

بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی سفید غربی در مراحل زیستی مختلف

سعید ضیایی نژاد^{۱*}، دونالد لاوت^۲ و علی آبرومند^۱

دریافت: ۱۳۹۵/۸/۵ | پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۵ | چاپ: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

^۱گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی خاتم‌الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، دانشگاه نیوجرسی، اوپننگ، آمریکا

*مسئول مکاتبات: ziaeinejad@bkatu.ac.ir

چکیده. مطالعات آنتوژنیک دستگاه گوارش یکی از مطالعات پایه‌ای و مهم در بحث تغذیه آبزیان پرورشی است. در این تحقیق نمونه‌های میگوی سفید غربی در مراحل مختلف تکاملی (از ناپلی ۱ تا پست لارو ۱۲۰) برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج، در تمام مراحل تکاملی فعالیت آنزیم‌های تریپسین، آمیلاز و لیپاز وجود داشت. نتایج نشان داد که اوج فعالیت‌ها برای تمام آنزیم‌ها در مراحل لاروی در اواخر مرحله زوآ (Z3) اتفاق افتاد و فعالیت‌های کمی در مرحله متامورفوز وجود داشت. در طول مرحله تکامل پست لاروی، فعالیت آمیلاز و لیپاز افزایش یافت درحالی‌که تریپسین تا هفته هجدهم پست لاروی ثابت ماند. این تغییرات در فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مراحل مختلف زیستی ممکن است هم منعکس‌کننده تغییری تکاملی در سنتز آنزیم یا اثر ثانویه ناشی از تغییر عملکرد و اندازه نسبی روده در طی تمایز باشد.

واژه‌های کلیدی. آمیلاز، تریپسین، عصارة آنزیمی، لیپاز

Digestive enzyme activity of western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different life stages

Saeed Ziaeinejad^{1*}, Donald Lovett² & Ali Abroumand¹

Received 26.10.2016/ Accepted 16.12.2017/ Published 19.03.2018

¹Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, Behbahan Khatam-alanbia University, Behbahan, Iran

²Department of Biology, The College of New Jersey, Ewing, New Jersey, America

*Correspondent author: ziaeinejad@bkatu.ac.ir

Abstract. Gastrointestinal ontogenetic studies constitute one of the basic and important investigations related to the nutrition of aquatic animals. In this investigation, specimens of the western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different developmental stages (from nauplius 1 to postlarvae 120) were assayed for the activities of digestive enzymes. According to the results, at all developmental stages, trypsin, amylase, and lipase enzymes were found to be active. In addition, the peak activities of all enzymes were revealed to occur during the late zoea larval stages (Z3). On the other hand, minimum activities were observed to occur at metamorphosis. During the postlarval developmental stages, amylase and lipase activities increased steadily, whereas the trypsin activity was more or less constant up to the eighteenth week. In conclusion, ontogenetic change in digestive enzyme activity may reflect either a developmentally cued change in enzyme synthesis or a secondary effect of change in the function and relative size of the midgut during its differentiation.

