



تأثیر جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده با پودر ماهی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون و سیستم ایمنی بچه فیل ماهی پرورشی

علی حسین پور زلتی^{۱*}، حسین آدینه^۲، جلیل جلیل پور رودکلی^۳

^۱ سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، ایران، رشت
^۲ دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۳/۰۱/۱۲

پذیرش: ۳/۰۵/۱۴

نویسنده مسئول مکاتبه:

علی حسین پور زلتی، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، ایران، رشت.

ایمیل: ahpour.z@gmail.com

در مطالعه حاضر، تأثیر جایگزینی سطوح مختلف پروتئین هیدرولیز شده با پودر ماهی بر ترکیبات بیوشیمیایی سرم خون و سیستم ایمنی بچه فیل ماهی به مدت ۴۸ روز بررسی شد. در این پژوهش، ۷۵۰ قطعه بچه فیل ماهی با وزن اولیه 3 ± 0.5 گرم به طور تصادفی در ۵ گروه آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون پروتئین هیدرولیز شده)، ۳ تیمار با سطوح مختلف جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده با پودر ماهی (تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۲/۷۵، ۵/۵ و ۸/۲۵ درصد) و تیمار ۴ کنترل مثبت (غذای تجاری) توزیع شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان گلوکز در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$)، به طوری که میزان گلوکز گروه شاهد از سایر تیمارها بیشتر بود. براساس نتایج این مطالعه، بیشترین میزان پروتئین و چربی کل مربوط به تیمار ۲ بود که با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). از نظر آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد ($p > 0.05$). نتایج این پژوهش نشان داد که میزان کلسترول در بین تمام گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). در شاخص‌های ایمنی، میزان ایمونوگلوبولین کل در تیمار ۲ به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها (به استثناء تیمار ۳) بیشتر بود ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که در میزان لیزوزیم بین گروه شاهد با تیمارهای ۱، ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). در این شاخص، تیمار ۲ با بیشترین میزان با سایر گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). میزان فعالیت ایمونوگلوبولین M (IgM) و کمپلمان جایگزین (ACH50) در تمامی گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). در مجموع، با توجه به نتایج این مطالعه، جایگزینی در سطوح ۲/۷۵ تا ۵/۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده، در بیشتر شاخص‌های بیوشیمیایی خون و ایمنی بچه فیل ماهیان عملکرد بهتری نسبت به گروه شاهد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، فیل ماهی، فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم، آنزیم‌های کبدی، ایمنی.

۱ | مقدمه

مربوط به منابع جایگزین مقرون به صرفه پروتئین، موضوعاتی جذاب در زمینه تغذیه ماهی برای توسعه صنعت آبی‌پروری پایدار باشد (Hardy, 2010) و علاقه به یافتن منابع جایگزین پروتئین برای جایگزینی پودر ماهی همواره رو به افزایش بوده است (Wang et al., 2006).

پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به عنوان یک جایگزین بالقوه برای پودر ماهی در جیره‌های آبی‌پروری مورد

پودر ماهی که منبع ارزشمندی از پروتئین برای ماهیان پرورشی به شمار می‌آید، به دلیل تقاضای روزافزون این ماده غذایی با چالش کمبود عرضه، افزایش قیمت و در برخی موارد با کیفیت نامطلوب این محصول مواجه شده است (Watanabe, 2002). همچنین، افزایش تقاضای جهانی برای پودر ماهی و به دنبال آن، افزایش قیمت ناشی از این تقاضا، خود می‌تواند فشار بیشتری بر منابع جهانی این محصول وارد کند. بنابراین، بدیهی است که موضوعات

جذب مواد مغذی، پاسخ ایمنی، وضعیت اکسیداتیو و مقاومت در برابر بیماری‌ها تأثیر مثبتی داشته است. ماهیان خاویاری، به عنوان گونه‌های با ارزش بالا و زیست‌محیطی ارزشمند، به دلیل صید بی‌رویه، تخریب زیستگاه و آلودگی، با بحرانی به نام کاهش چشمگیر جمعیت در طبیعت روبرو شده‌اند (Bronzi et al., 2019). این معضل، توجه و تلاش مضاعفی را برای حفاظت از این گونه ارزشمند به دنبال داشته و به تبع آن، صنعت پرورش ماهیان خاویاری را رونق بخشیده است. امروزه، این صنعت نقشی حیاتی در تأمین تقاضای جهانی برای گوشت و خاویار ایفا می‌کند. با پیشرفت و گسترش روزافزون صنعت پرورش ماهیان خاویاری، که در قالب افزایش تعداد مزارع پرورش و تنوع گونه‌های پرورشی مشهود است (Bronzi et al., 2019)، بهینه‌سازی روش‌های پرورش، از جمله تغذیه، به منظور تضمین پایداری و سودآوری، امری اجتناب‌ناپذیر است. یکی از عوامل کلیدی در موفقیت پرورش ماهیان خاویاری، حفظ وضعیت فیزیولوژیکی و سلامت ماهیان پرورشی است که به طور مستقیم تحت تأثیر رژیم غذایی قرار می‌گیرد. پروتئین‌های هیدرولیز شده، به دلیل قابلیت هضم بالا و پروفایل متعادل اسیدهای آمینه، به‌عنوان یک جزء امیدوارکننده در جیره غذایی ماهیان پرورشی مطرح شده‌اند که می‌توانند منجر به افزایش نرخ رشد و بهبود وضعیت فیزیولوژیکی و سلامت ماهیان شوند. در این تحقیق با استفاده از سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون (گلوکز، پروتئین و چربی کل، کلسترول و آنزیم‌های کبدی) و سیستم ایمنی (فعالیت ایمنوگلوبولین کل، IgM، لیزوزیم و کمپلمان جایگزین) تأثیر جایگزینی پروتئین‌های هیدرولیز شده با پودر ماهی در جیره غذایی بر وضعیت سلامت فیل ماهیان جوان ارزیابی شد.

۲ | مواد و روش‌ها

شرایط پرورش فیل ماهیان و تیمار بندی

در این پژوهش، ۷۵۰ قطعه بچه فیل‌ماهی با وزن متوسط 3 ± 0.5 گرم به طور تصادفی در ۵ گروه آزمایشی با ۳ تکرار تقسیم شدند. گروه اول (شاهد) هیچ پروتئین هیدرولیز شده‌ای دریافت نکرد، اما ۳ گروه دیگر (تیمارهای ۱، ۲ و ۳) به ترتیب ۲/۵۷، ۵/۵ و ۸/۲۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده به جای پودر ماهی دریافت کردند.

