University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 7, No. 4, 2022, pages: 43-60
DOI: 10.22124/janb.2022.23264.1176

Effects of dietary rainbow trout visceral protein hydrolysate on hematological, immunological and biochemical serum parameters and antioxidant enzymes of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*

Sakineh Yeganeh*[1], Milad Adel[2]

1- Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran

2- Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Iranian Fisheries Research Organization, Agriculture Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran

Received 20 September 2021 Revised 16 December 2021 Accepted 19 December 2021

KEYWORDS

Siberian Sturgeon

Protein hydrolysate

Immune parameters

Antioxidant enzymes

ABSTRACT

This study evaluated the effect of different levels of dietary rainbow trout by-product protein hydrolysate on hematological, immunological and biochemical serum parameters and antioxidant enzymes of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). For this purpose, 300 fish with an average weight of 67 ± 3 g were distributed in 12 tanks and were fed for 56 days with different levels of by-product protein hydrolysate (PH) in 4 treatments including 0 (control), 5g (5PH), 10g (10PH) and 20g (20PH per kg of feed. The highest white blood cell count and hematocrit percentage were observed in the treatments of 10PH and 20PH which was significantly different from those fed with 5PH and control ($p<0.05$). The highest amount of the serum glucose and the lowest amount of triglyceride were obtained in 10PH and 20PH. Fish fed 10PH and 20PH exhibited lower levels of AST and ALP enzymes than the control group ($p<0.05$). Evaluation of serum immune indices showed that there was a significant difference in IgM, C_3, ACH_{50} and serum respiratory burst activity of fish fed 10PH compared to other treatments ($p<0.05$). Also, lysozyme activity, total protein content, complement component C_4 in fish fed with 10PH and 20PH displayed a significant difference with 5PH and control group ($p<0.05$). In this study, serum superoxide dismutase and catalase indices in 10PH and 20PH revealed a significant difference with other treatments ($p<0.05$), in addition to the activity of the glutathione peroxidase ($p<0.05$). Overall, effects of PH, especially 10PH on the examined indices in Siberian Sturgeon were positive and significant.

*Corresponding author: s.yeganeh@sanru.ac.ir; skyeganeh@gmail.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال هفتم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۶۰-۴۳

DOI: 10.22124/janb.2022.23264.1176

"مقاله پژوهشی"

اثر پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در جیره بر فراسنجه‌های خونی، ایمنی، بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های ضد اکسایشی تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) جوان

سکینه یگانه[1*]، میلاد عادل[2]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران

۲- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۸

چکیده

در این مطالعه، اثر پروتئین آبکافتی ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در جیره بر فراسنجه‌های خونی، ایمنی، بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های ضد اکسایشی تاسماهی سیبری جوان (*Acipenser baerii*) بررسی شد. تعداد ۳۰۰ عدد تاسماهی سیبری با وزن اولیه ۳ ± ۶۷ گرم در ۱۲ مخزن با حجم ۲۰۰۰ لیتر توزیع شده و به مدت ۵۶ روز با سطوح مختلف پروتئین آبکافتی (PH) در چهار تیمار شامل سطوح صفر (شاهد)، ۵ (5PH)، ۱۰ (10PH) و ۲۰ (20PH) گرم به ازای هر کیلوگرم جیره غذادهی شدند. بیشترین تعداد گلبول‌های سفید خون و درصد هماتوکریت در تیمار 10PH و 20PH مشاهده شد که با تیمارهای 5PH و شاهد تفاوت معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). بیشترین مقدار گلوکز و کمترین مقدار تری‌گلیسرید در تیمارهای 10PH و 20PH به دست آمد (p<۰/۰۵). ماهیان تغذیه شده با جیره‌های 10PH و 20PH از میزان فعالیت آنزیم‌های AST و ALP کمتری نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند (p<۰/۰۵). ارزیابی شاخص‌های ایمنی سرم نشان داد که میزان IgM، C3، ACH50 و میزان فعالیت انفجار تنفسی سرم تاسماهیان تغذیه شده با جیره 10PH با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، C4 و فعالیت لایزوزیم سرم، در تیمارهای 10PH و 20PH اختلاف معنی‌دار با تیمارهای 5PH و شاهد داشت (p<۰/۰۵). در این بررسی میزان شاخص‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز سرم در تیمارهای 10PH و 20PH اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار 10PH تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). در مجموع، تأثیر پروتئین آبکافتی ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌خصوص در تیمار 10PH بر روی شاخص‌های مورد بررسی در تاسماهی سیبری جوان کاملاً مثبت و معنی‌دار ارزیابی شد.

کلمات کلیدی

تاسماهی سیبری

پروتئین آبکافتی

فاکتورهای ایمنی

آنتی‌اکسیدانی

نویسنده مسئول: s.yeganeh@sanru.ac.ir; skyeganeh@gmail.com

مقدمه

سالانه مقادیر زیادی ضایعات حاصل از فعالیت‌های شیلاتی شامل اندرونه، فلس، پوست و استخوان تولید می‌شوند که حاوی ترکیباتی مثل پروتئین هستند و می‌توان از طریق هیدرولیز آن‌ها با روش‌های شیمیایی (تغییر pH) و آنزیمی (با آنزیم‌های مختلف با منشأ میکروبی، گیاهی و جانوری)، به ترکیبات عملکردی دست یافت (اصغرنیا و همکاران، ۱۳۹۶؛ Ovissipour et al. 2012a, b). در حقیقت، آبکافت آنزیمی تولید ترکیبات عملکردی و فراویژه ناشی از ترکیبات زیست-فعال از محصولات کم‌مصرف و یا فاقد مصرف را امکان‌پذیر می‌کند (Aspmo et al. 2005). غذاهایی که به‌طور مؤثر سبب حفظ سلامتی و بهبود فعالیت‌های حیاتی شده یا کاهش خطر بیماری را موجب می‌شوند، اغلب دارای ترکیبات زیست-فعال هستند (Diplock et al. 1999). پروتئین آبکافتی، روغن ماهی،کیتوزان و فوکوئیدان حاصل از ماهیـان کم-مصرف، صیـد ضمـنی، ضـایعات ماهـیان، سخت‌پوستان و جلبک‌های دریایـی از جمله ترکیبات زیست‌فعال با منشأ دریایی هستند (Alamed et al. 2006).

برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال سه روش استخراج با حلال، آبکافت آنزیمی و تخمیر میکروبی پروتئین‌های غذایی وجود دارد. آبکافت آنزیمی در صنایع غذا و دارو نسبت به دیگر روش‌ها به دلیل عدم ایجاد پسماند حلال آلی و یا مواد سمی شیمیایی در فراورده برتری دارد (Holen et al. 2016). از میان آنزیم‌های مختلف، آنزیم آلکالاز به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین آبکافتی با درجه آبکافت بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر مورد توجه است (Aspmo et al. 2005). پروتئین آبکافتی ماهی، حاصل از تجزیه آنزیمی و تبدیل پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچکتر است که بسته به توالی، وزن مولکولی و خواص شیمیایی پپتیدها، دارای فعالیت زیستی شامل فعالیت ضداکسایشی، خواص ضد میکروبی، کاهش کلسترول و ضد فشار خون بالاست (Samaranayaka and Li-Chan, 2008; Qian et al. 2008; Khaled et al. 2012; Chalamaiah et al. 2012; Xiao and Zhong, 2017). این مواد به دلیل داشتن پپتیدهای زیست‌فعال و کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، قابلیت هضم بالایی دارند و می‌توان آنها را به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان استفاده کرد (Ovissipour et al. 2012a). همچنین، مطالعات قبلی نشان داده است که پپتیدهای حاصل از پروتئین آبکافت‌شده می‌توانند محرک فعالیت ایمنی و محرک ماکروفاژی (بیگانه‌خواری) باشند (Gildberg et al. 1996; Bui et al. 2014). پروتئین آبکافتی محتوی اسیدهای آمینه آزاد و ترکیبی از اسیدهای آمینه است که فعالیت فیزیولوژیک در بدن داشته و به صورت مستقیم یا غیرمستقیم بر حفظ سلامت مؤثر است (Holen et al. 2016). پروتئین آبکافتی با وجود دامنه وسیع خواص زیست‌فعال، بسته به درجه هیدرولیز، وزن مولکولی، باقیمانده پرولین، میزان آب‌گریزی، نوع آنزیم و توالی اسیدهای آمینه ممکن است طعم تلخ داشته باشد و این تلخی، استفاده از آن را در جیره محدود می‌کند، مگر اینکه از روش‌های مختلف ارائه شده مانند استخراج با الکل، تیمار با کربن فعال، جداسازی کروماتوگرافی، آبکافت آنزیمی با اگزوپپتیدازها و واکنش پلاستئین برای رفع تلخی استفاده کرد (Idowu and Benjakul, 2019).

تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) گونه بومی رودخانه-های بزرگ سیبری و دریاچه‌های اروپا و به عنوان گونه پرورشی مطرح در اروپاست که از آن برای تولید گوشت و استحصال خاویار استفاده می‌شود (Jeney and Jeney, 2002). این گونه به لحاظ تحمل شرایط پرورشی، در خارج از محیط‌های طبیعی، مانند دریاچه و رودخانه برای تولید گوشت پرورش می‌یابد و از نظر تولید خاویار، حجم بالایی را به خود اختصاص می‌دهد (یزدانی ساداتی و رضایی، ۱۳۹۳). یکی از گونه‌های ماهیان خاویاری که در ایران پرورش داده می‌شود، تاسماهی سیبری است. آمار تولید ماهیان خاویاری در ایران به تفکیک گونه گزارش نمی‌شود و در سال ۱۴۰۰ میزان تولید ماهیان خاویاری ۳۱۴۴ تن بوده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۴۰۰-۱۳۹۵).

اغلب مطالعات انجام شـــده درباره پروتئین آبکافتی بر روی امکان جایگزینی آرد ماهی با پروتئین آبکافتی تمرکز داشـته و تعداد خیلی اندکی، از این گزینه به عنوان افزودنی استفاده و تأثیر آن را بررسـی کرده‌اند. از جمله، این مطالعات می‌توان بـه بررســـی پروتئین آبکـافتی بـه عنوان جـایگزین منبع

پروتئینی جیره در ماهی شانک (*Pagrus major*) (Bui et al. 2014)، باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) (Kotzamanis et al. 2007)، شوریده زرد بزرگ (*Pseudosciaena crocea*) (Tang et al. 2008)، مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) (Masuda et al. 2013) اشاره داشت. در مطالعات طاهری و همکاران (۱۳۹۰ و ۱۳۹۲) با مصرف پروتئین آبکافت‌شده ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) در پرورش آلوین و نوزاد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثرات مثبتی بر رشد، بقا، فلور باکتریایی روده و ترکیب اسیدهای آمینه بدن و در مطالعه جواهردوست و همکاران (۱۳۹۸) و Javaherdoust و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر مثبت استفاده از پروتئین آبکافتی ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جیره این ماهی و در تحقیق Fan و همکاران (۲۰۲۲)، تأثیر مثبت پروتئین آبکافتی در جیره باس دهان بزرگ (*Micropterus salmoides*) بر رشد، وضعیت ضد اکسایشی، ایمنی و فلور باکتریایی روده به‌دست آمده است، اما تاکنون مطالعه‌ای با هدف بررسی تأثیر استفاده از پروتئین آبکافت‌شده حاصل از لندرونه قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان یک افزودنی در جیره تاسماهی سیبری گزارش نشده است. لذا هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر پروتئین آبکافت‌شده حاصل از اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر فراسنجه‌های خونی، ایمنی، بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های ضداکسایشی تاسماهی سیبری جوان بود.

مواد و روش‌ها

تهیه پروتئین آبکافت‌شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

آنزیم آلکالاز از نمایندگی شرکت Novozymes دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شرایط بهینه (تعریف شده) برای این آنزیم pH: ۸/۵، غلظت آنزیم: ۱/۵٪ و دما: ۵۷/۵ درجه سانتی‌گراد است (Oveissipour et al. 2012a).

به‌میزان ۶ کیلوگرم اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان ماده خام اولیه، از بازار ماهی‌فروشان بعثت تهران تهیه و در مجاورت یخ (با نسبت ۲:۱ وزنی/وزنی) به آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات واحد تهران منتقل شد. به منظور جلوگیری از فساد، اندرونه در ظروف پلاستیکی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد. به‌منظور تولید آرد پروتئین آبکافتی، ابتدا ۵۰ گرم از نمونه‌های امعاء و احشاء (که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی و سپس همگن شد) در ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۲:۱) (pH: ۸) به ارلن‌مایرها اضافه شد. برای غیرفعال‌کردن آنزیم‌های داخلی، نمونه‌ها، برای مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از خنک‌شدن نمونه‌ها، ظروف حاوی نمونه‌ها در دستگاه بن‌ماری و گرمخانه شیکردار قرار داده شد و آنزیم طی شرایط تعریف‌شده به نمونه‌ها اضافه شد. پس از اتمام فرآیند آبکافت، برای قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها برای ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها بعد از خنک‌شدن تا دمای معمولی اتاق، با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g، سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت‌ها (مایع رویی) جمع‌آوری و با استفاده از آون تحت خلاء خشک شدند (Oveissipour et al. 2012a).

شرایط پرورش ماهی

برای انجام تحقیق، ۳۰۰ قطعه تاسماهی سیبری با وزن اولیه ۳ ± ۶۷ گرم از مرکز خصوصی پرورش ماهیان خاویاری در گیلان تهیه و در ۱۲ مخزن با حجم ۲۰۰۰ لیتر در مزرعه خصوصی در گیلان توزیع شد. در هر مخزن، ۲۵ قطعه ماهی قرار داده شد. ماهی‌ها پس از طی ۱۴ روز دوره سازگاری، به‌مدت ۵۶ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. تیمارهای آزمایش شامل جیره‌های غذایی حاوی سطوح صفر (شاهد)، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم پروتئین آبکافت‌شده (Javaherdoust et al. 2020) در یک کیلوگرم جیره بود و برای هر تیمار، ۳ تکرار در نظر گرفته شد. جیره‌ی شاهد با توجه به جیره تاسماهی سیبری (محتوی ۴۲٪ پروتئین، ۱۰٪ خاکستر، ۶٪ چربی، ۹/۸٪ رطوبت) و با اقلام غذایی در دسترس ساخته شد (جدول ۱). جیره‌های آزمایشی بر اساس سنجش تقریبی آرد پروتئین آبکافتی (جدول ۱) با جایگزینی با آرد ماهی ساخته شدند. غذادهی با جیره‌های آزمایشی به مدت ۸ هفته

و دفعات و میزان غذادهی مشابه زمان سازگاری ماهی سه بار در روز و به میزان ۳٪ وزن بدن انجام شد. منبع آب مورد استفاده، آب چاه با دبی ۴۰ لیتر در ثانیه بود. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده از قبیل دما (۰/۶ ± ۱۸/۴ سانتی‌گراد)، pH (۰/۷ ± ۸/۷)، اکسیژن محلول (۰/۲ ± ۶/۹ میلی‌گرم/لیتر) و هدایت للکتریکی (۴۱۰/۲ ± ۵۸۳۶/۲ میکروزیمنس/سانتی‌متر) در طول دوره اندازه‌گیری بود. سنجش ترکیب لاشه، جیره و آرد پروتئین آبکافتی بر اساس روش AOAC (۲۰۰۵) انجام شد و نیز درصد ماده خشک، پروتئین، چربی، خاکستر لاشه و جیره مصرفی تعیین شد.