Keywords. amylase, enzyme extracts, lipase, trypsin

مقدمه

یکی از مسائل مهم در پرورش میگو، همانند آبزیان دیگر، پرورش لارو است. از مشکلات مهم در پرورش لارو میگو می‌توان به نیازهای غذایی آن اشاره کرد. مطابق مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که بازماندگی بالا در این مرحله می‌تواند بقا و رشد را در مراحل بالاتر تحت تأثیر قرار دهد؛ بنابراین، فراهم کردن محیط مناسب جهت رشد سریع لارو بسیار حائز اهمیت است. یکی از تحقیقات پایه‌ای که می‌تواند به مشخص کردن نیازهای غذایی میگو کمک کند موضوع مطالعات انتوژنیک دستگاه گوارش است (Del Toro *et al.*, 2011). عموماً در پرورش لارو میگو از زمان تغذیه فعال تا مرحله متامورفوز از غذاهای زنده نظیر میکرو جلبک، روتیفر و ناپلی آرتمیا استفاده می‌شود (Naegel & Rodríguez-Astudillo, 2004)، اما تأمین غذای زنده غالباً با صرف هزینه‌های بسیار، محدودیت دسترسی، تفاوت در ارزش غذایی و گاهی خطر شیوع بیماری همراه است (Hernández & Murueta, 2009). برای همین منظور، در دهه گذشته محققان بسیاری در تلاش بوده‌اند تا جایگزین مناسبی برای غذای زنده بیابند. پیشنهاد این محققان غذای دستی بوده است. اما شرط موفقیت در استفاده از غذای دستی بلوغ اندام‌های گوارشی و داشتن فعالیت آنزیمی مناسب برای عمل هضم و جذب دانسته شده است. در مطالعات کیفی که درباره آنزیم‌های گوارشی لارو سخت‌پوستان انجام شده نیز مشخص شده است لارو میگوی پنائیده برخلاف گونه‌های دیگر در مراحل لاروی از بلوغ نسبی فیزیولوژیک لوله گوارش بهره‌مند است و می‌تواند به همراه غذای زنده از غذای فرموله شده نیز استفاده و نیازهای غذایی خود را تأمین کند (Lovett & Felder, 2009; Hernández & Murueta, 1990). در آبزیان، مانند جانوران دیگر، فرایند گوارش نشان‌دهنده الگوهای تکاملی مرتبط با ریخت‌شناسی دستگاه گوارش و بازتابی از سازش‌های تکاملی با جیره‌های غذایی خاص و تغییر نیازهای غذایی است. بنابراین، تحلیلی جامع از تغییرات انتوژنیک در مراحل مختلف زندگی می‌تواند برای پرورش مناسب گونه، برنامه‌ریزی‌های تغذیه‌ای و نیز فرمولاسیون غذای خشک ضروری باشد. در این میان، یکی از مهم‌ترین مراحل پرورش میگو، مرحله تفریخ تا جذب کیسه زرده و شروع تغذیه خارجی است (Wyban *et al.*, 1999).

بسیاری از محققان معتقدند که فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت تأثیر سن یا مراحل تکاملی قرار دارد و دانستن زمان ترشح آنزیم‌های اصلی درگیر در گوارش از زمان شروع تغذیه با غذای خشک جهت رشد سریع و بهتر لارو ضروری است (Lovett & Felder, 1990). به علاوه، مطالعه تغییرات بیوشیمیایی طی مراحل تکامل شاخصی جهت تعیین ماده مصرفی برای تأمین انرژی به دست می‌دهد. این خود در تضمین نیازهای تغذیه‌ای و در نتیجه بهبود تغذیه مؤثر است. زمان بلوغ اندام‌های گوارشی و مجموعه فعالیت‌های فیزیولوژیکی آنها نیز ممکن است تحت تأثیر عواملی نظیر چرخه زندگی و استراتژی تولیدمثل گونه، کیفیت آب، کیفیت غذا و شرایط دسترسی به آن و دما قرار داشته باشد. به علاوه، افزایش سن نیز ممکن است باعث افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی شود (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008).

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی سفید غریبی، نمونه‌گیری از مرکز تکثیر و پرورش میگوی شهرستان بندر لنگه در مراحل مختلف زیستی میگو شامل N1, N5, Z1, Z3, M1, M3, PL1, PL3, PL6, PL10, PL14, PL20, PL30, PL50 و PL80 صورت گرفت. میگوها ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند تا دستگاه گوارش آنها از مواد غذایی به‌خوبی تخلیه شود. پس از نمونه‌برداری سریعاً در مجاورت یخ قرار گرفتند تا با به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی کالبدگشایی آنها صورت گیرد. سپس روده آنها خارج شد (در مراحل لاروی کل نمونه هموزن و برای سنجش آنزیمی استفاده شد) و بلافاصله در دمای انجماد °C ۷۰ - نگهداری شدند (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Kuzmina *et al.*, 2011).