استفاده قرار گیرند. پروتئین هیدرولیز شده ماهی محصولی است که از طریق هیدرولیز آنزیمی و یا سایر روش‌ها پروتئین‌های موجود در ضایعات و دورریزهای صنعت فرآوری ماهی به دست می‌آید (Chalamaiah et al., 2012). این فرآیند، پروتئین‌های طبیعی موجود در ضایعات ماهی را به پپتیدهای کوچک‌تر تجزیه می‌کند. پروتئین هیدرولیز شده ماهی حاوی مقادیر زیادی اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین است که جذب و هضم آن‌ها را در روده ماهی تسهیل می‌کند (Neklyudov et al., 2000) و می‌تواند از طریق بهبود هضم، کارایی خوراک را در ماهی افزایش دهد. پروتئین هیدرولیز شده ماهی به دلیل طعم مطبوع، به عنوان یک ماده جاذب طبیعی برای ماهی عمل کرده و اشتها آن‌ها را افزایش می‌دهد (Ospina-Salazar et al., 2016; Siddik et al., 2018). بخش‌های با وزن مولکولی پایین پروتئین هیدرولیز شده ماهی می‌توانند با کاهش فرایند گلوکونوژنز، مصرف اسیدهای آمینه را در ماهی تنظیم کنند (Siddik et al., 2021). کارآمدی تغذیه‌ای پروتئین هیدرولیز شده ماهی در جیره غذایی ماهیان پرورشی مورد ارزیابی قرار گرفته است. سنجش آنزیم‌های کبدی و فاکتورهای بیوشیمیایی سرم همراه با بررسی فاکتورهای ایمنی مانند ایمنوگلوبولین و کمپلمان می‌تواند وضعیت سلامت ماهیان را نشان دهند (Pham et al., 2019; Siddik et al., 2020). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که مکمل‌سازی جیره با سطوح مناسب پروتئین هیدرولیز شده در گونه‌های مختلفی از ماهیان پرورشی از جمله باراموندی (*Lates calcarifer*) (Siddik et al., 2018)، آزادماهی اطلس (*Salmo salar*) (Refstie et al., 2004)، ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Khosravi et al., 2015b)، باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) (Kotzamanis et al., 2007)، فلاندر زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) (Khosravi et al., 2015b)، کروکر زرد (*Larimichthys crocea*) (Cai et al., 2015)، تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) (L. Ovisipour et al., 2014)، مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*) (Masuda et al., 2013) و قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Javaherdoust et al., 2020) بر رشد، مصرف خوراک،

گروه پنجم (تیمار ۴) نیز غذای تجاری دریافت کرد. آزمایش در ۱۵ مخزن نیم تنی و با ۵۰ بچه ماهی در هر مخزن به مدت ۴۸ روز انجام شد. آب مورد نیاز از چاه موجود در انستیتو تامین شد. دبی آب ورودی هر مخزن ۵۰۰ لیتری با حجم آگیری ۴۰۰ لیتر، ۲ لیتر در دقیقه (معادل ۰/۰۳ لیتر بر ثانیه) بود. میزان تعویض آب در هر مخزن بین ۶ تا ۷ بار در طول شبانه روز بود. هوادهی نیز از طریق سیستم هواده کمپرسور مرکزی و با دیفیوزرهای صفحه‌ای انجام شد. از بین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب، اکسیژن محلول به عنوان فراسنجه کلیدی کیفیت آب (North et al., 2006)، دما و PH Wuertz

گروه پنجم (تیمار ۴) نیز غذای تجاری دریافت کرد. آزمایش در ۱۵ مخزن نیم تنی و با ۵۰ بچه ماهی در هر مخزن به مدت ۴۸ روز انجام شد. آب مورد نیاز از چاه موجود در انستیتو تامین شد. دبی آب ورودی هر مخزن ۵۰۰ لیتری با حجم آگیری ۴۰۰ لیتر، ۲ لیتر در دقیقه (معادل ۰/۰۳ لیتر بر ثانیه) بود. میزان تعویض آب در هر مخزن بین ۶ تا ۷ بار در طول شبانه روز بود. هوادهی نیز از طریق سیستم هواده کمپرسور مرکزی و با دیفیوزرهای صفحه‌ای انجام شد. از بین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب، اکسیژن محلول به عنوان فراسنجه کلیدی کیفیت آب (North et al., 2006)، دما و PH Wuertz

جدول ۱- میانگین شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب در گروه‌های آزمایشی مختلف در دوره پرورش (میانگین \pm خطای استاندارد)

شاخص‌ها	تیمارها	دو هفته اول	دو هفته دوم	دو هفته سوم
اکسیژن (mg/l)		۶/۹۴±۰/۱۱	۶/۸۹±۰/۱۲	۶/۹۲±۰/۱۱
اشباعیت اکسیژن (%)		۷۷/۶۳±۱/۴۱	۷۶/۷۰±۱/۳۶	۷۶/۸۹±۱/۲۶
دما (°C)		۲۰/۳۸±۰/۱۴	۲۰/۳۸±۰/۱۴	۲۰/۲۴±۰/۱۳
اسیدیته آب		۸/۲۸±۰/۰۲	۸/۲۵±۰/۰۳	۸/۲۶±۰/۰۲

۴۰ درجه سانتی‌گراد و pH اولیه ۷/۱ انجام شد. در طول هیدرولیز، مخلوط به طور مداوم توسط همزن مکانیکی مخلوط شد. برای متوقف کردن واکنش آنزیمی، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از خنک شدن و فیلتراسیون اولیه با پارچه توری، محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت $4000 \times g$ سانتریفیوژ شد. مایع باقی‌مانده به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد.

مواد اولیه خمیری شده با چرخ گوشت صنعتی (Pars Esfahan, GM32, Esfahan, Iran) با مش ۲ میلی‌متر چرخ شده و رشته‌های حاصل در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. آنالیز تقریبی شامل پروتئین خام، چربی خام، فیبر خام، خاکستر، ماده خشک و انرژی خالص جیره‌های آزمایشی و جیره شاهد طبق روش‌های (AOAC, 1990) اندازه‌گیری شد.

ضایعات (امعاء و احشاء) منجمد فیل ماهی پرورشی از انستیتو تحقیقات بین‌المللی دریای خزر و شرکت آبی گستران ساعی (مازندران، ساری) تهیه و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از یونولیت و یخ به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی پژوهشکده آرتیمیا و آبی‌پروری (ارومیه) منتقل شدند. برای افزایش کارایی هیدرولیز و دسترسی آنزیم‌ها، ضایعات با چرخ گوشت بزرگ خرد و به کیسه‌های پلاستیکی منتقل شدند. سپس در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده (طی یک هفته) نگهداری شدند.