جدول ۱ اجزای تشکیل دهنده و ترکیب تقریبی جیره مورد استفاده در تیمارهای مختلف پروتئین آبکافتی (گرم/کیلوگرم)

ترکیبات (درصد)	شاهد (صفر)	۵ گرم/کیلوگرم (۰/۵٪)	۱۰ گرم/کیلوگرم (۱٪)	۲۰ گرم/کیلوگرم (۲٪)	پروتئین آبکافتی
آرد ماهی کیلکا	۵۷	۵۶/۵	۵۶	۵۵	
آرد گندم	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	
پروتئین آبکافت شده	۰	۰/۵	۱	۲	
آرد گوشت	۶	۶	۶	۶	
کنجاله سویا	۱۲	۱۲	۱۲	۱۲	
روغن ماهی	۳	۳	۳	۳	
روغن گیاهی	۳	۳	۳	۳	
ژلاتین	۲	۲	۲	۲	
روغن ماهی	۷/۸	۷/۸	۷/۸	۷/۸	
مکمل ویتامینی	۲	۲	۲	۲	
مکمل معدنی	۲	۲	۲	۲	
همبند	۱	۱	۱	۱	
سنجش شیمیایی (درصد وزن خشک)					
پروتئین	۴۲/۲۱	۴۲/۳۶	۴۲/۳۵	۴۲/۴۱	۷۷/۸
چربی	۱۵/۱۰	۱۵/۰۸	۱۵/۰۶	۱۵/۱۲	۲/۲۰
رطوبت	۹/۸۰	۹/۸۲	۹/۷۸	۹/۸۶	۱۳/۹۰
خاکستر	۱۰/۸۰	۱۰/۸۲	۱۰/۹۲	۱۰/۸۷	۳/۴۰

هر کیلوگرم مخلوط مکمل ویتامینی شامل: ویتامین A IU ۱۶۰۰۰۰۰، ویتامین D_3 IU ۴۰۰۰۰۰ ،کولین کلراید ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم، نیاسین ۴۰۰۰ میلی‌گرم، ریبوفلاوین ۸۰۰۰ میلی‌گرم، پیریدوکسین ۴۰۰۰ میلی‌گرم، فولیک اسید ۲۰۰۰ میلی‌گرم، ویتامین B_{12} ۸۰۰۰ میلی‌گرم، بیوتین ۱ میلی‌گرم، اینوزیتول ۲۰۰۰۰ ، ویتامین C ۶۰۰۰۰ میلی‌گرم، ویتامین B_2 ۸۰۰۰ میلی‌گرم، ویتامین K_3 ۲۰۰۰ میلی‌گرم، ویتامین E IU ۴۰۰۰۰ در هر کیلوگرم غذا. مخلوط مکمل معدنی شامل آهن ۲۶ گرم، روی ۱۲/۵ گرم، سلنیوم ۲ گرم، کبالت ۴۸۰ میلی‌گرم، مس ۴/۲ ، منگنز ۱۵/۸، ید ۱ گرم.

فراسنجه‌های خون‌شناختی و بیوشیمیایی سرم

در انتهای دوره، پس از ۲۴ ساعت قطع غذادهی، ۱۵ عدد از هر تیمار برای آزمایش‌های خونی و سرمی استفاده شد. بعد از بیهوش کردن ماهیان با آرد گل میخک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (محسنی، ۱۳۹۴) به میزان ۲ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ ساقه دمی گرفته شد و به ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین منتقل شد (۱ قطره هپارین به ازای ۱ میلی‌لیتر خون). سپس نمونه‌ها در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه خون‌شناسی منتقل و شاخص‌های مورد بررسی شامل تعداد گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید (Houston, 1990)، میزان هماتوکریت و هموگلوبین و شاخص‌های گلبول قرمز (Drobkin, 1945) اندازه‌گیری شدند تا تأثیر جیره‌های مورد آزمایش بر روی شاخص‌های خونی ارزیابی شود.

بخشی از خون بدون ماده ضد انعقاد در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه خون‌شناسی منتقل شد. پس از سانتریفوژکردن نمونه‌های خون در دستگاه سانتریفوژ با قدرت ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرم خون جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌های نهایی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس فراسنجه‌های زیر ارزیابی شد:

بعد از تهیه نمونه سرم از تیمارهای مورد نظر، میزان پروتئین کل سرم (به روش بیوره)، ایمونوگلوبولین M، گلوکز، تری‌گلیسرید، آنزیم آلکالین‌فسفاتاز (Alkaline phosphatase: ALP)، لاکتات‌دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase: LDH)، آسپارتات آمینوترنسفراز (Aspartate aminotransferase: AST) و آلانین‌آمینوترانسفراز (Alanine aminotransferase: ALT) با استفاده از کیت تشخیصی پارس آزمون و توسط دستگاه اتوآنالایزر ساخت شرکت هوشمند فناور تهران اندازه‌گیری شد (Adel et al. 2020).

فراسنجه‌های ایمنی سرم

برای تعیین میزان لیزوزیم سرم از روش ارائه‌شده توسط Kumari (۲۰۰۶) استفاده شد. به‌طور خلاصه ۱۵ میکرولیتر از نمونه‌های سرم با ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* تهیه‌شده در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم‌استات و pH ۵/۵ به میزان ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد و جذب نوری اولیه در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در ادامه، جذب نوری نمونه‌ها ۱ ساعت پس از نگهداری نمونه‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، مجدداً اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ لیوفیلیزه شده برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش عامل مکمل کمپلمان (ACH_{50}) طبق روش توصیه شده توسط Matsuyama و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد. اجزای دستگاه کمپلمان (C_3، C_4) با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر ساخت شرکت هوشمند فناور تهران سنجش شد و فاکتورهای مورد نظر با استفاده از کیت‌های تشخیصی پارس آزمون اندازه‌گیری شد (Adel et al. 2021). اندازه‌گیری انفجار تنفسی[1] توسط ارزیابی نورافشانی شیمیایی (chemoluminescent assay) بر اساس روش Binaii و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد و نشر نوری بر حسب واحد نور نسبی (Relative light unit: RLU/s) بیان شد.

آنزیم‌های ضداکسایشی

آنزیم ضداکسایشی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، به کمک کیت‌های شرکت پادگین طب و براساس دستورالعمل زیر اندازه‌گیری شد. به ۱۰ میکرولیتر نمونه سرم، ۲۵۰ میکرولیتر محلول R_1، ۱۰ میکرولیتر محلول R_2، ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۲۰ میکرولیتر Chromogen اضافه شد. برای تهیه نمونه بلانک نیز همه این مراحل انجام شد، با این تفاوت که در مرحله آخر به‌جای Chromogen از ۲۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استفاده شد. در نهایت نمونه سرم و بلانک در زمان‌های صفر و ۲ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر در الایزا ریدر قرائت شدند (Hoseinifar et al. 2020).

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) به روش Lawrence و Burk (۱۹۷۶) اندازه گیری شد. به طور خلاصه ۰/۹ میلی‌لیتر از محلول واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بر لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH=۷)، ۱ میلی‌مول بر لیتر EDTA، یک میلی‌مول

[1] Respiratory burst

بر لیتر سدیم آزید، ۰/۲ میلی‌مول بر لیتر NADPH، mU ۲۰ گلوتاتیون‌ردوکتاز و ۱ میلی‌مول بر لیتر گلوتاتیون کاهش یافته به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر H_2O_2 (۰/۲۵ میلی‌مول بر لیتر) و ۵۰ میکرولیتر سرم به محلول سنجش اضافه شد. تغییر در جذب در طول ۳۴۰ نانومتر در برابر بلانک (آب مقطر جایگزین سرم شد) به مدت یک دقیقه قرائت شد. فعالیت هر واحد GPX به شکل میزان میکرومول NADPH مصرف شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین سرم با استفاده از ضریب جذب مولار مناسب برای NADPH (۶۲۲۰ میلی‌مول در لیتر در سانتی-متر) محاسبه شد.

