از نمونه‌برداری غذادهی قطع شد. سپس ماهی‌های هر تانک پس از خروج از تانک، در مجاورت اوژنول (شرکت زردبند- ایران) (۴۰ppm)، بیهوش و پس از آسان کشی، مورد کالبدگشایی قرار گرفتند. ابتدا محوطه شکمی توسط تیغه اسکالپل از ناحیه شکمی از جلوی مخرج تا زیر سرپوش آبششی برش داده شد سپس کل لوله گوارش آنها از مری تا مخرج جدا گردید. جهت دقت در سنجش آنزیمی، چربی‌های جداره روده جدا گردیده و محتویات غذای باقیمانده از روده خارج شده و چند بار بوسیله سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد (Lemieux et al., 1999; Farhoudi et al., 2013). سپس، نمونه‌های یک سوم ابتدایی روده درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری قرار داده شد و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافته و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کبد ماهیان پس از تشریح، توزین شده و پس از قرار گرفتن درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری، در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مراحل جداسازی روده ماهیان روی یخ و در داخل یونولیت حاوی یخ انجام گردید.

پس از خروج نمونه‌های روده از فریزر، بلافاصله توزین و بلافاصله در مجاورت یخ، توسط هموژنایزر دستی (مدل IKA®T18 basic ساخت کشور آمریکا) هموژن شدند (Rungruangsak-Torrissen et al., 2006). سپس به نسبت ۱ به ۹ (w/v) محلول بافر هموژن (۱۰۰ Tris-HCL میلی مولار و ۰/۱ EDTA مولار و تریتون X-100 ۰/۱ درصد، ۷/۸ pH) روی نمونه ریخته شد (Mohammadi Azarm et al., 2012) و عمل هموژن نمودن نمونه‌ها انجام و کامل گردید. نمونه‌های هموژن شده، به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل (K System centurion, UK) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۶۲۰ g (۶۲۰۰rpm) سانتریفیوژ شدند و در نهایت از مایع رویی به دست آمده برای سنجش آنزیمی استفاده شد. نتایج به دست آمده برای فعالیت‌های آنزیمی بر حسب میکرومول سوبسترا که در دقیقه به ازای میلی‌گرم وزن تر بافت و میلی‌گرم پروتئین آزاد می‌شود (U/mg protein/min) بیان گردید.

جهت سنجش غلظت پروتئین کل نمونه‌ها از کیت تشخیصی کمی پروتئین کل شرکت پارس آزمون و به روش بیوره استفاده گردید (Thomas, 1998; Johnson et al., 1999; Borges et al., 2004).

برای سنجش آنزیم آلکالین فسفاتاز از کیت تشخیص کمی شرکت پارس آزمون و به روش فتومتریک استفاده شد (Fischbach and Zawta, 1992). فعالیت آنزیم آمیلاز براساس روش فتومتریک آنزیمی-کالریمتری با استفاده از کیت تشخیص کمی α-Amylase شرکت پارس آزمون سنجیده شد (Kruse-Jarres et al., 1989; Hohenwallner et al., 1989). فعالیت آنزیم لیپاز با استفاده از کیت تولیدی شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Mindray BS-200, China) قرائت و محاسبه گردید (Tietz and Shuey, 1993). برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش Worthington (1991) و N- بنزوئیل-L- آرژنین اتیل استر (BAEE: N- Benzoyl- L- arginin ethyl ester) به عنوان سوبسترا استفاده شد. برای سنجش آنزیم کیموتریپسین، از روش Hummel (1959) و N-بنزوئیل- L- تیروزین اتیل استر (BTEE: N- Benzol- L- tyrosine ethyl ester) به عنوان سوبسترا استفاده گردید.

جهت محاسبه میزان گلیکوژن کبد از روش Lu et al. (1970) و همچنین به منظور سنجش میزان لیپید کبد از روش تعدیل یافته Hara و Radin (1978) استفاده شد.

آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPPS نسخه ۱۶ و رسم نمودارها در محیط Excel ۲۰۱۳ انجام شد. داده‌ها در نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد (Mean±SE) بیان شده است. نرمال بودن داده‌ها به وسیله آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و مقادیر گلیکوژن و لیپید کبد بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) ارزیابی شد و در صورت معنی-دار بودن توسط پس‌آزمون Duncan، جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت ($P<0/05$). در این آزمون، تیمارهای مختلف به عنوان عامل مستقل و شاخص‌های مورد بررسی به عنوان عامل وابسته در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

جدول ۴، نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) شامل آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز، آلکالین فسفاتاز، تریپسین و کیموتریپسین تحت تاثیر سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه در جیره غذایی در پایان دوره آزمایشی را نشان می‌دهد.

جدول ٤: نتایج میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه (میانگین± خطای استاندارد، n=3)

Table 4: Results of gastric enzymes levels of Cyprinus carpio fed by different levels of alfalfa meal and extract (Mean±Standard Error, n=3)