ضایعات با استفاده از چرخ گوشت محلی به صورت خمیری درآمدند و به روش اتولیزی (et al., 2022) (Nikoo) هیدرولیز شدند. ضایعات خرد شده با آب مقطر (نسبت ۱ به ۱) مخلوط و به مدت ۲ دقیقه با هموژنایزر همگن‌سازی شدند. هیدرولیز به مدت ۱ ساعت در دمای

به طور تصادفی خونگیری شد. خونگیری با سرنگ ۵ سی‌سی از طریق ورید ساقه دمی (پشت باله مخرجی) با حداقل دستکاری و استرس انجام شد. برای خونگیری از مواد بیهوش‌کننده استفاده نشد، زیرا احتمال تأثیر بر شاخص‌های خونی وجود داشت (Torrecillas *et al.*, 2007; Torrecillas *et al.*, 2011). ۱/۵ سی‌سی از خون جمع‌آوری شده در ویال‌های اپندورف بدون هپارین برای جداسازی سرم ریخته شد. خون در ویال‌های میکروتیوب (بدون هپارین) با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم با سمپلر به ویال‌های جدید منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آماده‌سازی و اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی خونی در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر و آزمایشگاه تخصصی ویرومد (گیلان-رشت) انجام شد.

جیره‌های مختلف با مقادیر متفاوت پودر ماهی و پروتئین هیدرولیز طبق نیازهای غذایی بچه ماهیان فرموله و ساخته شدند. پروتئین هیدرولیز در سطوح ۲/۷۵، ۵/۵ و ۸/۲۵ درصد به جای پودر ماهی جایگزین شد (جدول ۲). جیره بدون پروتئین هیدرولیز به عنوان شاهد (کنترل منفی) و جیره غذایی یکی از کارخانجات معتبر داخلی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. به منظور بررسی رشد و محاسبه دقیق غذای مورد نیاز، هر ۱۵ روز یک‌بار زیست‌سنجی انجام شد. غذادهی بر حسب دمای آب و میانگین وزنی، ۳ تا ۴ درصد وزن بدن در سه نوبت صبح، ظهر و عصر به صورت دستی انجام شد. قبل از غذادهی، آب حوضچه‌ها سیفون می‌شد تا غذای باقی‌مانده و فضولات خارج شوند.

خونگیری و تهیه سرم

در پایان دوره پرورش، برای ارزیابی شاخص‌های خونی و سرمی، از ۳ ماهی از هر تکرار از تمامی گروه‌های آزمایشی

جدول ۲- اجزا و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی برای تغذیه بچه فیلم‌ماهیان (*H. huso*)

اجزای غذایی	شاهد (%)	تیمار ۱ (%)	تیمار ۲ (%)	تیمار ۳ (%)
پودر ماهی	۵۵	۵۲/۲۵	۴۹/۵	۴۶/۷۵
پروتئین هیدرولیز شده	۰	۲/۷۵	۵/۵	۸/۲۵
گلوتن گندم	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳
شیر خشک	۵	۵	۵	۵
آرد گندم	۶	۶	۶	۶
کنجاله سویا	۸	۸	۸	۸
روغن ماهی	۵/۵	۵/۵	۵/۵	۵/۵
لیستین سویا	۲	۲	۲	۲
ویتامین E	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶
مکمل ویتامینی	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
لیزین	۲	۲	۲	۲
متیونین	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸
دی کلسیم فسفات	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴
بتائین	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
جمع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی				
ترکیب شیمیایی (درصد)	شاهد (%)	تیمار ۱ (%)	تیمار ۲ (%)	تیمار ۳ (%)
پروتئین خام	۵۳/۵۴	۵۳/۷۹	۵۳/۹۱	۵۲/۴۶
چربی خام	۱۷/۲۹	۱۷/۶۵	۱۶/۹۳	۱۲/۳۵
فیبر خام	۱/۲۶	۱/۳۶	۱/۵۸	۱/۲۸
خاکستر	۸/۹۶	۸/۳۸	۸/۶۶	۱۲/۵۸
ماده خشک	۹۳/۱۲	۹۳/۱۶	۹۳/۰۶	۹۲/۰۹
انرژی (کیلو کالری/کیلوگرم)	۵۵۶۵/۳۸	۵۴۳۸/۷۸	۵۲۸۳/۵۲	۵۰۴۱/۰۶

کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS-26 و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel-2010 استفاده شد. به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه در سطح اطمینان ۰/۰۵ و پس از بررسی همگنی داده‌ها در گروه‌ها با آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد.

۳ | نتایج

نتایج پارامترهای بیوشیمیایی خون، در جدول ۳ نشان داده شد. براساس نتایج میزان گلوکز سرم، در بین گروه‌های آزمایشی روند کاهشی داشته است به طوری که تیمارهای ۳ و ۴ کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($p < 0.05$)، اما بین تیمارهای ۱ و ۲ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$). براساس نتایج به دست آمده، میزان پروتئین کل خون در تیمار ۲ با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به سایر گروه‌ها (به استثناء تیمار ۳) بالاترین میزان را نشان داد. بر اساس نتایج این مطالعه، اختلاف معنی‌داری از نظر میزان آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز سرم خون، در گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد ($p > 0.05$). در این تحقیق مشخص شد که میزان کلسترول خون، در گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌دار را نشان نداد ($p > 0.05$). براساس نتایج به دست آمده، در میزان چربی کل سرم بین گروه شاهد با تیمارهای ۱، ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). اما تیمار ۲ با اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها بالاترین میزان چربی را داشت ($p < 0.05$).

نتایج شاخص‌های ایمنی خون در شکل ۱ نشان داده شد. مقادیر حاصل از بررسی شاخص‌های ایمنی نشان داد که از نظر میزان ایمنوگلوبولین کل بین گروه شاهد و تیمار ۱ و ۴ و بین تیمار ۲ و ۳ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p > 0.05$) اما بین تیمارهای ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$) و تیمار ۲ بالاترین

سنجش پروتئین کل سرم با روش Modi- Biuret با استفاده از کیت زیست شیمی و با دستگاه اتوآنالایزر مدل (BT-1500 Biotecnica Instruments, Italy) اندازه گیری گردید (Soltani *et al.*, 2010). به منظور تعیین چربی کل از روش فتومتر استفاده شد. در این روش، سرم را با اسید غلیظ جوشانده و سپس با معرف فسفووالینیک مخلوط گردید. در واکنش سولفو فسفو وانیلین، لیپیدها به رنگ صورتی در آمده که پس از آن در طول موج ۵۴۶ نانومتر با محلول استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت. سنجش آنزیم‌های کبدی (AST, ALT و ALP) به روش نورسنجی، میزان گلوکز به روش آنزیمی- نورسنجی و میزان کلسترول به روش آنزیمی- کالریمتری و با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون (کرج) و دستگاه اتو آنالایزر (BT-1500, Biotecnica Instruments, Italy) انجام پذیرفت.

فعالیت کمپلمان جایگزین (ACH50) با روش نورسنجی و همولیز سلول‌های قرمز خون خرگوش (RaRBC; TCS Biociences. Botolph clydon, UK) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه فعالیت کمپلمان منحنی لیز ترسیم شد. حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود، فعالیت کمپلمان تعریف می‌شود و از رابطه زیر به دست می‌آید.

$$\text{ACH50 (U/ml)} = k \times 0.5 \times (\text{فاکتور رقت})$$

در این رابطه K مقدار سرمی (برحسب میلی‌لیتر) است که باعث ۵۰ درصد همولیز می‌شود و ۰/۵ ضریب تصحیح است (Yano, 1992).