فعالیت کاتالاز به روش Goth (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه از سرم در یک میلی‌لیتر محلول واکنش حاوی ۵۰ میلی‌مول بر لیتر بافر پتاسیم فسفات (pH = ۷) و ۱۰/۶ میلی‌مول بر لیتر H_2O_2 تازه تهیه شده اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم-خانه‌گذاری شد. این واکنش پس از ۶۰ ثانیه با اضافه‌کردن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم مولیبدات ۳۲/۴ میلی‌مول بر لیتر متوقف شد. ترکیب زردرنگ آمونیوم مولیبدات و پراکسید هیدروژن تشکیل شد. میزان جذب این محلول زرد در طول موج ۴۰۵ نانومتر در مقابل بلانک (آب مقطر به جای سرم) قرائت شد. هر واحد فعالیت کاتالاز به‌صورت میزان آنزیم کاتالاز مورد نیاز برای تجزیه ۱ میلی‌مول پراکسید هیدروژن در دقیقه بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار آزمایشی شامل سطوح مختلف پروتئین آبکافتی و هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد. پس از بررسی نرمال‌بودن داده‌ها با آزمون شاپیروویلک، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از سنجش واریانس یک‌طرفه انجام شد و به واسطه معنی‌دار بودن در سطح ۵٪، میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵٪ بررسی شد. از نرم‌افزار SPSS ۲۰ برای سنجش آماری استفاده شد.

نتایج

فراسنجه‌های خون‌شناختی

نتایج به‌دست‌آمده از محاسبه RBC نشان داد که این شاخص در تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی (PH) بیش از گروه شاهد بود و بیشترین مقدار این فراسنجه در تیمار آزمایشی ۱۰ گرم PH مشاهده شد که این تیمار اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد نشان داد (جدول ۲، $p<۰/۰۵$)، اما بین تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). بیشترین تعداد گلبول‌های سفید خون در تیمار ۱۰ و ۲۰ گرم PH مشاهده شد که با تیمارهای تغذیه شده با ۵ گرم PH و شاهد تفاوت معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). در بین مقادیر هموگلوبین خون ماهیان مورد آزمایش، بیشترین مقدار در تیمار ۱۰ گرم PH (۰/۱ ± ۸/۸ گرم/دسی‌لیتر) مشاهده شد که با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). دیگر تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد نشان ندادند ($p>۰/۰۵$). کمترین درصد هماتوکریت در گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با ۵ گرم به دست آمد. بیشترین مقدار این فراسنجه نیز در تیمارهای آزمایشی ۱۰ و ۲۰ گرم PH به دست آمد.

شناسایی افتراقی گلبول‌های سفید در تیمارهای آزمایشی نشان داد که بیشترین درصد مونوسیت در تیمار ۱۰ گرم PH خوراک به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت ($p<۰/۰۵$). درصد نوتروفیل، ائوزینوفیل و لنفوسیت بین تیمارهای مختلف آزمایشی با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشت ($p>۰/۰۵$).

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

نتایج تأثیر مقادیر مختلف پروتئین آبکافت‌شده بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی تاسماهی سیبری، بیانگر اختلاف معنی‌دار در مقدار گلوکز در بین تیمارهای مورد مطالعه بود (جدول ۳، $p<۰/۰۵$). نتایج نشان داد که میزان گلوکز و تری-گلیسرید در تمام تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی به ترتیب بیشتر و کمتر از تیمار شاهد بود و بیشترین مقدار گلوکز در تیمار ۱۰ و ۲۰ گرم PH و کمترین میزان آن در گروه شاهد (۱/۱ ± ۵۷/۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) دیده شد ($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار تری‌گلیسرید در گروه شاهد (۸ ± ۴۷۱/۱

میلی‌گرم/دسی‌لیتر) و کمترین میزان این شاخص در تیمار ۱۰ و ۲۰ گرم PH به‌دست آمد (p<۰/۰۵).

بر اساس نتایج به دست آمده، در انتهای دوره آزمایش، اختلاف معنی‌داری در مقادیر آنزیم‌های ALT و LDH در بین تیمارهای مختلف مورد مطالعه مشاهده نشد. در این مطالعه ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۰ و ۲۰ گرم PH از میزان فعالیت آنزیم‌های AST و ALP کمتری نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند و بیشترین میزان این فعالیت‌ها در گروه شاهد و تیمار ۵ گرم PH مشاهده شد (p<۰/۰۵).

جدول ۲ فراسنجه‌های خون‌شناختی تاسماهیان سیبری تغذیه شده با پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	پروتئین آبکافت‌شده (گرم/کیلوگرم خوراک)			
	صفر (شاهد)	۵	۱۰	۲۰
گلبول قرمز (تعداد در میلی‌متر مکعب × ۱۰^۶)	۱/۵۳ ± ۰/۰۱^c	۱/۶۶ ± ۰/۰۸^ab	۱/۷۲ ± ۰/۰۸^a	۱/۶۴ ± ۰/۰۲^ab
گلبول سفید (تعداد در میلی‌متر مکعب × ۱۰^۳)	۱۲/۴ ± ۰/۱^b	۱۲/۲۳ ± ۰/۰۹^b	۱۲/۸۹ ± ۰/۰۵^a	۱۲/۹۴ ± ۰/۱^a
هموگلوبین (گرم/دسی‌لیتر)	۷/۷۰ ± ۰/۰۷^b	۷/۸ ± ۰/۰۶^b	۸/۸ ± ۰/۱^a	۷/۹ ± ۰/۰۵^b
هماتوکریت (٪)	۳۲/۶ ± ۰/۴۸^b	۳۳/۰۰ ± ۱^b	۳۵/۲ ± ۰/۲۳^a	۳۴/۷ ± ۰/۵۳^a
نوتروفیل (٪)	۲۰/۳ ± ۱/۵^a	۲۰/۵ ± ۰/۸۰^a	۲۱ ± ۱/۱^a	۲۰/۸ ± ۰/۹۰^a
لنفوسیت (٪)	۷۶/۳ ± ۱^a	۷۶/۲ ± ۰/۹۰^a	۷۵ ± ۱/۸۰^a	۷۶ ± ۱/۳۰^a
مونوسیت (٪)	۱/۹ ± ۰/۱۵^b	۲ ± ۰/۲۰^b	۳ ± ۰/۲۰^a	۲/۳ ± ۰/۰۸^b
ائوزینوفیل (٪)	۰/۴ ± ۰/۱^a	۰/۳۳ ± ۰/۰۸^a	۰/۳۳ ± ۰/۰۸^a	۰/۶۷ ± ۰/۰۵^a

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ است (p<۰/۰۵).

جدول ۳ فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم تاسماهیان سیبری تغذیه شده با پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	پروتئین آبکافت‌شده (گرم/کیلوگرم خوراک)			
	صفر (شاهد)	۵	۱۰	۲۰
گلوکز (mg/dL)	۵۷ ± ۱/۱۰^c	۶۱/۸ ± ۲/۱۰^b	۶۹ ± ۲/۰۵^a	۶۶/۱ ± ۲^a
تری گلیسرید (mg/dL)	۴۷۱/۱ ± ۸/۰۰^a	۴۵۶ ± ۷/۶۰^b	۴۴۶/۱ ± ۱۱/۳^c	۴۴۸ ± ۱۰/۴^c
ALP (IU/L)	۱۰۱/۲ ± ۸/۲۰^a	۹۷/۱ ± ۷/۳۰^ab	۸۶/۳ ± ۳/۶^b	۸۷/۲ ± ۵^b
ALT (IU/L)	۲۸۷/۱ ± ۱۰/۴۰^a	۲۹۱/۷ ± ۳/۵۰^a	۲۶۷/۱۴ ± ۲/۸^a	۲۷۹/۱۳ ± ۵/۶^a
AST (IU/L)	۵۳۵/۳ ± ۱۴/۲۰^a	۵۳۰/۱ ± ۱۶/۷۹^a	۵۱۶/۴ ± ۱۷/۹۰^b	۵۲۰/۶ ± ۱۳/۰۸^b
LDH (IU/L)	۹۸۶/۵ ± ۳۲/۳۰^a	۹۴۳/۲ ± ۲۶/۵۰^a	۹۵۸/۸ ± ۱۷/۳۰^a	۹۷۱/۶ ± ۱۶/۹^a

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ است (p<۰/۰۵).