Experimental Treatments	Gastric Enzymes				
	Trypsin (U.min^{-1}/mg protein)	Chymotrypsin (U.min^{-1}/mg protein)	Alkaline Phosphatase (U/mg protein)	Lipase (U/mg protein)	**α-Amylase (U/mg protein)**
Control	160.94±9.01^{bc}	0.04±0.006^{cd}	250.08±18.65^{cd}	2.51±0.55^{b}	**388.17±38.27^{b}**
E1	159.78±14.60^{bc}	0.056±0.005^{c}	244.08±28.79^{cd}	2.96±0.45^{b}	**488.81±82.56^{b}**
E2	181.53±9.21^{b}	0.048±0.005^{c}	388.97±34.69^{b}	3.49±0.46^{b}	**550.97±9598^{ab}**
E3	185.54±7.57^{b}	0.083±0.004^{ab}	452.84±28.18^{a}	6.21±0.96^{a}	**674.74±61.57^{a}**
E4	252.05±19.98^{a}	0.100±0.001^{a}	257.19±23.67^{cd}	3.38±0.48^{b}	**541.50±25.51^{ab}**
P3	187.18±8.31^{b}	0.053±0.001^{c}	280.35±21.28^{bc}	3.68±1.12^{b}	**441.20±42.35^{b}**
P6	138.24±5.70^{c}	0.085±0.006^{ab}	189.11±21.56^{d}	4.82±0.70^{ab}	**425.06±18.58^{b}**
P9	132.47±11.47^{c}	0.062±0.002^{c}	197.32±13.03^{d}	6.19±0.84^{a}	**405.61±26.51^{b}**
P12	159.89±8.96^{bc}	0.030±0.004^{d}	187.70±19.36^{d}	4.30±0.40^{ab}	**447.56±35.26^{b}**

*** وجود حروف غیرهم‌نام در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است (P<۰/۰۵).**

طبق نتایج جدول ۴، بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز مربوط به تیمار E3 (۶۷۴/۷۴±۶۱/۵۷ U/mg protein) و کمترین میزان مربوط به تیمار شاهد (۳۸۸/۱۷±۳۸/۲۷U/mg protein) می‌باشد (P<۰/۰۵). در جدول ۴، دو تیمار E3 و P9 به‌ترتیب با مقادیر ۶/۲۱±۰/۹۶ و ۶/۰±۱۹/۸۴ (برحسب U/mg protein) بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز و تیمار شاهد (۲/۵۱±۰/۵۵ U/mg protein) کمترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز را به خود اختصاص داده‌اند (P<۰/۰۵).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمار E3 مشاهده شد (۴۵۲/۸۴±۲۸/۱۸ U/mg protein) که دارای اختلاف معنی‌دار با همه تیمارهای آزمایشی می‌باشد (P<۰/۰۵) و همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز مربوط به تیمار P12 به میزان U/mg protein ۱۸۷/۷۰±۱۹/۳۶ می‌باشد.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم تریپسین در تیمار E4 با مقادیر U/mg protein ۲۵۲/۰۵±۱۹/۹۸ مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی بود (P<۰/۰۵). کمترین میزان فعالیت آنزیم تریپسین

در تیمار P9 با مقدار ۱۳۲/۴۷±۱۱/۴۷ U/mg protein مشاهده گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین مربوط به تیمار E4 (۰/۱۰۰±۰/۰۰۱ U/mg protein) بود که دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد (U/mg protein ۰/۰۰۶±۰/۰۴) بود (P<۰/۰۵). کمترین میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین به‌طور معنی‌داری در تیمار P12 و تیمار شاهد مشاهده گردید.

جدول ۵، نتایج آنالیز ترکیبات کبد ماهیان جوان کپور معمولی شامل گلیکوژن و لیپید کل تحت تاثیر سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه را به‌ترتیب براساس µg/g tissue و mg/g tissue در انتهای دوره آزمایش نشان می‌دهد.

جدول ۵: نتایج سنجش میزان گلیکوژن و لیپید کبد ماهی کپور معمولی جوان تغذیه شده با سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه (میانگین± خطای استاندارد، n=3)

Table 5: Results of glycogen and lipid measurement in the liver of young common carp fed different levels of alfalfa powder and alcoholic extract (mean ± standard error, n=3).

Experimental Treatments	Liver Parameters	
	Glycogen (µg/g tissue)	Lipid (mg/g tissue)
Control	607.01±101.23^{e}	**81.17±3.67^{b}**
E1	1524.60±64.99^{d}	**80.75±5.24^{b}**
E2	1917.99±138.38^{c}	**89.86±4.45^{b}**
E3	3383.35±192.13^{a}	**93.21±2.17^{b}**
E4	3263.01±194.56^{a}	**80.08±6.88^{b}**
P3	1962.28±188.61^{c}	**82.90±0.02^{b}**
P6	1996.35±58.65^{c}	**100.84±6.22^{b}**
P9	2550.63±140.49^{b}	**146.51±6.05^{a}**
P12	2501.02±212.62^{b}	**72.99±4.46^{b}**

*** وجود حروف غیر هم نام در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی است (P>۰/۰۵).**

همان طور که نتایج جدول ۵، نشان می‌دهد بیشترین و کمترین میزان گلیکوژن کبد به ترتیب مربوط به تیمار E3 (µg/g tissue۱۹۲/۱۳±۳۳۸۳/۳۵) و تیمار شاهد (µg/g tissue ۱۰۱/۲۳±۶۰۷/۰۱) می‌باشد. همچنین بین تمامی تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین بیشترین میزان لیپید کبد مربوط به تیمار P9 (mg/g tissue ۶/۰۵±۱۴۶/۵۱) می‌باشد که با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری داشت (P<۰/۰۵). کمترین میزان لیپید کبد مربوط به تیمار P12 بود.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت آنزیم‌های گوارشی و جذب مواد مغذی از جمله فرآیندهای سوخت و سازی مهم هستند که یک ذخیره انرژی پایدار را تأمین می‌کنند که منجر به افزایش نرخ رشد ماهیان می‌شود (Blier et al., 1997; Nya and Austin, 2011). میزان بالای ترشح و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی به معنای دسترسی به مواد مغذی در ماهی به منظور رشد و فرآیندهای سوخت و سازی است. بنابراین در دسترس بودن مواد مغذی می‌تواند از طریق وجود فعالیت آنزیمی محدود شود (Krogdahl et al., 1994). شکسته

شدن مواد مغذی بزرگ زنجیره به زیر واحدهای کوچک قابل جذب در مجرای گوارشی جانوران تا حد زیادی وابسته به سطح آنزیم‌های موجود است (Awad et al., 2012).