میزان ایمنو گلوبولین M (IgM) در نمونه‌های سرم به روش الایزا با استفاده از کیت Binding Site اندازه‌گیری گردید (Yeh *et al.*, 2008). غلظت لیزوزیم سرم خون نیز با استفاده از روش کدورت سنجی براساس روش Ellis (1990) تعیین شد. در این روش ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococous lysodeikticus*) با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر سیترات سدیم ۰/۰۲ مولار با pH برابر با ۵/۵ به ۱۵ میکرولیتر نمونه سرمی در چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر بلافاصله به مدت ۵ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه‌ای قرائت گردید.

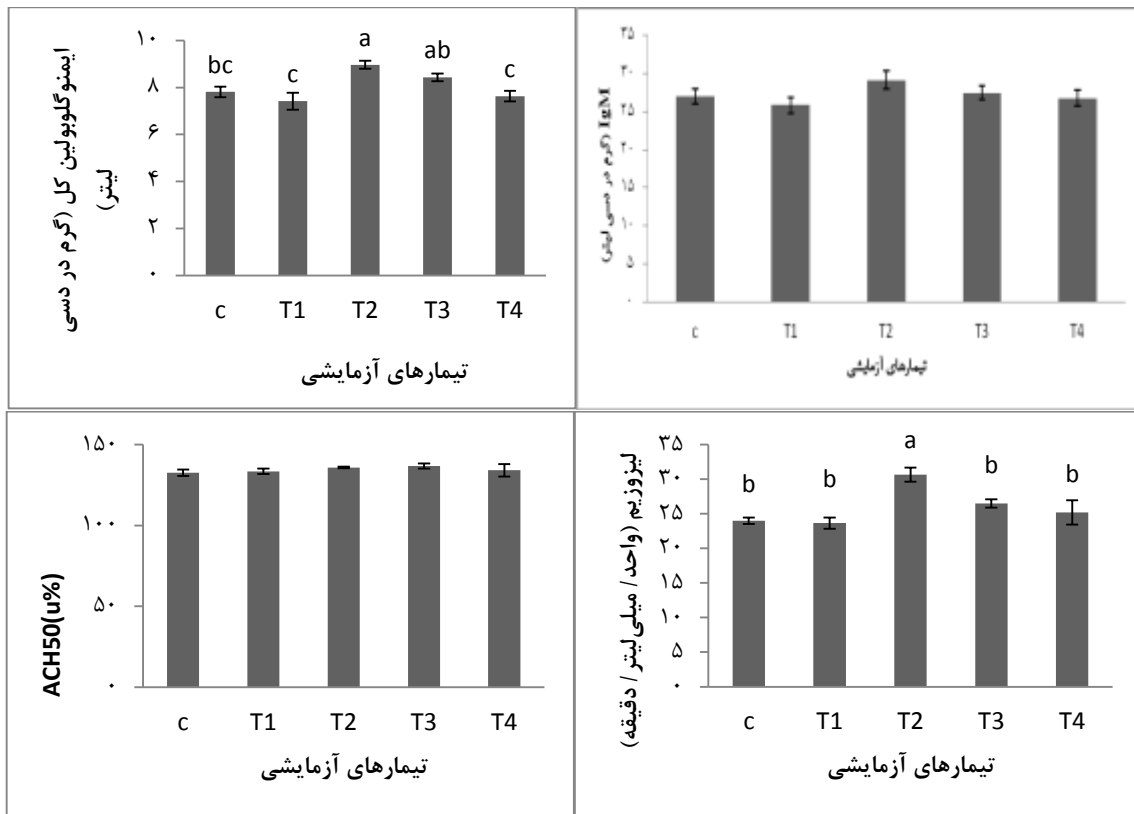
بین گروه شاهد و تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$)، با وجود این تیمار ۲ بالاترین میزان IgM را داشت.

میزان را نشان داد. در سطوح لیزوزیم در گروه شاهد نسبت به تیمارهای ۱، ۳ و ۴ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$) اما تیمار ۲ با اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها دارای بالاترین میزان بود ($p < 0.05$). در سطوح IgM و فعالیت کمپلمان جایگزین

جدول ۳- فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم فیل ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی برای ۴۸ روز (میانگین \pm خطای استاندارد)

شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
گلوکز (mg/dl)	۶۳/۳۳ \pm ۳/۲۷ ^{ab}	۶۵ \pm ۱/۴۶ ^{ab}	۵۹/۵ \pm ۲/۵۹ ^b	۵۹ \pm ۳/۱۸ ^b
پروتئین کل (gr/dl)	۱/۰۶ \pm ۰/۰۶ ^c	۱/۳۷ \pm ۰/۰۳ ^a	۱/۲۵ \pm ۰/۰۳ ^{ab}	۱/۱۱ \pm ۰/۰۷ ^c
ALT (u/l)	۱۹/۳۳ \pm ۲۵/۲۷	۲۳ \pm ۱۶/۰۷	۲۲/۱۶ \pm ۱۳/۷۲	۲۰/۲۰ \pm ۲۶/۲۷
AST (u/l)	۲۱۶/۵۰ \pm ۷/۳۹	۲۳۱/۶۷ \pm ۴/۰۸	۲۳۰/۵۰ \pm ۵/۰۲	۲۲۹ \pm ۴/۴۰
ALP (u/l)	۳۳۵/۱۷ \pm ۲۵/۲۷	۳۵۱ \pm ۱۶/۰۷	۳۴۷ \pm ۱۳/۷۲	۳۷۹/۶۰ \pm ۲۶/۲۶
کلسترول (mg/dl)	۷۴/۶۷ \pm ۲/۵۸	۸۱/۱۷ \pm ۱/۸۶	۷۱ \pm ۶/۲۹	۷۱/۶۰ \pm ۸/۰۰۳
چربی کل	۳۵۰/۸۳ \pm ۴۳/۷۲ ^b	۴۶۸/۳۳ \pm ۶/۰۱ ^a	۳۷۴ \pm ۴۴/۳۷ ^b	۳۶۲/۲۰ \pm ۵۱/۹۴ ^b

*اعداد (میانگین خطای \pm استاندارد) با حروف متفاوت در هر ردیف اختلاف معنی‌دار آماری دارند ($p < 0.05$)



شکل ۱- میانگین (خطای استاندارد) فراسنجه‌های ایمنی (فعالیت ایمنوگلوبولین کل، IgM، لیزوزیم و ACH50 بچه فیل ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین هیدرولیز شده ماهی از هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی تولید می‌شود که به دلیل عملکرد مطلوب و ویژگی‌های تغذیه‌ای، مورد توجه قرار گرفته است (Siddik et al., 2018). شناسایی میزان مناسب پروتئین هیدرولیز شده برای استفاده در جیره غذایی، از راه بررسی آثار آن بر گونه‌های مختلف ماهی ضروری است. بنابراین، این مطالعه به ارزیابی تأثیر جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده بر ترکیبات بیوشیمیایی سرم خون و سیستم ایمنی بچه فیل ماهیان پرورشی پرداخته است.

تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی سرم، اطلاعاتی در مورد تعاملات متابولیک و فیزیولوژیکی که در یک جاندار رخ می‌دهد، ارائه می‌کند. فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون می‌تواند منبعی برای ارزیابی وضعیت سلامتی، تشخیص کم خونی، مسمومیت‌ها، بیماری‌ها، کمبود مواد غذایی و فیزیولوژی ماهی باشد (Yousefian et al., 2011). در این بین، مقدار گلوکز خون را می‌توان به عنوان شاخصی برای بررسی استرس وارده ناشی از تغییرات فیزیولوژیک (شرایط محیطی، غذای نامناسب و مقادیر اضافه عناصر ریزمغذی، مواد معدنی، ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه اضافه در جیره غذایی) مورد استفاده قرار داد (Martinez et al., 1994). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان گلوکز در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشت و بچه فیل ماهیانی که از جیره حاوی پروتئین هیدرولیز شده تغذیه شده بودند، کاهش میزان گلوکز را نسبت به گروه شاهد نشان دادند. این نتیجه با یافته‌های مطالعه (Siddik et al., 2018) مطابقت دارد که نشان داد میزان گلوکز خون در ماهی باراموندی جوان (*Lates calcarifer*) که با رژیم غذایی حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد پروتئین هیدرولیز شده ماهی تون تغذیه شده بودند، به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. همچنین، در ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*)، تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی پروتئین هیدرولیز شده میگو و فیل ماهی تغذیه شده با پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا (Ebrahimzhadarabi et al., 2021)، سطح گلوکز خون به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (Khosravi et al., 2015b). با این حال، در مطالعه دیگری روی ماهی سیم دریایی قرمز، با تغذیه از جیره حاوی پروتئین

هیدرولیز شده ماهی، تفاوت معنی‌داری در سطح گلوکز خون مشاهده نشد (Bui et al., 2014). همچنین، در مطالعه دیگری روی ماهی پومپانو (*Trachinotus blochii*)، مشخص شد که در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده، تغییری در سطح گلوکز خون در مقایسه با گروه شاهد ایجاد نشد (Pham et al., 2022). علاوه بر این، در مطالعات دیگر، بر خلاف مطالعه حاضر، استفاده از پروتئین هیدرولیز شده باعث افزایش سطح گلوکز خون گربه ماهی (*Ompok pabda*) (Sezu et al., 2024; Suma et al., 2023) و تیلاپیای نیل (Kabir et al., 2024) شد. این اختلاف در نتایج را می‌توان به عوامل مختلفی از جمله منبع و سطح پروتئین هیدرولیز شده، اندازه و نوع گونه ماهی، شرایط آزمایشی و روش‌های نگهداری نسبت داد، زیرا می‌توانند به شدت بر وضعیت فیزیولوژیکی ماهی تأثیر بگذارند (Chatzifotis et al., 2010; Pham et al., 2022).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان چربی کل خون در بین گروه‌های آزمایشی روند و الگوی مشخصی نداشت، به طوری که در فیل ماهیان تیمار ۱، ۳ و ۴ نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما تیمار ۲ میزان چربی کل خون به طور معنی‌داری از سایر گروه‌ها بیشتر بود. در مطالعات انجام شده روی ماهی باراموندی (*Lates calcarifer*) (Chaklader et al., 2020)، سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Bui et al., 2014) و فلاندر زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) (Khosravi et al., 2015a) پروتئین هیدرولیز شده تغییر معنی‌داری در میزان تری‌گلیسرید خون نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان کلسترول در تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. در مطابقت با نتایج مطالعه حاضر، کلسترول سرم تحت تأثیر پروتئین هیدرولیز شده در باراموندی (*Lates calcarifer*) (Chaklader et al., 2020)، سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Bui et al., 2014) و فلاندر زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) (Khosravi et al., 2015a) تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. برخلاف نتایج این مطالعات، پروتئین هیدرولیز شده توانست سطح کلسترول

در خون بچه فیل‌ماهیانی که با پروتئین هیدرولیز شده تغذیه شدند، می‌تواند ناشی از هضم‌پذیری پروتئین (Hevrøy *et al.*, 2005; Khosravi *et al.*, 2015a) وجود زنجیره‌های پپتیدی با وزن مولکولی کم (Aksnes *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2012) و احتمالاً اسیدهای آمینه آزاد، مولکول‌های دی و تری پپتید در پروتئین هیدرولیز شده (Sezu *et al.*, 2024) و تعادل اسیدهای آمینه ضروری در رژیم غذایی (Mach and Nortvedt, 2011) باشد. همچنین، سطح بالای پروتئین کل سرم می‌تواند نشان‌دهنده سیستم ایمنی ذاتی قوی‌تر باشد (Rebl and Goldammer, 2018).

آنزیم‌های کبدی سرم جهت بررسی پاسخ‌های فیزیولوژی و آسیب کبدی ماهیان استفاده می‌شود (Zheng *et al.*, 2013). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آنزیم‌های کبدی خون تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد تغییری نکرد. در مطابقت با نتایج مطالعه حاضر، در تحقیقی روی ماهی پومپانو مشخص شد که آنزیم‌های ALT و AST در بین تیمارهای مختلف مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نداشتند (Pham *et al.*, 2022). همچنین، اختلاف معنی‌داری در AST سرم با افزودن پروتئین هیدرولیز شده ماهی به جیره سیم دریایی قرمز و باراموندی جوان مشاهده نشد (Siddik *et al.*, 2019; Khosravi *et al.*, 2015a; Chaklader *et al.*, 2020). همچنین، فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT و AST فیل ماهی تحت تاثیر پروتئین هیدرولیز شده کانولا قرار نگرفت (Ebrahimnezhadarabi *et al.*, 2021). با این حال، ماهی کروکر زردی (*Larimichthys crocea*) که با جیره غذایی حاوی ۴۰ درصد پروتئین هیدرولیز شده تغذیه شده بود، سطوح AST بالاتری نسبت به گروه شاهد داشت (Cai *et al.*, 2015). ثبات سطوح آنزیم‌های کبدی حاکی از آن است که پروتئین هیدرولیز شده توسط بچه فیل ماهیان مورد مطالعه به خوبی تحمل شد و سطوح پروتئین هیدرولیز شده ماهی در جیره غذایی آسیب کبدی در بچه فیل ماهیان مورد مطالعه ایجاد نکرد. فعالیت لیزوزیم (فاگوسیت‌های فعال)، اجزای سیستم کمپلمان و مولکول‌های آنتی‌بادی مانند ایمنوگلوبولین‌ها به عنوان فراسنجه‌های مهم در دفاع ایمنی ماهی در نظر گرفته می‌شوند (Saurabh and Sahoo, 2008; Magnadottir, 2006). لیزوزیم در ماهی علیه عفونت-

را در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Kabir *et al.*, 2024) به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در فیل ماهی تغذیه‌شده با پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کانولا روند کاهشی را نشان داد (Ebrahimnezhadarabi *et al.*, 2021). از آنجایی‌که کلسترول یک متابولیت ضروری برای ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای ماهیان است (Jia *et al.*, 2018) و می‌تواند تحت‌تاثیر منابع پروتئینی در رژیم غذایی آنها قرار گیرد (Chaklader *et al.*, 2020)، به دلیل عدم تغییر معنی‌دار کلسترول در فیل ماهیان مورد مطالعه، احتمالاً پروتئین هیدرولیز شده تأثیر منفی بر متابولیسم چربی این ماهی نداشت.