شاخص‌های ایمنی سرم خون

تغییرات سطوح شاخص‌های ایمنی سرم خون تاس‌ماهیان سیبری تغذیه شده با سطوح مختلف پروتئین آبکافت‌شده در انتهای دوره نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان ایمونوگلوبولین نوع M، همچنین مقادیر جزء C_3 کمپلمان و میزان فعالیت انفجار تنفسی سرم تاس‌ماهیان تغذیه شده با جیره ۱۰ گرم PH با دیگر تیمارها به‌خصوص گروه شاهد وجود دارد (p<۰/۰۵). بین گروه شاهد و ۵ گرم PH تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۴؛ p>۰/۰۵). فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم (ACH_{50}) در تیمار ۱۰ گرم PH با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان داد (p<۰/۰۵). همچنین،

مقادیر جزء C_4 کمپلمان و میزان فعالیت لیزوزیم سرم، در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ گرم PH اختلاف معنی‌دار با تیمارهای ۵ گرم PH و گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵).

جدول ۴ شاخص‌های ایمنی سرم تاس‌ماهیان سیبری تغذیه شده با پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	پروتئین آبکافت‌شده (گرم/کیلوگرم خوراک)			
	صفر (شاهد)	۵	۱۰	۲۰
ایمونوگلوبولین M (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۳۱/۲ ± ۱/۱۴^{c}	۳۳/۵ ± ۱/۳۷^{c}	۴۴ ± ۲/۱۴^{a}	۴۰ ± ۱/۲۵^{b}
لیزوزیم سرم (میکروگرم/میلی‌لیتر/دقیقه)	۲۸/۱ ± ۰/۸^{b}	۲۹ ± ۱/۱^{b}	۳۲/۱ ± ۱^{a}	۳۱/۷ ± ۰/۹^{a}
C_3 (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۳۷/۲ ± ۲^{c}	۳۶/۱ ± ۱/۱^{c}	۴۸ ± ۱/۲^{a}	۴۳/۲ ± ۱/۱^{b}
C_4 (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۸/۱ ± ۰/۹^{b}	۲۰/۱ ± ۱^{b}	۲۳ ± ۱/۵^{a}	۲۱/۶ ± ۱/۲^{a}
ACH50 (IU/میلی‌لیتر)	۸۶ ± ۱/۵^{b}	۸۸ ± ۱/۹^{b}	۹۴/۱ ± ۱/۴^{a}	۹۰/۲ ± ۱/۷^{b}
انفجار تنفسی (RLU/s)	۷۲۸ ± ۸/۵۴^{c}	۷۳۶ ± ۶/۹۸^{c}	۸۳۷/۱ ± ۷/۴^{a}	۸۱۴/۱ ± ۹^{b}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ ٪ است (p<۰/۰۵).

شاخص‌های ضداکسایشی

در جدول ۵ تغییرات شاخص‌های ضداکسایشی سرم تاسماهیان سیبری تغذیه شده با سطوح مختلف پروتئین آبکافت‌شده ارائه شده است. در این بررسی میزان شاخص‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز سرم در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ گرم PH اختلاف معنی‌دار با دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). همچنین، میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۱۰ گرم PH در بالاترین میزان خود قرار داشت و تفاوت معنی‌دار با دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۵ شاخص‌های ضداکسایشی تاس‌ماهیان سیبری تغذیه شده با پروتئین آبکافتی اندرونه قزل‌آلای رنگین‌کمان

شاخص	پروتئین آبکافت‌شده (گرم/کیلوگرم خوراک)			
	صفر (شاهد)	۵	۱۰	۲۰
سوپراکسیددیسموتاز (IU/میلی‌لیتر)	۵/۴۰ ± ۰/۱۵^{b}	۵/۲۰ ± ۰/۲۰^{b}	۶/۲۰ ± ۰/۳۰^{a}	۶/۵۰ ± ۰/۰۸^{a}
گلوتاتیون پراکسیداز (میکرومول/میلی‌لیتر)	۰/۱۳ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۱۴ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۲۷ ± ۰/۰۲^{a}	۰/۱۵ ± ۰/۰۱^{b}
کاتالاز (IU/میلی‌لیتر)	۸/۵۰ ± ۰/۱۲^{b}	۸/۰۰ ± ۰/۱۰^{b}	۹/۲۰ ± ۰/۲۹^{a}	۹/۱۰ ± ۰/۵۳^{a}

میانگین (± انحراف معیار)، حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ است (p<۰/۰۵).

بحث

فراسنجه‌های خون‌شناختی، شاخص‌های زیستی ارزشمندی هستند که نشان‌دهنده پاسخ به تنش‌های فیزیولوژیک و همچنین وضعیت سلامت عمومی هستند (Rey Vázquez and Guerrero, 2007; Siwicki et al. 1994). مطالعات قبلی نشان داده است که وجود پروتئین‌های آبکافتی اثر معنی‌دار منفی بر شاخص‌های خونی ماهیان جوان سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) ندارد (Kader et al. 2011, Bui et al. 2014). در این بررسی، افزایش معنی‌داری در تعداد گلبول قرمز، درصد هموگلوبین و مونوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۱۰ گرم PH در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. همچنین، بیشترین تعداد گلبول‌های سفید خون و درصد هماتوکریت در تیمار ۱۰ و ۲۰ گرم PH

مشاهده شد که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. در مطالعه مشابه، Andrews و همکاران (۲۰۱۹)، افزایش شاخص‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون، درصد هموگلوبین و هماتوکریت متعاقب مصرف پروتئین آبکافتی در جیره غذایی کپور ماهی هندی (*Labeo rohita*) گزارش کرده‌اند.

در مطالعات قبلی گزارش شده است که پروتئین رژیم غذایی می‌تواند بر دستگاه ایمنی تأثیر بگذارد، پروتئین آبکافت‌شده در جیره با تأثیر مثبت بر هضم پروتئین می‌تواند بر بهبود دستگاه ایمنی ماهیان مؤثر باشد. بنابراین، احتمال می‌رود که پروتئین‌های ماهیان حاوی مقادیر زیادی از توالی‌های زیست‌فعال بوده که می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای محرک‌های ایمنی باشند (Duarte et al. 2006; Tang et al. 2008). در مطالعه حاضر، میزان گلوکز و تری‌گلیسرید در تمام تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی به‌ترتیب بیشتر و کمتر از تیمار شاهد بود. پپتیدهای زیست‌فعال با خصوصیات ضداکسایشی، ضد باکتریایی و ایمنی خونی می‌توانند در طی فرآیند آبکافت تولید شوند (Bøgwald et al. 1996; Kotzamanis et al. 2007). دستگاه ایمنی ماهیان می‌تواند با استفاده از مکمل‌های پروتئینی آبکافت‌شده تقویت شود (Kotzamanis et al. 2007; Zheng et al. 2013). استفاده از پروتئین‌های آبکافت‌شده می‌تواند پاسخ ایمنی غیر اختصاصی در ماهیان را افزایش دهد. آبکافت آنزیمی پروتئین‌ها ممکن است منجر به تشکیل پپتیدهای زیست‌فعال با خواص ایمنی و ضد باکتریایی شود که این خواص بسته به عواملی مانند وزن مولکولی و توالی اسیدهای آمینه متغیر است (Korhonen and Pihlanto, 2006; Kim and Mendis, 2006; Kim and Wijesekara, 2010). نتایجی که در مورد تری‌گلیسرید به‌دست آمد نیز ممکن است به دلیل ویژگی امولسیفایری پروتئین آبکافتی و تأثیر آن بر هضم چربی باشد (Kotzamanis et al. 2007؛ Sathivel et al. 2005).