عمدتاً گیاهان دارویی حاوی آلکالوئیدها، فلاوونوئیدها، رنگ-دانه‌ها، ترکیبات فنولی، ترپنوئیدها، استروئیدها و اسیدهای چرب ضروری (امگا ۹ و امگا ۶) بوده، به همین علت از این تولیدات به عنوان یک ماده مغذی، اشتهاآور و تحریک‌کننده رشد در تغذیه آبزیان استفاده می‌شود (Sivaram et al., 2004). همچنین در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، باعث افزایش رشد می‌شوند (Yu et al., 2008).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که با افزایش درصد عصاره یونجه، فعالیت آنزیم آمیلاز نیز افزایش پیدا می‌کند، ولی استفاده از پودر یونجه در تیمارهای غذایی، هر چند دارای روند افزایشی بر میزان آنزیم آمیلاز بود، اما این تاثیر، از نظر آماری، معنی‌دار نبود. از دلایل احتمالی افزایش میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، می توان به وجود مقادیری از آنزیم آمیلاز در گیاه یونجه اشاره نمود (Zhang et al., 2009). وجود ترکیباتی نظیر Mome inositol در عصاره یونجه (جدول ۲) در کنار مقادیر کربوهیدرات یونجه می‌تواند، منجر به تحریک ترشح آلفا-آمیلاز و فعالیت در روده گردد (Ravi kumar et al., 2002). هم‌راستا با تحقیق حاضر Kolivand (2020) گزارش دادند که استفاده از عصاره یونجه در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به طور معنی‌داری ($P<0/05$)، باعث افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در روده می‌شود که این امر بهبود شرایط هضم و گوارش غذا را به دنبال داشته است. هم راستا با تحقیق حاضر، Zhang et al. (2009) گزارش دادند که استفاده از یونجه به طور معنی‌داری ($P<0/05$) باعث افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز، در روده و هپاتوپانکراس می‌شود که این امر بهبود شرایط هضم و گوارش غذا را به دنبال دارد. همچنین Platel et al. (2002) گزارش دادند که عصاره آبی گیاهانی مانند گشنیز، زردچوبه، فلفل قرمز، زیره سبز، زنجبیل و پیاز فعالیت آنزیم مترشحه از پانکراس را افزایش می‌دهند. در تحقیقی همراستا با تحقیق حاضر، Falamarzi et al. (2016)، افزایش شاخص‌های رشد و بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای در ماهی کپور معمولی را در تیمارهای تغذیه‌ای با عصاره و پودر یونجه، گزارش نمودند که می‌تواند دلیلی بر افزایش امکان استفاده از منابع کربوهیدراتی جیره و تاثیر بر شاخص‌های رشد و تغذیه در این ماهی باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم لیپاز داشت. هر چند افزایش فعالیت آنزیم لیپاز به غیر از تیمار E3 و تیمار P6، در سایر تیمارها معنی‌دار نبود. این افزایش در میزان فعالیت آنزیم لیپاز احتمالاً به دلیل وجود اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA: Mono unsaturated fatty acid) مانند اسید اولئیک، اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA: Poly unsaturated fatty acid) مانند لینولئیک اسید و اسیدهای چرب اشباع نظیر پالمیتیک اسید در این گیاه می‌باشد (جدول ۲)، که باعث تحریک ترشح آنزیم لیپاز توسط پانکراس شده است. Kolivand (2020)، نشان داد که افزودن عصاره الکلی یونجه به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، باعث افزایش آنزیم لیپاز نسبت به تیمار شاهد گردید، هرچند این افزایش معنی‌دار نبود. یافته‌های حاصل از مطالعه Zoltwska et al. (2001) ارتباط نزدیکی بین فعالیت آنزیم لیپاز و مقدار و نوع اسیدهای چرب موجود در جیره غذایی نشان داد. ترکیب افزودنی-های گیاهی و یا گیاهان دارویی به عنوان محرک گوارش در نظر گرفته می‌شوند، که بیشترین اثر تحریکی را به ویژه روی ترشح صفرا، خروج اسیدهای صفراوی و فعالیت آنزیم‌های پانکراسی دارند (Platel et al., 2002).

در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم لیپاز در تیمارهای P12 و E4، به ترتیب نسبت به تیمار P9 و E3، با کاهش مواجه شد که احتمالاً به دلیل حضور مهارکننده آنزیم لیپاز در یونجه می‌باشد (Falamarzi, 2015; Schneeman, 1978)، در واقع در مقادیر پایین عصاره و پودر، به علت پایین بودن مهارکننده‌های لیپازی، اثر منفی عصاره مشهود نبوده، اما در مقادیر بالای پودر و عصاره، این عامل با اتصال به آنزیم لیپاز در روده، از هیدرولیز تری‌گلیسریدها به مونوگلیسریدها و اسیدهای چرب در روده جلوگیری کرده و جذب لیپید را کاهش می‌دهد (Schneeman, 1978; Southgate, 1973).