تهیه عصاره آنزیمی

برای این کار نمونه‌ها با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند و به نسبت ۱ به ۹ (w/v) با بفرسفات هموزن شدند (Rungruangsak *et al.*, 2002). سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در نهایت، از مایع رویی (عصاره آنزیمی) برای سنجش آنزیمی استفاده شد.

سنجش غلظت پروتئین تام محلول

پروتئین تام نمونه‌های هموزن شده به روش Bradford (1976)

دانکن) وجود یا فقدان اختلاف آماری بین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد تحت بررسی قرار گرفت.

نتایج

آنزیم تریپسین

همانگونه که از نتایج به‌دست‌آمده درخصوص فعالیت ویژه آنزیم تریپسین مشخص است (شکل‌های ۱ الی ۳)، با عبور از مرحله ناپلی فعالیت آنزیم تریپسین به‌شدت افزایش می‌یابد تا به بیشترین مقدار خود در مرحله Z3 (زوای ۳) برسد. سپس تا مراحل ابتدایی پست لاروی مجدداً کاهش می‌یابد و بعد دوباره شاهد افزایش فعالیت این آنزیم در دستگاه گوارش میگوی سفید غربی تا مراحل جوانی هستیم (شکل ۱).

آنزیم آمیلاز

درخصوص فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز در دستگاه گوارش میگوی سفید غربی، نتایج نشان داد که همانند آنزیم تریپسین، با عبور از مرحله ناپلی و رسیدن به مرحله زوآ، شاهد افزایش سریع فعالیت این آنزیم هستیم و بعد از مرحله Z3، فعالیت این آنزیم دوباره کاهش می‌یابد. اما برخلاف آنزیم تریپسین، فعالیت آنزیم آمیلاز از شروع مرحله پست لاروی به‌شدت افزایش می‌یابد (شکل ۲).

آنزیم لیپاز

الگوی روند تغییرات فعالیت آنزیم لیپاز در دستگاه گوارش میگوی سفید غربی نیز همانند الگوی آنزیم آمیلاز است. با رسیدن به مرحله زوآ شاهد افزایش سریع فعالیت این آنزیم هستیم که اوج فعالیت لیپاز در مراحل لاروی در مرحله زوای ۳ نشان داده شد. بعد از مرحله Z3، فعالیت این آنزیم دوباره کاهش می‌یابد، اما از شروع مرحله پست لاروی به‌شدت افزایش می‌یابد (شکل ۳).

بحث

همان‌گونه که در بخش مرور منابع ذکر شد، درخصوص فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مراحل مختلف زیستی، میگوی سفید غربی تاکنون مطالعه کاملی صورت نگرفته است. از آنجایی که این میگو غیر بومی و وارداتی است، هنوز بسیاری از زوایای زیستی و تغذیه‌ای آن در محیط پرورش ایران ناشناخته مانده است. بنابراین، فراهم

سنجیده شد. به این منظور، از آلبومین سرم گاوی (BSA) (Sigma) به‌مثابه استاندارد استفاده شد (Ziaeinejad *et al.*, 2006).

سنجش فعالیت آنزیم تریپسین

برای تعیین فعالیت آنزیم پپسین از سوبسترای N-بنزوئیل-L-آرژنین اتیل استر (BAEE) استفاده شد. BAEE تحت تأثیر آنزیم تجزیه و به - بنزوئیل-L-آرژنین تبدیل می‌شود که در طول موج ۲۵۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت نوری انجام می‌شود. واحد فعالیت آنزیم پپسین برحسب واحد BAEE بر میلی‌لیتر آنزیم در یک دقیقه از فرمول زیر محاسبه شد (Worthington, 1991):

$$\text{فاکتور وقت (20)} \times \{\text{حباب شامه} - \text{حباب نمونه (253 nm)}\} = \frac{\text{فعالیت آنزیمی (U)}}{\text{میزان پروتئین در نمونه (mg)} \times 10}$$