آنزیم‌های کبدی، شاخص فعالیت کبدی محسوب می‌شوند و تغییر در میزان فعالیت و ترشح آنها می‌تواند متأثر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورشی، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و وضعیت سلامت ماهیان باشد (Sheikhzadeh et al. 2011). آنزیم‌های LDH، AST، ALT و ALP از جمله مهم‌ترین آنزیم‌های کبدی هستند که در موارد آسیب به کبد و نکروز سلول‌های کبدی مقادیر آنها افزایش می‌یابد (Bandyopadhyay and Das Mohapatra, 2009). بنا بر نتایج به دست آمده، در انتهای دوره آزمایش، اختلاف معنی‌داری در مقادیر آنزیم‌های کبدی ALT و LDH در بین تیمارهای مختلف مورد مطالعه مشاهده نشد. در این مطالعه ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱۰ و ۲۰ گرم PH از میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی AST و ALP کمتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بودند و بیشترین میزان این فعالیت‌ها در تیمار شاهد و ۵ گرم PH مشاهده شد. عدم تأثیر پروتئین آبکافت‌شده مورد مطالعه بر آنزیم‌های کبدی می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که پروتئین آبکافت‌شده در مقادیر مورد استفاده موجب آسیب کبدی نشده و سلامت کبد را حفظ کرده است (Fan et al. 2022)، هر چند که انجام مطالعات آسیب شناسی بافتی بر روی بافت‌های کبد، معده و روده که تایید کننده این مطلب باشد، توصیه می‌شود.

در ماهیان دستگاه ایمنی ذاتی یا غیر اختصاصی یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود. تقویت این دستگاه برای ماهیان پرورشی بسیار ارزشمند است، زیرا ماهیان در شرایط پرورشی در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی فرصت طلب آسیب‌پذیرند (Dugenci et al. 2003). ایمونوگلوبولین‌های سرم، پروتئین‌های مهمی هستند که در پاسخ ایمنی هومورال نقش مهمی دارند و روند تولید آنها در ماهی، وقوع مجموعه‌ای از واکنش‌ها بین سلول ارائه دهنده آنتی ژن، سلول‌های T کمکی فعال‌شده و اینترلوکین‌ها سبب تحریک لنفوسیت‌های B می‌شوند (Dugenci et al. 2003). لیزوزیم یکی از ترکیبات عمده در دستگاه دفاع ایمنی مهره‌داران و بی‌مهرگان است (Song et al. 2006). لیزوزیم به عنوان یک میانجی ایمنی غیراختصاصی در برابر انگل‌ها، باکتری‌ها و عفونت‌های ویروسی عمل می‌کند و میزان آن در خون ماهیان، زمانی که علیه عفونت فعالیت می‌کند، بالا می‌رود (Puangkaew et al. 2004). غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد از پروتئین ماهی آبکافت‌شده در ماهی کراکر زرد بزرگ (*Pseudosciaena crocea* R) توانست فعالیت لیزوزیم را

افزایش دهد (Tang et al. 2008). هم‌چنین در ماهی باس دریایی ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) افزایش مقدار لیزوزیم در سطوح میانه دیده شد (Liang et al. 2006). مطالعات قبل، عملکردهای زیستی پروتئین‌های آبکافت‌شده به عنوان پپتیدهای زیست فعال را معرفی کرده‌اند (Gildberg et al. 1996; Bøgwald et al. 1996; Harnedy and FitzGerald, 2012). تغذیه ماهی هالیبوت اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) با موجودات غذایی زنده غنی‌شده با پپتیدها، تولید لیزوزیم و کمپلمان‌ها را تحریک می‌کند (Hermannsdottir et al. 2009). Liang و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که استفاده از ۱۵٪ پروتئین آبکافت‌شده در جیره ماهی باس دریایی ژاپنی باعث افزایش فعالیت لیزوزیم و کمپلمان‌ها می‌شود. Tang و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که پروتئین ماهی آبکافت‌شده باعث افزایش فعالیت لیزوزیم، کمپلمان‌های سرم و ایمونوگلوبولین M در ماهی کراکر زرد بزرگ می‌شود. اثر مثبت معنی‌دار چندین نوع پروتئین آبکافت‌شده بر دستگاه ایمنی ماهی آزاد و توربوت گزارش شده است (Murray *et al.* 2003; Zheng et al. 2012). در ماهی باس دهان بزرگ تغذیه شده با پروتئین آبکافتی نیز ایمنی بهبود یافت که با بررسی بیان ژن سیتوکین‌ها، اینترلوکین‌ها و فاکتور نکروز تومور آلفا مورد بررسی قرار گرفت (Fan et al. 2022). مقالات مختلف مکانیزم‌های مختلفی برای عملکرد محرک ایمنی پروتئین آبکافتی ارایه کرده‌اند. به این صورت که پپتیدهای زیست‌فعال موجود در پروتئین آبکافتی به گیرنده-های ویژه ایمنی و برخی گیرنده‌های اضافی متصل می‌شوند و این پپتیدهای زیست‌فعال موجب افزایش لنفوسیت‌های طحال و بیگانه‌خواری ماکروفاژها می‌شوند. ماکروفاژها نه تنها می‌توانند به صورت مستقیم از طریق بیگانه‌خواری عوامل بیماری‌زا را از بین ببرند، بلکه با رهاسازی نیتریک اکساید، اینترلوکین‌ها، فاکتور نکروز تومور آلفا و دیگر سیتوکین‌ها به صورت غیر مستقیم نیـز عمل می‌کنند. همچنین، پروتئین-های آبکافتی اثرات افزاینده ایمنی خود را از مسیرهای مختلف شامل تقویت قابلیت مسدودکنندگی روده (هم از طریق تأثیر بر نفوذپذیری دیواره روده و هم از طریق تنظیم ترشح موکوس و تولید پپتیدهای ضد باکتریایی)، تأثیر بر دستگاه ایمنی روده (تولید ایمونوگلوبولین، سیتوکین‌ها، اینترلوکین‌ها و فاکتور نکروز تومور آلفا)، افزایش سلول‌های مسئول ایمنی در طحال و ازدیاد اسپلنوسیت‌ها القا می‌کنند (Kiewiet et al. 2018; Cai et al. 2022). فعالیت محرک ایمنی پروتئین‌های آبکافتی به خواص فیزیکوشیمیایی پپتیدها شامل توالی آنها، ترکیب اسیدهای آمینه، آب‌گریزی، طول زنجیره و بار مثبت آنها وابسته است، به طوری‌که پپتیدهای آب‌گریز که بار مثبت بیشتری دارند، از فعالیت ایمنی بیشتری نیز برخوردارند (Cai et al. 2022).

کمپلمان در ماهیان نقش مهمی در باکتری‌کشی سرم و موکوس ایفا می‌کند و به عنوان اپسـونین با اتصـال به بخش-های اختصاصی عامل مهاجم در سطح بدن میزبان در بیگانه خواری دخیل است (Awad and Austin, 2010). ارزیابی شاخص‌های ایمنی سرم در مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان ایمونوگلوبولین نوع M، مقادیر جزء C_3 کمپلمان، فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم (ACH_{50}) و میزان فعالیت انفجار تنفسی سرم تاس‌ماهیان تغذیه شده با جیره ۱۰ گرم PH با دیگر تیمارها به خصوص گروه شاهد وجود دارد. همچنین، مقادیر جزء C_4 کمپلمان و میزان فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ گرم PH اختلاف معنی‌دار با تیمارهای ۵ گرم PH و گروه شاهد داشت. از همین رو، نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات قبل در تولید لیزوزیم هم‌خوانی داشت. در مطالعه مشابه، Bui و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از پروتئین آبکافتی در جیره غذایی ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) موجب افزایش معنی‌دار شاخص‌های لیزوزیم و میزان ایمونوگلوبولین نوع M شده است. بهبود عملکرد ایمنی سلولی و خونی همراه با افزایش مقاومت به بیماری در مطالعات قبلی گزارش شده است (Murray *et al.* 2003; Liang et al. 2006; Kotzamanis et al. 2007). با وجود این، شواهد مستدلی برای حمایت از این چنین ادعایی وجود ندارد که اثرات تحریک ایمنی از طریق پروتئین‌های آبکافت‌شده می‌تواند به عنوان بخش بالقوه‌ای از جیره برای ارتقای مقاومت در برابر بیماری در ماهیان باشد (Khosravi et al. 2015).