در رابطه با فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمارهای E2 و E3 (تیمارهای ۲ و ۳ درصد عصاره الکلی یونجه) مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی بود. Kolivand (2020)، نشان داد که افزودن عصاره الکلی یونجه به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان منجر به افزایش فعالیت این آنزیم می‌گردد، که با نتایج اثرات عصاره در این تحقیق همخوانی دارد. همچنین در مطالعه انجام شده توسط Heidari et al. (2014)، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ماهی انگشت قد تیلاپیای نیل تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی زیره سبز افزایش یافت. Rukkumani et al. (2002) نشان دادند که اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA)، در جیره می‌توانند باعث افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روده شوند. با توجه به وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع در عصاره یونجه

(جدول ۲؛ Abdel Azeez, 2008)، از یک طرف و مقادیر بالای فسفر در عصاره یونجه از طرف دیگر، می‌توان این دو عامل را به عنوان عوامل اصلی افزایش آنزیم آلکالین فسفاتاز در تیمارهای عصاره، بیان نمود (Sknoberg et al., 1997). در تیمارهای پودر یونجه، میزان فعالیت این آنزیم نسبت به تیمارهای عصاره، روند کاهشی داشته است، هرچند نسبت به تیمار شاهد، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید و نتوانست تغییری در میزان این آنزیم ایجاد کند. کاهش و یا به بیان دیگر عدم تغییر آلکالین فسفاتاز در تیمارهای جیره حاوی پودر یونجه می‌تواند به دلیل ترکیبات ضد تغذیه‌ای در پودر یونجه باشد که جلوی فعالیت یا ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز را می‌گیرد (Soto and Mitchell, 1960; Francis et al., 2005).

با دستیابی به کارآمدترین سطوح غذایی می‌توان در میزان فعالیت و بیان آنزیم‌های گوارشی از جمله تریپسین و کیموتریپسین تغییر ایجاد کرد، که این تغییر خود سبب بهبود هضم پروتئین و بهبود فرآیند رشد می‌گردد (Kuz'mina and Golovanova, 2004). در مطالعه حاضر افزایش فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین، در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره یونجه، نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید که با نتایج Kolivand (2020) روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، همخوانی دارد. همچنین Mohamed et al. (2018)، افزایش آنزیم تریپسین را در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با عصاره گیاه کرفس (*Apium graveolens*) از خانواده Apiaceae گزارش نمودند. وجود ترکیب Skatole در عصاره یونجه (۱/۰۶ درصد، جدول ۲) که از اسیدآمینه تریپتوفان مشتق می‌شود، می‌تواند با اثر روی مکانیسم‌های تنظیمی (فیدبکی) باعث افزایش ترشح پانکراس و افزایش فعالیت آنزیم تریپسین و متعاقب آن آنزیم کیموتریپسین شود (Xu et al., 2002). بنابراین افزایش میزان فعالیت آنزیم کیموتریپسین در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی عصاره یونجه می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم تریپسین در تیمارهای یاد شده، نیز باشد (Lemieux et al., 1999). در جیره‌های حاوی سطوح پودر یونجه، نه تنها روند افزایشی فعالیت این دو آنزیم پروتئازی مشاهده نشد، بلکه، در برخی سطوح، روند کاهشی نیز مشاهده گردید. احتمالا این اثرات کاهشی، به علت وجود عامل محدود کننده آنزیم تریپسین در پودر یونجه می‌باشد که این عامل در روده به آنزیم تریپسین متصل و موجب غیر فعال شدن آن می‌شود (Ferket and Middleton, 1999). Narvaez-Vasquez et al. (1992)، به بیان ژن مهارکننده پروتئازی در برخی گیاهان پرداخته و بیان ژن را در تنباکو و یونجه مشاهده نمودند. همچنین Mc-Gurl et al. (1995) وجود ترکیبات مهارکننده تریپسین را در دانه، ریشه و حتی برگ‌های یونجه ثابت نمودند. وجود ترکیبات آنتی‌تریپسین در گیاه یونجه (Francis et al., 2005) و احتمالاً عدم ورود آنها به عصاره طی مراحل عصاره-گیری، می‌تواند دلیلی بر اثر متفاوت پودر و عصاره یونجه بر میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین باشد.

بیشترین میزان گلیکوژن کبد در تیمارهای E3 و E4 مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل و سایر تیمارهای آزمایشی بود ($P<0/05$). روند افزایشی که در میزان گلیکوژن کبد در تیمارهای تغذیه شده با پودر و عصاره یونجه مشاهده شد، احتمالا به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی خصوصا آنزیم آمیلاز (جدول ۴) و افزایش هضم و جذب کربوهیدرات‌ها از دستگاه گوارش و ورود آنها به کبد باشد. یکی از دلایل احتمالی افزایش گلیکوژن خون، تاثیر ترکیبات فلاوونوئیدی موجود در عصاره و پودر گیاه یونجه بر ترشح انسولین باشد که باعث جذب بیشتر گلوکز از روده (Falamarzi, 2015) و افزایش تبدیل گلوکز به گلیکوژن در کبد و افزایش ذخیره آن در کبد می‌گردد (Guyton and Hall, 2006). همچنین احتمالاً وجود کلسیم، پتاسیم و اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع موجود در گیاه یونجه نیز در تحریک ترشح انسولین و افزایش ذخایر گلیکوژن کبد دخیل باشند (Jamel et al., 2010).