بر پایه نتایج به دست آمده، بچه فیل ماهیان تیمارهای ۲ و ۳ افزایش میزان پروتئین کل سرم را نشان دادند. مطابق با این نتایج، پروتئین هیدرولیز شده پروتئین کل سرم گربه‌ماهی مولد (*Ompok pabda*) (Sezu *et al.*, 2024) و باراموندی جوان (Chaklader *et al.*, 2020; Chaklader *et al.*, 2021) را افزایش داد. همچنین، در ماهی گیش بزرگ (*Caranx ignobilis*) استفاده از ۳۰ و ۶۰ گرم در کیلوگرم پروتئین هیدرولیز شده ماهی و میگو باعث افزایش پروتئین کل سرم شد، اما در غلظت ۹۰ گرم در کیلوگرم پروتئین هیدرولیز شده باعث کاهش پروتئین کل سرم گردید (Nguyen *et al.*, 2023). برخلاف نتایج مطالعه حاضر، میزان پروتئین کل در ماهیان پومپانو تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی ۱۲۰ گرم در کیلوگرم مکمل پروتئین هیدرولیز شده تون ماهی (Pham *et al.*, 2022)، فلاندر زیتونی (*Paralichthys olivaceus*) (Khosravi *et al.*, 2015a) ۴۴ گرم در کیلوگرم پروتئین هیدرولیز شده ماهی و تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Kabir *et al.*, 2024) تغذیه‌شده با ۵/۰-۲ درصد پروتئین هیدرولیز شده ماهی به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین، مشاهدات مطالعه حاضر با نتایج مشاهده شده در باراموندی (Siddik *et al.*, 2018) و ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) (Murray *et al.*, 2003) که در آن پروتئین کل سرم اختلاف معنی‌داری را در بین ماهیان تغذیه شده با پروتئین هیدرولیز شده نشان نداد، مطابقت ندارد. در مطالعه حاضر، محتوای بالاتر پروتئین

ایمنوگلوبولین در گروه‌های پروتئین هیدرولیز شده به طور معنی داری بالاتر بود (Bui *et al.*, 2014). با این حال، در توربوت (Zheng *et al.*, 2013)، تیلایپای موزامبیک (Goosen *et al.*, 2015) و سیم دریایی قرمز (Bui *et al.*, 2014)، تغذیه با منابع مختلف پروتئین هیدرولیز شده تاثیری بر فعالیت لیزوزیم نداشت. عملکرد پروتئین هیدرولیز شده در جیره به عوامل مختلفی از جمله میزان و نوع سایر اقلام غذایی خوراک بستگی دارد، بطوری که مشخص شد میزان بالای پودر ماهی در خوراک سبب پوشاندن اثر پپتیدها در جیره غذایی خواهد شد (Xu *et al.*, 2016). پیشنهاد شده است که تأثیر پروتئین هیدرولیز شده بر سیستم ایمنی ماهی ممکن است به اندازه و غلظت پپتیدها وابسته باشد. پروتئین هیدرولیز شده ماهی حاوی پپتیدهای با اندازه متوسط و کوچک (طیف وزن مولکولی ۵۰۰-۳۰۰۰ دالتون) ایمنی غیر اختصاصی ماهی را تحریک می کند (Bøgdwald *et al.*, 1996; Gildberg *et al.*, 1996; Leduc *et al.*, 2018).

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده با پودر ماهی در جیره غذایی، نه تنها تأثیر منفی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و سیستم ایمنی فیل ماهیان جوان نداشت، بلکه در سطوح ۲/۷۵ تا ۵/۵ درصد جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده با پودر ماهی بهبود وضعیت سلامت و ایمنی ماهیان مشاهده شد.

۵ | ملاحظات اخلاقی

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

REFERENCES

- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B.T. and Albrektsen, S. 2006. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 261(1): 305-317.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition, Association of Official Analytical Chemist, Washington DC. USA.
- Blander, J.M. 2017. The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. *Immunological reviews*, 277(1): 158-173.

های ویروسی، باکتریایی و انگلی عمل می‌کند و سطح بالاتری از فعالیت در خون ماهی به‌عنوان پاسخی به عفونت مشاهده می‌شود (Puangkaew, 2004). همچنین، فعالیت لیزوزیم به عنوان جزء دفاعی ضروری برای همه مهره‌داران و بی‌مهرگان وجود دارد (Song *et al.*, 2006). فعالیت کمپلمان ماهی (ACH50) برای مبارزه با ارگانسیم‌های خارجی و تخریب سلول‌های خارجی، شناخته شده است (Gasque, 2004). ایمنوگلوبولین‌ها به‌عنوان یکی از پارامترهای اصلی محافظت بدن برای حیوانات و انسان‌ها، به‌ویژه برای ماهیان استخوانی در نظر گرفته می‌شوند (Ross *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 2001; Cuesta *et al.*, 2004). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فیل ماهیانی که از جیره حاوی ۵/۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده تغذیه کردند، ایمنوگلوبولین کل، IgM و فعالیت لیزوزیم از سایر گروه‌ها بالاتر بود. در مطابقت با تحقیق حاضر، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که جایگزینی جزئی پودر ماهی با پودر پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند سیستم ایمنی ماهی را تقویت کند (Liang *et al.*, 2006; Kotzamanis *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008; Bui *et al.*, 2014; Chaklader *et al.*, 2020). در باس دریایی ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*)، گزارش شده است که افزودن ۱۵ و ۲۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده به رژیم غذایی، فعالیت لیزوزیم و فعالیت همولیتیک کمپلمان را به طور معنی داری افزایش داد (Liang *et al.*, 2006). ایمنوگلوبولین M، فعالیت لیزوزیم و کمپلمان C4 در ماهیانی که با رژیم‌های حاوی ۱۰ و ۱۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده تغذیه می‌شدند، به‌طور معنی داری نسبت به کروکهای زرد بزرگ که با رژیم پایه یا رژیم حاوی ۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده تغذیه می‌شدند، بیشتر بود (Tang *et al.*, 2008). فعالیت افزایش یافته لیزوزیم در بچه ماهی باراموندی (*Lates calcarifer*) که با رژیم غذایی حاوی پودر فرآورده جانبی طیور همراه با ۱۰ درصد پروتئین هیدرولیز شده ماهی تون تغذیه شده بودند، در مقایسه با رژیم شاهد مبتنی بر پودر ماهی مشاهده شد (Siddik *et al.*, 2019). در بچه ماهی سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) که با پروتئین هیدرولیز شده تغذیه شده بودند، بهبود فعالیت لیزوزیم مشاهده شد و سطح