آنزیم‌های ضداکسایشی اولین خطوط دستگاه دفاعی موجودات از جمله آبزیان در شرایط استرس بوده و ارزیابی

آن‌ها را می‌توان در بررسی وضعیت دستگاه ایمنی آنها به کار برد. مهم‌ترین آنزیم‌های دفاع ضداکسایشی شامل سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون ردوکتاز، آلون دی آلدهید و گلوتاتیون پراکسیداز هستند (Azaizeh et al. 2012). گلوتاتیون پراکسیداز یکی از آنزیم‌های ضداکسایشی بدن است که بدن را در برابر آسیب های ناشی از اکسیدکننده‌های شدید مثل رادیکال‌های آزاد حمایت می‌کند. عمل اصلی این آنزیم‌ها کاهش هیدروپراکسیدهای آلی به الکل‌های بی‌خطر و همچنین، تبدیل پراکسید هیدروژن آزاد به آب است تا از خطر اکسیدکنندگی آنها جلوگیری شده و به عبارتی خنثی شوند (Imai and Nakagawa, 2003).

ضداکسایش ها دارای نقش حیاتی در دستگاه غذایی هستند و باعث کاهش فرآیند اکسایش می‌شوند. ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، سلنیوم و پپتیدها و پروتئین‌های حاصل از آبکافت از جمله ضداکسایش‌ها هستند (Anusha et al. 2011). در شرایط استرسی، دستگاه دفاعی ضداکسایشی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز برای مهار گونه‌های اکسیژن فعال مهم و ضروری هستند (Atencio et al. 2009). مطالعات نشان داده است که افزایش میزان آنیون سوپراکسید در سلول‌ها باعث القای بیان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (Meilhac et al. 2000). استفاده از ترکیباتی با خاصیت ضداکسایشی در جیره، برای تقویت ماهی در زمان مواجهه با استرس یکی از اهداف استفاده از افزودنی‌ها در جیره است (Hoseini et al. 2020). ترکیبات ضداکسایشی احتمالاً با تحریک آنزیم‌های ضداکسایشی ماهی و بهبود وضعیت ضداکسایشی آن، توانایی موجود را در مقابله با استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهند (Zhang et al. 2022).

نتایج حاضر نشان داد که سطح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز سرم در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ گرم PH اختلاف معنی‌دار با دیگر تیمارها دارد. همچنین، میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ۱۰ گرم PH در بالاترین میزان خود قرار داشت و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد. همچنین، مشخص شد سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافته است که ممکن است پاسخی به افزایش تولید سوپر اکسید باشد (Meilhac et al. 2000). با افزایش میزان پروتئین آبکافتی، میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت، به طوری که در سطح ۱۰ گرم پروتئین آبکافت‌شده، بالاترین مقدار این آنزیم دیده شد. در مطالعه Javaherdoust و همکاران (۲۰۲۰) متعاقب مصرف سطح ۱۰ گرم PH در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان افزایش معنی‌دار سطح آنزیم SOD گزارش شده است. همچنین، میزان SOD بالاتری در ماهیان جوان سیم دریایی قرمز تغذیه‌شده با جیره حاوی پروتئین آبکافت‌شده در مطالعه Bui و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده شد و اثر معنی‌دار داشت که نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه Bui و همکاران (۲۰۱۴) هم‌سویی دارد. استفاده از پروتئین آبکافتی در جیره باس دهان بزرگ نیز با افزایش آنزیم‌های ضداکسایشی، وضعیت سلامت روده را افزایش داد (Fan et al. 2022). ویژگی ضداکسایشی پروتئین آبکافتی در مطالعات مختلفی بررسی و تأیید شده است، به طوری که در پروتئین‌های تولیدشده از یک منبع با درجات مختلف آبکافت، ترکیب و توالی اسیدهای آمینه می‌تواند متفاوت باشد (Wu et al. 2003). با افزایش درجه آبکافت، غلظت پپتیدهایی با اندازه کوتاه‌تر (وزن مولکولی کمتر) بیشتر می‌شود. اندازه پپتیدها (وزن مولکولی پپتیدها) عامل دیگری است که طبق گزارش‌ها بر فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌ها مؤثر است (Ren et al. 2008; Bougatef et al. 2010).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، تأثیر پروتئین آبکافتی ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌خصوص در تیمار حاوی مقدار ۱۰ گرم در کیلوگرم جیره بر روی شاخص-های خونی و بیوشیمیایی سرم، شاخص‌های ایمنی و آنزیم-های ضداکسایشی در تاس‌ماهی سیبری جوان مثبت و معنی-دار ارزیابی شد. شاید بتوان عدم حصول تأثیر مثبت مقادیر بیشتر پروتئین آبکافتی را به تلخی این ماده افزودنی نسبت داد و ممکن است با استفاده از روش‌های برطرف کردن تلخی پروتئین آبکافتی بتوان از اثرات سودمند این ترکیب به عنوان مکمل با مقادیر بیشتر در جیره بهره برد. هر چند که انجام مطالعات تکمیلی برای تعیین دوز بهینه پروتئین آبکافتی (با

توجه به نوع پروتئین آبکافتی) در تاسماهی سیبری جوان ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۴-۱۳۹۹-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاس‌گزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع

اصغرنیا، م.، یگانه، س.، جعفرپور، س.، صفری، ر. ۱۳۹۶. استفاده از روش شیمیایی به منظور تولید پروتئین آبکافت‌شده از امعاء و احشاء فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys moltirix*) و استفاده از آن به عنوان محیط کشت *Listeria monocytogenes*. مجله علمی شیلات ایران ۲۶: ۲۳-۱۱.

جواهردوست، ش.، یگانه، س.، کرامت امیرکلایی، ع. ۱۳۹۸. اثرات استفاده از پروتئین آبکافتی تهیه شده از اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در جیره‌ی غذایی بر برخی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله علمی شیلات ایران ۲۸: ۸۳-۷۱.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۴۰۰-۱۳۹۵. معاونت برنامه‌ریزی و مدیریت منابع سازمان شیلات ایران، انتشارات شیلات ایران، ۲۹ ص.

طاهری، ع. عابدیان‌کناری، ع.، حلاج، ر. ۱۳۹۰. تاثیر پروتئین آبکافت‌شده حاصل از ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) ضایعات کشتارگاهی طیور بر ترکیب آمینواسید، رشد و بقای آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران ۲۰: ۹۵-۸۱.

طاهری، ع. عابدیان‌کناری، ع. معتمدزادگان، ع. حبیبی‌رضایی، م.، اوجی‌فرد، ا. ۱۳۹۲. غلظت‌های مختلف پروتئین آبکافت‌شده ماهی ساردین و ضایعات کشتارگاهی طیور بر سطح باکتری‌های روده و بقا در لاروهای ماهی قزل-آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با آئروموناس سالمونیسیدا. پاتوبیولوژی مقایسه‌ای ۱۰: ۸۸۲-۸۷۳.

یزدانی ساداتی، م.ع.، رضایی، ا، ۱۳۹۳. تاثیر جایگزینی پروتئین کنستانتره سویا بجای پودر ماهی بر شاخصهای رشد و ترکیب لاشه تاس ماهی سیبری. مجله علمی شیلات ایران ۲۳: ۸۵-۷۳.

Alamed, J., McClements, D.J., Decker, E.A. 2006. Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids. Journal of Food Chemistry 95: 585-590.

Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research 41: 61-69.

Anusha, G, Samaranayaka, P, Eunice, C., Li-Chan, Y. 2011, Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production,

Adel, M., Dawood, M.A.O., Shafiei, S., Sakhaie, F., Shekarabi, S.P.H. 2020. Dietary *Polygonum minus* extract ameliorated the growth performance, humoral immune parameters, immune-related gene expression and resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 519: 734-738.

Adel, M., Omidi, A.H., Dawood, M.A.O., Karimi, B., Shekarabi, S.P.H. 2021. Dietary *Gracilaria persica* mediated the growth performance, fillet coloration, and immune response of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Aquaculture 530: 735-750.

assessment, and potential applications. Journal of Functional Foods 3: 229-254.

AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International.

Aspmo, S.I., Horn, S.J., Eijsink, V.G. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry 40: 1957-1966.