در انتهای دوره آزمایش، بیشترین میزان لیپید کبد در تیمار P9 مشاهده شد و اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی داشت. به‌طورکلی اعتقاد بر این است که حجم بالایی از لیپید جیره غذایی می‌تواند در هپاتوسیت‌ها رسوب کند که این پاسخ فیزیولوژیک به ورود لیپید اضافی به بدن بوده و موجب بالا رفتن انرژی بدن می‌شود (Sahraeian et al., 2009). هرچند در این تحقیق، در میزان لیپید جیره های غذایی، تفاوت معنی داری وجود ندارد (جدول ۱)، افزایش میزان لیپید کبد در تیمار P9، احتمالاً به دلیل تأثیر یونجه در تحریک ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس می‌باشد. زیرا انسولین میزان مصرف گلوکز خون توسط بسیاری از بافت‌های بدن را افزایش می‌دهد و به‌طور خودکار به عنوان حفظ کننده لیپید عمل می‌کند (Roy et al., 2003). هرچند براساس تحقیقات صورت گرفته وجود ترکیبات لیپیدی و یا پیش سازهای لیپیدها (نظیر اسیدهای چرب غیراشباع موجود در گیاه یونجه) در جیره و یا مقادیر بالای گلوکز و ترکیبات کربوهیدراتی می‌تواند منجر به افزایش ذخیره لیپید در کبد و افزایش میزان لیپید کبد شود، با این وجود تغییرات بارزی در میزان لیپید کبد در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید که احتمالاً ترکیبات موجود در عصاره با تأثیر بر فرآیندهای گلیکونئوژنز منجر به تغییر در ترکیبات

کبد و احتمالاً تغییر در محل ذخیره لیپید شده‌اند. با بررسی نتایج فعالیت آنزیم لیپاز در این تحقیق، مشاهده می‌گردد که روند تغییرات لیپید کبد، با تغییرات فعالیت آنزیمی لیپاز در روده همخوانی دارد، که می‌توان دلیل اصلی تغییرات در سطوح لیپید کبد را، تغییرات فعالیت لیپاز روده‌ای بیان نمود.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

براساس نتایج تحقیق حاضر، افزودن پودر و خصوصا عصاره یونجه به جیره غذایی ماهی کپور معمولی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و افزایش لیپید و گلیکوژن کبد در سطوح معینی می‌گردد. جیره حاوی ۳ درصد عصاره یونجه، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و میزان گلیکوژن کبد داشت. همچنین جیره حاوی ۹ درصد پودر یونجه باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم لیپاز و میزان لیپید کبد گردید. بنابراین براساس نتایج این تحقیق دلایل افزایش رشد و بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای ماهی کپور معمولی، در تحقیق Falamarzi et al. (2016)، می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی خصوصا در تیمارهای دریافت کننده سطوح عصاره الکلی یونجه (خصوصا عصاره یونجه به میزان ۳ درصد)، باشد. با توجه به وجود ترکیبات ضدتغذیه‌ای در پودر یونجه از یک سو و احتمالا حذف آنها در روند عصاره گیری از سوی دیگر، استفاده از عصاره یونجه حداکثر تا سطح ۳ درصد در جیره غذایی ماهی کپور معمولی، به عنوان یک مکمل رشد و تغذیه توصیه می شود.

٦. تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، به علت حمایت مالی و تامین تجهیزات مورد نیاز انجام این تحقیق، اعلام می دارند.

Refrences:

Abdel-Azeez, S., 2008. Cumin. – In: Parthasarathy VA, Chempakam B, and Zachariah TJ. (eds.), *Chemistry of Spices*. CAB International, Oxfordshire, p. 242–259. doi: 10.1079/9781845934057.0211

Abowei, J. and Ekubo, A., 2011. Some Principles and Requirements in Fish Nutrition. *British Journal of Pharmacology and Toxicology, 2*, pp.163-178. https://maxwellsci.com/print/bjpt/v2-163-178.pdf

AOAC (Association of Official Analytic al Chemists). 2000. *Official methods of analysis AOAC international methods* 934.01,988.05,920.39 and 942.05. Arlington, VA, USA:AOAC International.

Applebaum, S. and Holt, G., 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Biology, 142*, pp. 1159-1167. doi: 10.1007/s00227-003-1041-8.

Asadi, T., Zanguee, N., Mousavi, S.M., Yavari, V. and Batvandi, Z., 2015. Antibacterial effects of alcoholic extract of *Zingiber officinale* on some pathogenic bacteria in aquatic animals. *Journal of applied Ichthyology, 3*(2), pp. 59-68 (In Persian). http://jair.gonbad.ac.ir/article-1-82-fa.html

Asadi, T., Zanguee, N., Mousavi, S.M. and Yavari, M., 2016. Effects of ginger extract on some hematological and serological parameters and growth performancein *Barbus sharpeyi*. *Journal of Marine Science and Technology. 15*(1), pp. 100-110. (In Persian). doi: 10.22113/jmst.2016.9570

Awad, E., Austin, D. and Lyndon, A.R., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture, 388*, pp. 193-197. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.008.

Baruah, K., Norouzitallab, B., Debnath, D., Pal, A.K. and Sahu, N.P., 2008. Organic acids as non-antibiotic nutraceuticals in fish and prawn feed. *Aquaculture Health International, 12*, pp. 4-6. http://hdl.handle.net/1854/LU-829419

Blier, P., Bergeron, and Montigny, C.D., 1997. Selective activation of postsynaptic 5-HT 1A receptors induces rapid antidepressant response. *Neuro Psychopharmacology, 16*(5), pp. 333-338. doi: 10.1016/S0893-133X(96)00242-4

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry, 30*(1), pp. 21-25. doi: 10.1007/s10695-004-5000-1

Buchtova, H., Svobodova, Z., Kocoour, M. and Velisek, J., 2011. Chemical composition of fillets of mirror cross breeds common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno, 79*, pp. 551-557. doi: 10.2754/avb201079040551