- applications: a review. Food chemistry, 135(4):3020-3038.
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Papaioannou, N., Pavlidis, M., Nengas, I., Mylonas, C.C. 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. Aquaculture, 307(1-2): 65-70.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban MA. 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 101: 203–210.
- Ebrahimzadharabi, M.R., Changizi, R., Hoseinifard, S.M., Vatandoust, S., Ghobadi, S. 2021. Effects of canola protein hydrolysate (CPH) on growth performance, blood biochemistry, immunity, and gastrointestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 20(4): 1165-1178.
- Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. In: Techniques in Fish Immunology, vol. 1 (Eds) J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Robertson, W.B. Van Muiswinkel, SOS Publications, Fair Haven, USA. pp:101-103.
- Gasque, P., 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. Molecular immunology, 41(11):1089-1098.
- Gildberg, A., Bøggwald, J., Johansen, A., Stenberg, 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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 114(1): 97-101.
- Goosen, N.J., De Wet, L.F. and Görgens, J.F. 2015. Comparison of hydrolysed proteins from different raw materials in diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. Aquaculture international. 23:1165-1178.
- Hardy, R.W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. Aquaculture research, 41(5):770-776.
- Havrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish
- Bøggwald, J., Dalmo, R.O.Y., leifson, R.M., stenberg, E., Gildberg, A. 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 & Shellfish Immunology, 6(1): 3-16.
- Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Hérault, M. and 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.
- Bronzi, P., Chebanov, M., Michaels, J.T., Wei, Q., Rosenthal, H. and Gessner, J., 2019. Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017. Journal of Applied Ichthyology, 35(1):257-266.
- Cai, Z., Li, W., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Ai, Q., 2015. Effects of dietary size-fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. Aquaculture, 440: 40-47.
- Chaklader, M.R., Fotedar, R., Howieson, J., Siddik, M.A., Foysal, M.J. 2020. The ameliorative effects of various fish protein hydrolysates in poultry by-product meal based diets on muscle quality, serum biochemistry and immunity in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. Fish & Shellfish Immunology, 104: 567-578.
- Chaklader, M.R., Fotedar, R., Howieson, J., Siddik, M.A., Foysal, M.J. 2020. The ameliorative effects of various fish protein hydrolysates in poultry by-product meal based diets on muscle quality, serum biochemistry and immunity in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. Fish & Shellfish Immunology, 104: 567-578.
- Chaklader, M.R., Howieson, J., Siddik, M.A., Foysal, M.J., Fotedar, R. 2021. Supplementation of tuna hydrolysate and insect larvae improves fishmeal replacement efficacy of poultry by-product in *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) juveniles. Scientific reports, 11(1): 4997.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and

- Lefevre-Scelles, A., Fournier, V., Gisbert, E., Andree, K.B., Henry, J. 2018. Dietary aquaculture by-product hydrolysates: impact on the transcriptomic response of the intestinal mucosa of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed low fish meal diets. BMC genomics. 19:1-20.
- Liang, M., Wang, J., Chang, Q., Mai, K. 2006. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). Aquaculture Research. 37(1):102-106.
- Mach, D.T.N. and Nortvedt, R., 2011. Free amino acid distribution in plasma and liver of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed increased levels of lizardfish silage. Aquaculture Nutrition. 17(2): 644-656.
- Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish & shellfish immunology. 20(2): 137-151.
- Martinez, F.J., Garcia-Riera, M.P., Ganteras, M., De Costa, J., Zamora, S. 1994. Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Simultaneous influence of various factors. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 107(1): 95-100.
- Masuda, Y., Jinbo, T., Imaizumi, H., Furuita, H., Matsunari, H., Murashita, K., Fujimoto, H., Nagao, J. and 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.
- 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(1-4): 643-653.
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V. 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. Applied Biochemistry and Microbiology. 36: 452-459.
- Nguyen, M.C., Fotedar, R., Pham, H.D. 2024. Effects of dietary hydrolysate supplementation on growth, body composition, hematological responses, and liver histology of juvenile giant trevally (*Caranx* protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture nutrition. 11(4):301-313.
- Javaherdoust, S., Yeganeh, S. and 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.
- Jia, Y., Gao, Y., Chen, X., Huang, B. 2018. Determination of optimal fasting time before blood sampling to get baseline data on serum biochemical characteristics in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture. 487: 83-88.
- Kabir, M.A., Nandi, S.K., Suma, A.Y., Abdul Kari, Z., Mohamad Sukri, S.A., Wei, L.S., Al Mamun, A., Seguin, P., Herault, M., Khoo, M.I., Téllez-Isaías, G. 2024. The Potential of Fish Protein Hydrolysate Supplementation in Nile Tilapia Diets: Effects on Growth and Health Performance, Disease Resistance, and Farm Economic Analysis. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1-23.
- Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Kim, S.S., Jeong, J.B., Lee, K.J. 2015a. 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.
- Khosravi, S., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Lee, C.R., Bui, H.T.D., Jeong, J.B., Lee, K.J., 2015b. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. Fish & shellfish immunology. 45(2): 858-868.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Infante, J.Z., 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 Part A: Molecular & Integrative Physiology. 147(1): 205-214.
- Leduc, A., Zatylny-Gaudin, C., Robert, M., Corre, E., Corguille, G.L., Castel, H.,