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

برای تعیین فعالیت آلفا-آمیلاز از نشاسته به‌مثابه سوبسترا استفاده شد. نشاسته تحت اثر آنزیم تجزیه می‌شود و مالتوز تولید می‌کند که از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل سنجش است (Bernfeld, 1995). واحد فعالیت آلفا-آمیلاز، برحسب میکرو مول مالتوز آزادشده تحت اثر آنزیم در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین از طریق فرمول ذیل محاسبه شد (Bernfeld, 1995; Worthington, 1991):

$$\text{فاکتور وقت} \times \text{میزان مالتوز آزاد شده (umol)} = \frac{\text{فعالیت آنزیمی (U)}}{\text{میزان پروتئین در نمونه (mg)} \times \text{مدت زمان آنکوباسیون (دقیقه)}}$$

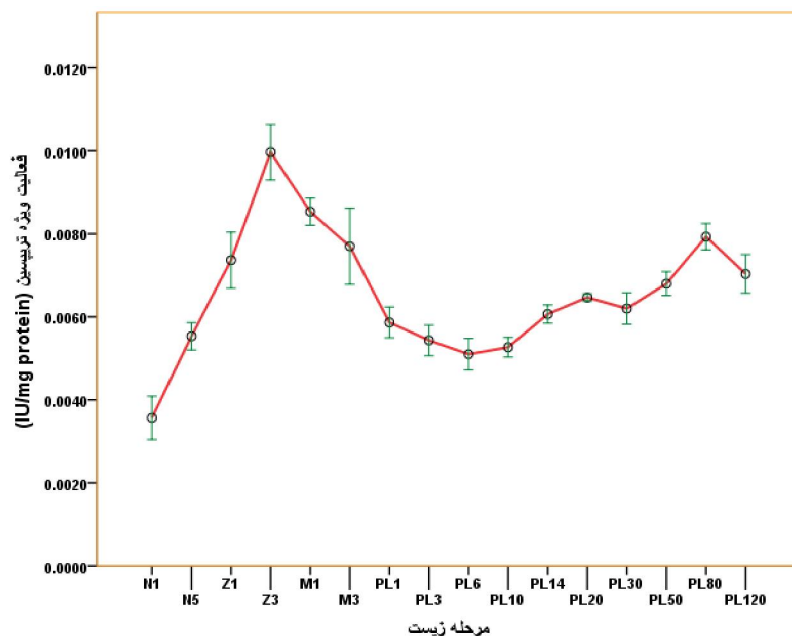
سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

برای سنجش آنزیم لیپاز از روش (Worthington 1991) و رابطه ذیل استفاده شد. در این روش از امولسیون روغن زیتون به-منزله سوبسترا استفاده شد. بدین منظور، روغن زیتون آزمایشگاهی (Sigma) تهیه شد (Ziaeinejad *et al.*, 2006).

$$\text{فعالیت آنزیمی (U)} = \frac{\text{آمدت زمان آنکوباسیون (180 * 50 * میلی لیتر بلانک شامه - میلی لیتر بلانک نمونه)}}{\text{میزان پروتئین در نمونه (mg)}}$$