Chakrabarti, I., Gani, A., Chaki, K., Sur, R. and Misra, K., 1995. Digestive enzymes of 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: 112*, pp. 162–177. doi: 10.1016/0300-9629(95)00072-F

Chakrabarti, R., Rathore, R.M. and Kumar, S., 2006. Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquaculture Nutrition, 12*, pp. 35–43. doi: 10.1111/j.1365-2095.2006.00379.x

Craig, S. and Helfrich, L.A., 2002. Understanding fish nutrition, Feeds, and Feeding. *Virginia Cooperative Extension*, pp.1-9. doi: https://vtechworks.lib.vt.edu/server/api/core/bitstreams/24c04f50-8d2f-4b2d-9f8a-9ec3684537a1/content

De Silva, S.S. and Anderson, T. A., 1995. *Fish nutrition in aquaculture*. Chapman and Hall, London, p. 319.

Falamarzi, Z., 2015. Effects of meal and Alcoholic Extract of Alfalfa (*Medicago sativa*) on Growth, Nutrition and Biochemical Characteristics of Young Carp (*Cyprinus carpio*). *Masters Thesis in Khoramshahr University of Marine Science and Technology*, 67 Pp. (In Persian).

Falamarzi, Z., Mousavi, S.M., Zakeri, M. and Zanguee, N., 2016. Effects of different levels of Alfalfa meal and alcoholic extract on growth, nutrition, biochemical carcass composition and some serum biochemical parameters of Common Carp, *Fisheries Journal (Iranian Journal of Natural Resources), 69*(2), pp. 235-251. (In Persian). doi: 0.22059/jfisheries.2016.59854

FAO. 2008. *Aquaculture development. 3. Genetic resource management*. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries. Rome, 125p. doi: https://www.fao.org/fishery/en/publications/63508

FAO. 2013. *The state of world Fisheries and aquaculture (SOFIA) FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture organization of the united nations* Rome, Italy. Available from: http//www.fao.org/docrep/013/i1820e/ i1820e01

Farhoudi, A., Abedian Kenari, A.M., Nazari, R.M. and Makhdoomi, Ch., 2013. Changes of digestive enzymes activity in common carp (*Cyprinus carpio*) during larval ontogeny. *Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12*(2), pp. 320-334. http://jifro.ir/article-1-992-en.html

Ferket, P.R. and Middleton, T.F., 1999. Effect of level of acidification by phosphoric acid, storage temperature, and length of storage on the chemical and biological stability of ground poultry mortality carcasses. *Poultry Science, 80*(8), pp. 1154-1163. doi: 10.1093/ps/80.8.1144

Fischbach, F. and Zawta, B., 1992. Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. *Klin Lab, 38*, pp. 555-561. doi: https://www.clin-lab-publications.com/assets/contents/1992.pdf

Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2005. Quillaja saponis-a natural growth promoter for fish. *Animal Feed Science and Technology, 121*, pp.147-157. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.02.015

Guyton, A.C. and Hall, J.E., 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 1152p.

Hara, A. and Radin, N., 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry, 90*(1), pp. 420-426. doi: 10.1016/0003-2697(78)90046-5

Heidari, L., Mousavi, S.M. and Javadzadeh, N., 2014. Investigation of the effect of *Cumin cyminum* on digestive enzymes of *Oreochromis niloticus*. First National Conference on Sustainable Marine Development, Khorramshahr, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Iran.

Hohenwallner, W., Stein, W., Hafkenscheid, J., Kruse-Jarres, J., Kaiser, C., Hubbuch, A. and Klein, G., 1989. Reference Ranges for α-Amylase in Serum and Urine with 4,6-Ethylidene-(G7)-1-4-nitrophenyl-(G1)-α-, D-maltoheptaoside as substrate. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *27*(2), pp. 97-102. doi: 10.1515/cclm.1989.27.2.97

Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37*, pp. 1393-1399. PMID: 14405350.

Jamel, M.S., Arkan, B.M. and Maad, A.B., 2010. Effect of Aqueous Extract of Ginger (*Zingiber officinale*) on Blood Biochemistry Parameters of Broiler. *International Journal of Poultry Science*, *9*(10), pp. 944-947. doi: 10.3923/ijps.2010.944.947

Jiang, H.E., Li, X., Ferguson, D.K., Wang, Y.F., Liu, C.J. and Li, C.S., 2007. The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years BP), NW China and its medicinal implications. *Journal of Ethnopharmacology, 113*, pp. 409-420. doi: 10.1016/j.jep.2007.06.020

Jobling, M., 1995. Simple indics for the assessment of the influences of social environment on growth performance, exemplified by studies on article charr. *Aquaculture International, 3*(1), pp. 60-65. doi: 10.1007/BF00240922

Johari, H., Sharifi, A., Ansari, N., Hosseini, M., Amiri, F., 2009. The effect of hydroalcoholic extract of ginger on body weight, testicular weight and spermatogenesis in male rats undergoing cyclophosphamide chemotherapy. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 17*(5), pp. 365-374. (In Persian). http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-996-en.html

Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and Silverman, L.M., 1999. Proteins. In: Burtis, C.A., Ashwood E.R. (Eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd edition Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp. 477-540.

Jun-Sheng, L., Jian-lin, L. and Ting-Ting, W., 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis auratus*). *Fish Physiology and Biochemistry B, 132*, pp. 295-303. doi: 10.1007/s10695-006-9106-5

Khare, C. P., 2007. *Indian medicinal plants: an illustrated dictionary*. Springer Science and Business Media. 900p. doi: 0.1007/978-0-387-70638-2

Kiantaheri, M., 2015. Using different levels of Alfalfa (meal and extract) as an immunostimulant in Common Carp (*Cyprinus carpio*). Master's degree thesis, Khorramshahr University of Marine Sceince and Technology, (In Persian).