Awad, E., Austin, B. 2010. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 33: 413-420.

Atencio, L., Moreno, I., Jos, Á., Prieto, A.I., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M. 2009. Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. Toxicon 53: 269-282.

Azaizeh, H., Halahlih, F., Najami, N., Brunner, D., Faulstich, M., Tafesh, A., 2012. Antioxidant activity of phenolic fractions in olive mill wastewater. Food Chemisty 134: 2226-2234.

Bandyopadhyay, P., Das Mohapatra, P.K. 2009. Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.). Fish Physiology and Biochemistry 35: 467-478.

Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S. M. V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R., Bankehsaz, Z. 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). Fish and Shellfish Immunology 36: 46-51.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri, M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. Food Chemistry 118: 559-565.

Bøgwald, J., Dalmo, R., Leifson, R.M., Stenberg, E., Gildberg, A.J.F., Immunology, S. 1996. The stimulatory effect of a muscle protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L., on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology 6: 3-16.

Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., Lee, K.J. 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture 418: 11-16.

Cai, B., Chen, H., Wan, P., Luo, L., Ye, Z., Huang, J., Chen, D., Pan, J. 2022. Isolation and identification of immunomodulatory peptides from the protein hydrolysate of tuna trimmings (*Thunnas albacares*). Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie164: 113614

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. Journal of Food Chemistry 135: 3020-3038.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B. 1999. Scientific concept of functional foods in Europe, Consensus document. British Journal of Nutrition 81: 1-27.

Drabkin, D.L. 1945. Spectrophotometric studies; the crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. The Journal of Biological Chemistry 164:703-723.

Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdigón, G., Matar, C. 2006. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. Immunobiology 211: 341-350

Dugenci, S.K., Arda, N., Candan, A. 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal of Ethnopharmacology 88: 99-106.

Fan, Z., Wu, D., Li, J., Zhang, Y., Cui, Z., Li, T., Zheng, X., Liu, H., Wang, L., Li, H. 2022. Assessment of fish protein hydrolysates in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) diets: Effect on growth, intestinal antioxidant status, immunity, and microflora. Frontiers in Nutrition 9: 816-830.

Gildberg, A., Bøgwald, J., Johansen, A., Stenverg E. 1996. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. Comparative Biochemistry and Physiology 114B: 97-101.

Goth, L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta 196: 143-151.

Holen, E., He, J., Araujo, P., Seliussen, J., Espe, M. 2016. Hydrolyzed fish proteins modulates both inflammatory and antioxidant gene expression as well as protein expression in a co culture model of liver and head kidney cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish and Shellfish Immunology 54: 22-29.

Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. Journal of Functional Foods 4: 6-24.

Hermannsdottir, R., Johannsdottir, J., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B.K., Bjornsdottir, R. 2009. Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. Fish and Shellfish Immunology 27: 595-602.

Hoseini, S.M., Taheri Mirghaed, A., Paray, B.A., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H. 2020. Effects of dietary menthol on growth performance and antioxidant, immunological and biochemical responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 524:735-760.

Hoseinifar, S.H., Shakouri, M., Van Doan, H., Shafiei, S., Yousefi, M., Raeisi, M., Yousefi, S., Harikrishnan, R., Reverter, M., 2020. Dietary supplementation of lemon verbena (*Aloysia citrodora*) improved immunity, immune-related genes expression and antioxidant enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunology 379-385.

Houston, A.H. 1990. Blood and circulation. In: Shreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). Methods in fish biology. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society 273-335.

Idowu , A.T., Benjakul, S. 2019. Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects. Journal of Food Biochemistry 43: e12978.

Imai, H., Nakagawa, Y. 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radical Biology and Medicine 34: 145-169.

Javaherdoust, S., Yeganeh, S., Amirkolaie, A.K. 2020. Effects of dietary visceral protein hydrolysate of rainbow trout on growth performance, carcass composition, digestibility and antioxidant enzyme in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Nutrition 26: 134-144.

Jeney, G., Jeney, Z.S. 2002. Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defense mechanisms in

sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus* × *A. baerii*. Journal of Applied Ichthyology 18: 416-419.

Kader, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Bulbul, M., Honda, Y., Mamauag, R.E., Laining, A., 2011. Growth, nutrient utilization, oxidative condition, and element composition of juvenile red sea bream (*Pagrus major*) fed with fermented soybean meal and scallop by-product blend as fishmeal replacement. Fisheries Science 77: 119-128.

Khaled, H.B., Ghlissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M.A., Barkia, A., Sahnoun, Z., Nasri, M., 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. Food Research International 45: 60-68.

Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V, Kim, S, Jeong, J., Lee, K.J. 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 435: 371-376.

Kiewiet, M.B.G, Faas, M.M., de Vos, P. 2018. Immunomodulatory protein hydrolysates and their application. Nutrients 10: 904-926.

Kim, S.K., Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts- a review. Food Research International 39: 383-393.

Kim, S.K., Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: a review. Journal of Functional Foods 2: 1-9.

Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Review: bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal 16: 945-960.

Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C. 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology 147A: 205-214.

Liang, M., Wang, J., Chang, Q. and Mai, K. 2006. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, (*Lateo labrax japonicus*) (Cuvieret Valenciennes, 1828). Aquaculture Research 37: 102-106.

Masuda, Y., Jinbo, T., Imaizumi, H., Furuita, H., Matsunari, H., Murashita, K., Fujimoto, H., Nagao, J., Kawakami, Y. 2013. A step forward in development of fish protein hydrolysate-based diets for larvae of Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Science 79: 681-688.

Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M., Yano, T. 1988. Characterization of the alternative complement pathway of carp. Developmental and Comparative Immunology 12: 403-408.

Meilhac, O., Zhou, M., Santanam, N., Parthasarathy, S. 2000. Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. Journal of Lipid Research 41: 1205-1213.

Murray, A.L., Pascho, R.J., Alcorn, S.W., Fairgrieve, W.T., Shearer, K.D., Roley, D. 2003. Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture 220: 643-653.

Ovissipour, M., Kenari A.A., Motamedzadegan, A., Nazari, R.M. 2012a. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food and Bioprocess Technology 5: 696-705.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Shabanpour, B. 2012b. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food and Bioprocess Technology 5: 460-465.

Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. Fish and Shellfish Immunology 16: 25-39.

Qian, Z.J., Jung, Q.K., Kim, S.K. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresource Technology 99: 1690-1698.

Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., Xue, S.J. 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Food Chemistry 108: 727-736.

Rey Vázquez, G., Guerrero, G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue and Cell 39: 151-160.

Samaranayaka, A.G., Li-Chan, E.C. 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Journal of Food Chemistry 107: 768-776.

Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J.K., Prinyawiwatkul, W., Patterson, M. 2005. Functional, nutritional, and rheological properties of protein powders from arrowtooth flounder and their application in mayonnaise. Journal of Food Science 70: 1-12.

Sheikhzadeh, N., Nofouzi, K., Delazar, A., Khani Oushani, A. 2011. Immunomodulatory effects of decaffeinated green tea (*Camellia sinensis*) on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology 31: 1268-1269.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 41: 125-139.

Song, Z., Wu, T., Cai, L., Zhang, L., Zheng, X. 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in Miichthysmiiuy. Journal of Zhejiang University Science B7: 596-602.

Tang, H.-G., Wu, T.-X., Zhao, Z.-Y., Pan, X.-D. 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Journal of Zhejiang University Science B9: 684-690.

Wu, H.C., Chen, H.M., Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International 36: 949-957.

Xiao, J., Zhong, Q. 2017. Suppression of retrogradation of gelatinized rice starch by anti-listerial grass carp protein hydrolysate. Food Hydrocolloids 72: 338-345.

Zhang, X., Sun, Z., Wang, Y., Cao, Y., Wang, G., Cao, F. 2022. Enhancement of growth, antioxidative status, nonspecific immunity, and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus*) in response to dietary *Flos populi* extract. Fish Physiology and Biochemistry 48: 67–83

Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J., Chang, Q. 2012. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture Nutrition 18: 297-303.