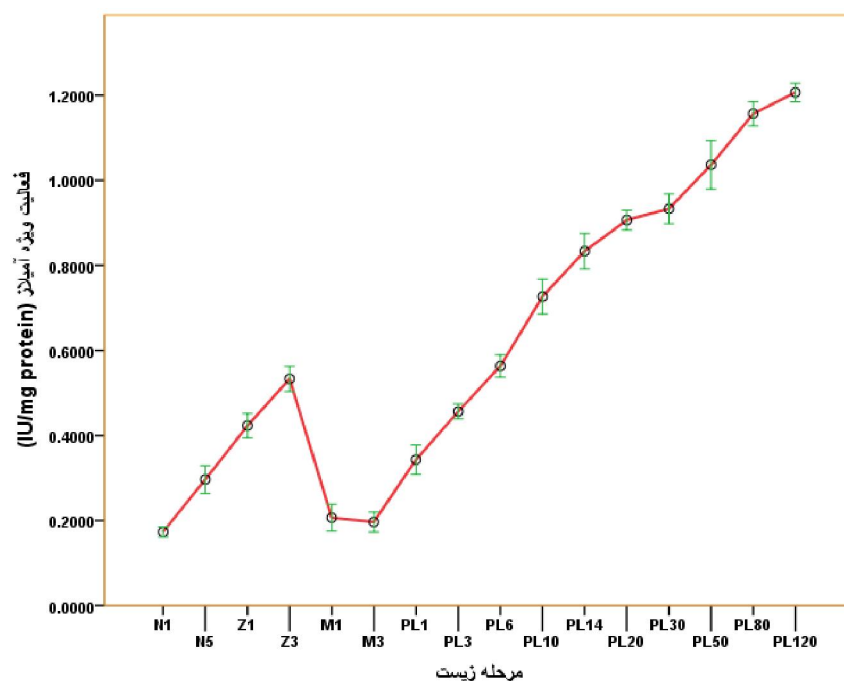
روش تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور تحلیل آماری داده‌ها ابتدا با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال‌بودن داده‌ها بررسی شد و سپس با استفاده از آزمون (One - way ANOVA) (آزمون



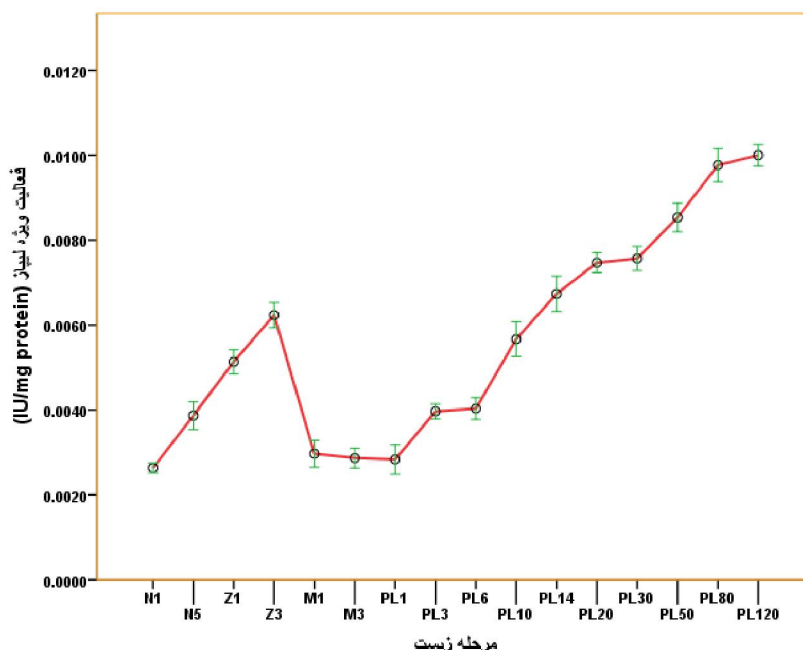
شکل ۱- نمودار تغییرات فعالیت ویژه آنزیم تریپسین در مراحل مختلف زیستی میگوی سفید غربی (N: ناپلی، Z: زوآ، M: مایسیس، PL: پست لارو). برای هر مرحله تکاملی میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است، N=10.

Fig. 1. Changes in the specific activity of trypsin enzyme at different developmental stages of western shrimp (N: Nauplius, Z: Zoea, M: Mysis, PL: Postlarva). Mean $\pm$ SE indicated for each developmental stage, N=10.



شکل ۲- نمودار تغییرات فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز در مراحل مختلف زیستی میگوی سفید غربی (N: ناپلی، Z: زوآ، M: مایسیس، PL: پست لارو). برای هر مرحله تکاملی میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است، N=10.

Fig. 2. Changes in the specific activity of amylase enzyme at different developmental stages of western shrimp (N: Nauplius, Z: Zoea, M: Mysis, PL: Postlarva). Mean $\pm$ SE indicated for each developmental stage, N=10.