Kolivand, A., 2020. Effects of different dietary levels of Medicago sativa on growth performance, survival and immune parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. PhD's degree thesisKhorramshahr University of Marine Sceince and Technology, (In Persian).

Krogdahl, A., Lea, T.B. and Olli, J.J., 1994. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, 107*(1), pp. 215-219. doi: 10.1016/0300-9629(94)90296-8

Kruse-Jarres, J., Kaiser, C., Hafkenscheid, J., Hohenwallner, W., Stein, W., Bohner, J., Klein, G., Poppe, W. and Rauscher, E., 1989. Evaluation of a new alpha-amylase assay using 4.6-ethylidene-(G7)-1-4-nitrophenyl-(G1)-Alpha-D-maltoheptaoside as substrate. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry, 27*(2), pp. 103-113. PMID: 2787387

Kuz'mina, V. and Golovanova, I., 2004. Contribution of prey proteinases and carbohydrates in fish digestion. *Aquaculture, 234*, pp. 347-360. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.11.011

Kuz'mina, V. and Smirnova, Y.G., 1992. Distribution of alkaline phosphatase activity along the length of the intensine of freshwater teleosts. *Journal of Ichthyology, 32*, pp. 1-9. PMID: 4209935

Lan, C.C., and Pan, B.S., 1993. *In-vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture, 109*(1), pp. 59-70. doi: 10.1016/0044-8486(93)90486-I

Lemieux, H., Blier, P.U. and Dutil, J.D., 1999. Do digestive enzymes set physiological limitation growth rate and food conversion efficiency in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry, 20*, pp. 293-303. doi: 10.1023/A:1007791019523

Lin, J., Smith, J.R. and Dilday, R.H., 1999. Comparison of allelopathic rice and bensulfuron for aquatic weed control in rice. *Weed Science Society of America, Abstract, 33*, pp.170.

Lu, S., Russel, J.C. and Taylor, A.W., 1970. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology, 28*, pp. 234-236. doi: 10.1152/jappl.1970.28.2.234

Luper, S., 1998. A review of plants used in the treatment of liver disease. *Alternative Medicine Review, 3*, pp. 40-2. PMID: 9855566

Mc-Gurl, B., Mukherjee, S., Kahn, M. and Ryan, C.A. 1995. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) CDNAs from alfalfa leaves (*Medicago sativa* Var Venemal): the expression of ATI genes in response to wounding and soil micro-organisms. *Plant Molecular Biology, 27*, pp. 995-1001. doi: 10.1007/BF00037026

Mohammadi Azarm, H., Abedian Kenari, A.M. and Hedayat, M., 2012. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein Fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. *Aquaculture Research, 44*, pp.634-644. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03068.x

Mohamed, G.A., Amhamed, I.D., Almabrok, A.A., Barka, A.B.A., Bilen, S. and Elbeshti, R.T., 2018. Effect of celery (*Apium graveolens*) extract on the growth, haematology, immune response and digestive enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Science and Technology Bulletine. 7*(2), pp. 51-59. doi: 10.33714/masteb.457721

Mousavi, S.M. 2009. Study of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Antifungal Effects of Some essensial oils on Rainbow Trout Egg (*Oncorhynchus mykiss*) and Comparison with Malachite Green. PhD thesis, University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, (In Persian).

Mousavi, S.M., Mirzargar, S.S., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Omidbaigi, R., Khosravi, A., Bahonar, A., 2012. Antifungal and toxicity effects of new combined essential oils on *Onchorhynchus mykiss* in comparison with malachite green, *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, 4*(2), pp.1-8. doi: 10.22067/veterinary.v4i2.9457

Najafi, Z., Ouraji, H., Yeganeh, S. and Keramat, A., 2018. Effect of lcoholic extract of alfalfa (*Medicago sativa*) on growth performance, food intake, body composition and some serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sceince, 27* (5), pp. 1-9. (In Persian). http://isfj.ir/article-1-2046-en.html

Narvaez-Vasquez, J., Orozco-Cardenas, M.L. and Ryan, C.A., 1992. Differential expression of a chimeric Camv-tomato proteinase inhibitor I gene in leaves of transformed nightshade, tobacco and alfalfa plants. *Plant Molecular Biology, 20*, pp. 1149-1157. doi: 10.1007/BF00028901

Nya, E.J. and Austin, B., 2011. Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydriphila* after the dietary application of garlic. *Fish and Shellfish Immunology, 30*(3), pp. 845-850. doi: 10.1016/j.fsi.2011.01.008

Pinarosa, A., Rossella, B., Aldo, T., Cesare, V. and Antonio, R., 2006. Antimicrobial Activity of Saponins from *Medicago sp*. Structure-Activity Relationship. *Phytotherapy Research, 20*, pp. 454-457. doi: 10.1002/ptr.1876

Platel, K., Rao, A., Saraswahi, G. and Srinivasan, K., 2002. Digestive stimulant action of three indian spice mixes in experimental rats. *Die Nahrung, 46*, pp. 394-398. doi: 10.1002/1521-3803(20021101)46:6<394::AID-FOOD394>3.0.CO;2-D

Ravi kumar, N., Satyanaray Reddy, J., Copikrishnan, G., and Solomon, K., 2002. GC-MS Determination of Bioactive constiuents of *Cycas beddomi* cones, *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *3*(3), pp. 344-350.