- Ross, D.A., Wilson, M.R., Miller, N.W., Clem, L.W., Warr, G.W., Ross, D.A., Wilson, M.R., Miller, N.W., Clem, L.W., Warr, G.W. 1998. Evolutionary variation of immunoglobulin μ heavy chain RNA processing pathways: origins, effects, and implications. *Immunological reviews*. 166(1): 143-151.
- Saurabh, S., Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*. 39(3): 223-239.
- Sezu, N.H., Nandi, S.K., Suma, A.Y., Kari, Z.A., Wei, L.S., Seguin, P., Hault, M., Hossain, M.S., Khoo, M.I., Eissa, E.S.H., Kabir, M.A. 2024. Ameliorative Effects of Different Dietary Levels of Fish Protein Hydrolysate (FPH) on Growth and Reproductive Performance, Feed Stability, Tissues Biochemical Composition, Haematobiochemical Profile, Liver Histology, and Economic Analysis of Pabda (*Ompok pabda*) Broodstock. *Aquaculture Research*. 2024: 1- 15.
- Siddik, M.A., Howieson, J., Fotedar, R. 2019. Beneficial effects of tuna hydrolysate in poultry by-product meal diets on growth, immune response, intestinal health and disease resistance to *Vibrio harveyi* in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Fish & shellfish immunology*. 89: 61-70.
- Siddik, M.A., Howieson, J., Partridge, G.J., Fotedar, R., Gholipourkanani, H., 2018. Dietary tuna hydrolysate modulates growth performance, immune response, intestinal morphology and resistance to *Streptococcus iniae* in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. *Scientific Reports*, 8(1): 15942.
- Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A. and Zargar, A. 2010. Effects of *Zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 5(4):191-199.
- Song, Z.F., Wu, T.X., Cai, L.S., Zhang, L.J., Zheng, X.D. 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang University Science B*. 7: 596-602.
- Suma, A.Y., Nandi, S.K., Abdul Kari, Z., Goh, K.W., Wei, L.S., Tahiluddin, A.B., Seguin, *ignobilis* Forsskal, 1775). *Journal of Fish Biology*. 104(1): 216-226.
- Nikoo, M., Benjakul, S., Ahmadi Gavlighi, H. 2022. Protein hydrolysates derived from aquaculture and marine byproducts through autolytic hydrolysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 21(6): 4872-4899.
- Ospina-Salazar, G.H., Ríos-Durán, M.G., Toledo-Cuevas, E.M., Martínez-Palacios, C.A. 2016. The effects of fish hydrolysate and soy protein isolate on the growth performance, body composition and digestibility of juvenile pike silverside, *Chirostoma estor*. *Animal Feed Science and Technology*. 220:168-179.
- Ovissipour, M., Abedian Kenari, A., Nazari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., 2014. Tuna viscera protein hydrolysate: nutritive and disease resistance properties for Persian sturgeon (*Acipenser persicus* L.) larvae. *Aquaculture Research*. 45(4): 591-601.
- Peres, H., Santos, S., Oliva-Teles, A. 2014. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 40: 1339-1347.
- Pham, H.D., Siddik, M.A., Le, H.M., Ngo, M.V., Nguyen, M.V., Francis, D. 2022. Effects of dietary tuna viscera hydrolysate supplementation on growth, intestinal mucosal response, and resistance to *Streptococcus iniae* infection in pompano (*Trachinotus blochii*). *Aquaculture nutrition*. 2022: 1- 14.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish & shellfish immunology*, 16(1): 25-39.
- Rebl, A., Goldammer, T. 2018. Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish & shellfish immunology*, 77: 328-349.
- Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H. 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*. 239(1-4): 331-349.

- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M. 2001. Isolation and partial characterisation of immunoglobulin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* Castelnau. *Fish & shellfish immunology*, 11(6): 491-503.
- Xu, H., Mu, Y., Zhang, Y., Li, J., Liang, M., Zheng, K., Wei, Y. 2016. Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): effects on growth performance and lipid accumulation. *Aquaculture*, 454: 140-147.
- Yano T. 1996. Non-specific immune system: humoral defense. In: The Fish Immune System. Iwama G. and Nakanishi T. (eds). Academic Press. 106-159.
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H., Cheng, W. 2008. Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & shellfish immunology*, 25(1-2): 19-27.
- Yousefian M., Sheikholeslami Amiri M., Kor, D. 2011. Serum Biochemical Parameter of Male, Immature and Female Persian Sturgeon (*Acipenser Persicus*). *Fisheries Journal, Islamic Azad University, Azadshahr Branch*, 6(4): 9-14. (In Persian).
- 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(3): 297-303.
- Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J. and Chang, Q. 2013. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture Research*, 44(6): 895-902.
- P., Herault, M., Al Mamun, A., Téllez-Isaías, G., Anamul Kabir, M. 2023. Beneficial effects of graded levels of fish protein hydrolysate (FPH) on the growth performance, blood biochemistry, liver and intestinal health, economics efficiency, and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* of pabda (*Ompok pabda*) fingerling. *Fishes*, 8(3): 147.
- 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 B*, 9(9): 684-690.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Ginés, R., Sweetman, J., Izquierdo, M. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 17(2):223-233.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M.S. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(5): 969-981.
- Wang, Y., Kong, L.J., Li, C., Bureau, D.P. 2006. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and carcass composition of cuneate drum (*Nibea miichthioides*). *Aquaculture*, 261(4):1307-1313.
- Watanabe, T.A.K.E.S.H.I. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science*, 68(2): 242-252.

نحوه استناد به مقاله:

حسین پور زلتی ع، آدینه ح، جلیل پور رودکلی ج. ایمنی تملی. تأثیر جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده با پودر ماهی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون و سیستم ایمنی بچه فیل ماهی پرورشی. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۳. ۱۲(۱): ۸۴-۷۱.

Hosseinpour Zelaty A., Adineh H., Jalilpour Rodkali J. Effects of replacing fishmeal with hydrolyzed protein on blood serum biochemical parameters and immune system of cultured beluga (*Huso huso*) fry. *Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous*. 2024, 12(1): 71-84.

Effects of replacing fishmeal with hydrolyzed protein on blood serum biochemical parameters and immune system of cultured beluga (*Huso huso*) fry

Hosseinpour Zelaty A^{1*}, Adineh H², Jalilpour Rodkali J³.

^{1,3} International Caspian Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Rasht, Iran.

² Associate Professor of Fisheries Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Gonbad Kavos, Iran.

Type: Original Research Paper	Abstract The study investigated the effects of substituting fishmeal with different levels of hydrolyzed protein on the serum biochemical composition and immune system of beluga (<i>Huso huso</i>) fry over a 48-day period. A total of 750 fish were randomly assigned to five groups: a control group (no hydrolyzed protein), three groups with varying levels of hydrolyzed protein (2.75%, 5.5%, and 8.25%), and a positive control group (commercial feed). The study found significant differences in glucose levels among the groups, with the control group having the highest glucose level. Treatment 2 had the highest total protein and lipid levels, which significantly differed from the other groups. Liver enzyme levels (ALT, AST and ALP) did not vary significantly among the groups. There were no significant differences in cholesterol levels. Regarding immune factors, treatment 2 exhibited significantly higher total immunoglobulin levels compared to all other groups except for treatment 3. Lysozyme levels did not differ significantly between the control group and treatments 1, 3, and 4; however, treatment 2 displayed the highest level. IgM and ACH50 activity did not differ significantly across all groups. In conclusion, replacing fishmeal with hydrolyzed protein at a concentration of 2.75% to 5.5% improved performance in blood biochemical and immune parameters of beluga fry when compared to the control group. Keywords: Hydrolyzed protein, Beluga, Serum biochemical parameters, Liver enzymes, Immunity
Paper History: Received: 31-03-2024 Accepted: 04-08- 2024	
Corresponding author: Hosseinpour zelaty A. International Caspian Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Rasht, Iran. Email: ahpour.z@gmail.com	