شکل ۳- نمودار تغییرات فعالیت ویژه آنزیم لیپاز در مراحل مختلف زیستی میگوی سفید غربی. (N: ناپلی، Z: زوآ، M: مایسیس، PL: پست لارو). برای هر مرحله تکاملی میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است، N=10.

Fig. 3. Changes in the specific activity of lipase enzyme at different developmental stages of western shrimp (N: Nauplius, Z: Zoea, M: Mysis, PL: Postlarvae). Mean $\pm$ SE indicated for each developmental stage, N=10.

شروع مرحله پست لاروی، دوباره افزایش می‌یابد. این الگوی تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی در میگوی سفید غربی با الگوهای شرح داده شده برای دیگر گونه‌های ده‌پا (Van Wormhoudt, 1973; Laubier-Bonichon *et al.*, 1977; Lovett & Felder, 1990) مشابه بود. مطالعات آنزیمی در باب گونه‌های *Palaemon serratus*, *P. japonicus*, *P. setiferus* و *Homarus americanus* نشان داده است که فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در مراحل تکاملی با شروع تغذیه فعال پایین است، اما طول مراحل اولیه لاروی در هر چهار گونه افزایش می‌یابد (Van Wormhoudt, 1973; Laubier-Bonichon *et al.*, 1977; Lovett & Felder, 1990).

همان‌گونه که در بخش نتایج اشاره شد، در میگوی سفید غربی در مرحله متامورفوز شاهد کاهش فعالیت آنزیمی هستیم. به نظر می‌رسد این مسئله، همان‌گونه که (Lovett & Felder, 1990) در مورد میگوی *Penaeus setiferus* اشاره کرده‌اند، با تغییرات ساختاری روده در این مرحله از زیست میگو منطبق است. نتایج بررسی آنزیم‌های گوارشی میگوی سفید غربی در این تحقیق نشان داد که در دوره پست‌لاروی افزایش اکثر آنزیم‌ها قابل مشاهده

کردن موقعیت مناسب جهت رشد سریع لارو بسیار حائز اهمیت است. یکی از تحقیقات پایه‌ای که می‌تواند به مشخص کردن نیازهای انرژی میگو کمک کند، موضوع مطالعات انتوژنیک دستگاه گوارش است. از سوی دیگر، در آبزیان، مانند جانوران دیگر، فرایند گوارش نشان‌دهنده الگوهای تکاملی مرتبط با ریخت‌شناسی سیستم گوارش و بازتابی از سازش‌های تکاملی با جیره‌های غذایی خاص و تغییر نیازهای غذایی است. بنابراین، تحلیلی جامع تغییرات انتوژنیک در مراحل مختلف زندگی می‌تواند برای پرورش مناسب گونه، برنامه‌ریزی‌های تغذیه‌ای و نیز فرمولاسیون غذای خشک ضروری باشد (Hernández & Murueta, 2009; Del Toro *et al.*, 2011).

نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی در طی مراحل مختلف زیستی میگوی سفید غربی تغییرات و نوسان‌های درخور توجهی دارد. به‌طوری‌که درخصوص فعالیت اکثر آنزیم‌های تحت بررسی در دستگاه گوارش میگوی سفید غربی، نتایج نشان داد که با عبور از مرحله ناپلی و رسیدن به مرحله زوآ شاهد یک افزایش سریع در فعالیت این آنزیم‌ها هستیم و بعد از مرحله Z3، فعالیت این آنزیم‌ها دوباره کاهش می‌یابد. اما، با