Roy, S.S., Mukherjee, M., Bhattacharya, S., Mandal, C.N., Kumar, L.R., Dasgupta, S., Bandyopadhyay, I. and Wakabayashi, K., 2003. A new cell secreting insulin. *Endocrinology, 144*, pp. 1585-1593. doi: 10.1210/en.2002-220350

Rukkumani, R., Sri Balasubashini, M., Vishwanathan, P. and Menon, V.P., 2002. Comparative effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on alcohol and polyunsaturated fatty acid induced hyperlipidermia, *Pharmacological Research, 46*(3), pp. 257-264. doi: 10.1016/S1043-6618(02)00149-4

Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andersen, L., Berg, A. and Waagbo, R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Fish Physiology and Biochemistry, 32*, pp. 7-23. PMID: 20035474

Sabapathy, U. and Teo, L., 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish. *Sigantus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Fish Biology, 42*, pp.595-602. doi: 10.1111/j.1095-8649.1993.tb00362.x

Sahraeian, M.R. Yavri, V., Maremazi, J.Gh., Mohammad Kar, N. and Romiani, A., 2009. The effect of different levels of dietary energy on liver growth and histological indices of *Acanthopagrus latus*. *Journal of Marine Science and Technology*. *8*(1), pp. 11-22. (In Persian). doi: 20.1001.1.20088965.1390.10.4.3.9

Saravana Bhavan, P., Manicham, N. and Radhakrishnan, S., 2012. Influence of herbal greens, Murraya koenigii, *Coriandrum sativum* and *Menthe arvensis* on growth performance of the fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Research Journal of biotechnology, 7*(4), pp. 149-157.

Schneeman, B.O., 1978. Effect of plant fiber on lipase, trypsin and chymiotrypsin activity. *Journal of Food Sceince, 43*, pp. 634-635. doi: 10.1111/j.1365-2621.1978.tb02372.x

Silva, J.F., EspositoS, T.S., Marcuschi, M., Ribeiro, K., Cavalli, R.O., Oliveira, V. and Bezerra, R.S., 2011. Purification and partial characterization of a trypsin from the processing waste of the silver mojarra (*Diapterus rhombeus*). *Food Chemistry, 129*, pp. 777-782. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.019

Sivaram, V., Babu, M.M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass S. and, Marian, M.P., 2004. Growth andimmune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture, 237*, pp. 9-20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.03.014

Sknoberg, D.I., Yogev, L., Hardy, R.W. and Dong, F.M., 1997. Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture, 157*(1), pp. 11-24. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00141-5

Soto, J.R. and Mitchell, H.L., 1960. The trypsin inhibitor of alfalfa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. *8*: 393–395.

Southgate, D.A.T., 1973. Fibre and the other unavailable carbohydrates and their effects on the energy value of the diet. *Proceedings of the Nutrition Society, 32*, pp. 131. doi: 10.1079/pns19730030

Souza, A.A.G., Amaral, I.P.G., Santo, A.R.E., Carvalho, L.B., Jr. and Bezerra, R.S., 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry, 1000*, pp. 1429-1434. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.016

Steiner, T. 2006. The potential benefits of natural growth promoters. *Feed Technology, 10*(2), pp. 26-28. doi: 10.1007/978-94-017-9810-5_20

Sunde, J., Taranger, G. and Rungruangsak-Torrisson, K., 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry, 25*, pp. 335-345. doi: 10.1023/A:1023233024001

Talei, G.R. and Meshkatalsadat M.H., 2007. Antibacterial activity and chemical constitution of essential oils of Thymus ppersicus and Thymus eriocalyx from West of Iran. Pak. *Journal of Biological Sciences, 10*(21), pp. 3923-3926. doi: 10.3923/pjbs.2007.3923.3926

Thomas, L., 1998. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st edition frankfurt: TH-book verlagsgesellchaft: 1727 pp.

Tietz, N. and Shuey, D., 1993. *Lipase in serum- the elusive enzyme: an overview*, Clinical Chemistry, 39(5), pp. 746-756. PMID: 8485865

Ugwumba, A.A.A., 1993 Carbohydrases in the digestive tract of the African bony-tongue *Heterotis niloticus* (Osteoglossidae). *Hydrobiologia, 257*, pp. 95-100. doi: 10.1007/BF00005949

Worthington, C.C., 1991. *Enzyme manual related Biochemical*. 3th Edition. Freehold, New jersey, pp. 212-215.

Xiong, D., Xie, C., Zhang, H. and Liu, H., 2009. Digestive enzymes along digestive tract of a carnivorous fish *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 95, pp.* 56-64. doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00984.x

Xu, Z.R., Hu, C.H. and Wang, M.Q., 2002. Effects of fructooligosacharide on conversion of L-tryptophan to Skatole and indole by mixed populations of Pig Fecal bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology, 48*, pp. 83-89. doi: 10.2323/jgam.48.83

Yu, M.C., Li, Z.J., Lin, H.Z., Wen, G.L. and Ma, S., 2008. Effects of dietary Bacillus and medicinal herbs on the growth, digestive enzyme activity and serum biochemical parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei. Aquaculture International, 16*, pp. 471-480. doi: 10.1007/s10499-007-9159-1

Zhang, G.F., Yang, Z.B., Wang, Y., Yang, W.R., Jiang, S.Z. and Gai, G.S., 2009. Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status and serum metabolites of broiler chicken, *Poultry Science, 88*, pp. 2159-2166. doi: 10.3382/ps.2009-00165

Zoltwska, K., 2001. Purification and characterization of α-amylase the intestine and muscle of *Ascaris saum* (Nematoda). *Acta Biochimica Polonica, 48*, pp. 763-774. PMID: 11833785