REFERENCES

- Bernfeld, P. 1955. Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in enzymology*. – Academic Press, New York, pp 149-158.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buddington, R.K., and Doroshov, S.I. 1986. Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). – *Camp. Biochem. Physiol.* 83: 233-238.
- Del Toro, M., García-Carreño, F., and Córdova-Murueta, J.H. 2011. Comparison of digestive proteinases in three penaeids. – *Aquacult.* 317: 1-4.
- Hernández, J.C.S., Murueta, J.H.C. 2009. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. – *Aquacult.* 290: 3-4.
- Kuz'mina, V.V., Skvortsova, E.G., Zolotareva, G.V., and Sheptitskiy, V.A. 2011. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish. – *Fish Physiol. Biochem.* 37: 345-353.
- Laubier-Bonichon, A., Van Wormhoudt, A., and Sellos, D. 1977. Croissance larvaire controlee de *Penaeus japonicus* Bate: enzymes digestives et changements de regimes alimentaires. – *Act. Coll. CNEXO* 4: 131-145.
- Lovett, D.L., and Felder, D.L. 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). – *Biol. Bull.* 178: 144-159.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A., and García-Carreño, F.L. 2008. Invertebrate trypsins: a review. – *J. of Comp. Physiol.* 178: 655-672.
- Naegel, L.C., and Rodríguez-Astudillo, S., 2004. Comparison of growth and survival of white shrimp postlarvae (*Litopenaeus vannamei*) fed dried *Artemia* biomass versus four commercial feeds and three crustacean meals. – *Aquacult. Intern.* 12: 573-581.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U. and Venturini, G. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. – *J. Sci. Food Agric.* 82: 644-654.
- Vacquier, V.D., Kern, L.J., and Epel, D. 1971. The appearance of α -amylase activity during gut differentiation in sand dollar plutei. – *Dev. Biol.* 26: 393-399.
- Van Wormhoudt, A. 1973. Variations des proteases, des amylases, et des proteines soluble au cours du developpement larvaire chez *Palaemon serratus*. – *Mar. Biol.* 19: 245-248.
- Worthington, C.C. 1991. *Worthington Enzyme Manual*. – 3rd Edition. Worthington Biochemical Corp. Freehold, New Jersey.
- Wyban, J., Walsh, W.A., and Godin, D.M. 1999. Temperature effect on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp. – *Aquacult.* 138: 267-279.
- است. به نظر می‌رسد این افزایش در فعالیت آنزیمی در طول تکامل پست‌لاروی با تمایز روده به شکل روده بالغ هم‌زمان است. این افزایش هم می‌تواند به علت افزایش فعالیت آنزیمی در بافت هپاتوپانکراس باشد و هم به علت افزایش نسبی اندازه هپاتوپانکراس (Lovett & Felder, 1990). تغییرات آنزیمی مشاهده شده در طول دوره پست‌لاروی نمی‌تواند در اثر تغییر رژیم غذایی باشد، زیرا در این تحقیق رژیم غذایی میگوی‌های تحت بررسی ثابت نگه داشته شد. هم در مهره‌داران (Buddington & Doroshov, 1986) و هم در خارپوستان (Vacquier *et al.*, 1971) افزایش فعالیت آنزیمی در دوره لاروی با تمایز روده هم‌بستگی داشته است.
- در مجموع، می‌توان گفت تغییرات درخور توجهی در فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی سفید غریبی در مراحل مختلف زیستی قابل مشاهده است. این تغییرات در فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مراحل مختلف زیستی ممکن است منعکس کننده تغییر تکاملی در سنتز آنزیم یا اثر ثانویه ناشی از تغییر عملکردها و اندازه نسبی روده در طی تمایز باشد. در نهایت، می‌توان پیشنهاد کرد که در تحقیقات آینده فعالیت آنزیم‌های گوارشی این میگو در ویژگی‌های تغذیه‌ای متفاوت و نیز تحت تأثیر عوامل محیطی گوناگون تحت بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان اعلام می‌دارند.

Ziaeinejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R., and Shakouri, M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. – Aquacult. 252: 516-524.

How to cite this article:

Ziaeinejad, S., Lovett, D. and Abroumand, A. 2018. Digestive enzyme activity of western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in different life stages. – Nova Biologica Rep. 4: 373-379.

ضیایی‌نژاد، س.، لوت، د. و آبرومند، ع. ۱۳۹۶. بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی سفید غربی در مراحل زیستی مختلف. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۳۷۹-۳۷۳.