



Study of the effects of canola bioactive peptides, prebiotics and probiotics on growth indices, blood biochemical indices and intestinal bacterial population of Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius kessler*)

Abdullah Mohammad Jafari¹, Ali Taheri Mirqaed^{1*}, Morteza Yousefi¹, Hossein Ali Ebrahimzadeh Mousavi¹ and Seyyed Morteza Hosseini¹

1. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran

Received Date:2025.12.22 Accepted Date:2026.03.01

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of canola bioactive peptides, prebiotics and probiotics on growth, blood biochemical and intestinal bacterial population indices of Caspian Sea salmon. 300 Caspian Sea salmon with an average initial weight of 10 g were allocated to each fiberglass tank in a completely randomized design with 5 treatments, 3 replications and 20 fish. The fish were fed with control treatment, 500 mg prebiotic, 1 g probiotic, 500 mg and 1 g bioactive peptides per kg of feed for 56 days. The results of the experiment showed that the fish fed with canola bioactive peptides treatment had significantly better final weight, feed conversion ratio and survival rate than other treatments ($p<0.05$). Also, in fish fed with canola bioactive peptides treatment, the concentration of immunoglobulins A and M and blood cortisol increased and decreased, respectively, compared to other treatments ($p<0.05$). The number of Lactobacilli in the intestines of fish fed with canola bioactive peptides treatment increased compared to other treatments ($p<0.05$). Also, in fish fed with canola bioactive peptides, the number of intestinal coliforms decreased compared to other treatments ($p<0.05$). According to the results of the present study, canola bioactive peptides can be used as a functional food additive in the diet of Caspian salmon.

Keywords: Canola bioactive peptides, prebiotics, probiotics, intestinal lactobacilli count, immunoglobulins A and M, cortisol, Caspian Sea salmon

* mirghaed@ut.ac.ir

EXTENDED ABSTRACT

Introduction:

The aquaculture industry continuously seeks functional feed additives to enhance growth, immunity, and disease resistance while reducing reliance on antibiotics. Bioactive peptides derived from plant protein hydrolysates have gained attention due to their low molecular weight, high absorbability, and biological properties including antioxidant, antimicrobial, and immunostimulatory effects. Canola meal is the second major oilseed product in many countries, but its use in aquafeed is limited by anti-nutritional factors such as sinapine, glucosinolates, phytate, and tannins. Enzymatic hydrolysis can convert canola protein into bioactive peptides, potentially improving its nutritional value. This study aimed to compare the effects of dietary canola bioactive peptides (at two levels), a prebiotic (AgriMOS), and a probiotic (Dipro) on growth indices, blood biochemical parameters (glucose, cortisol, IgA, IgM), and intestinal bacterial populations (total bacteria, *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli*) in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*).

Methods:

A total of 300 juvenile Caspian salmon with an average initial weight of 10 g were distributed in a completely randomized design comprising 5 treatments, 3 replicates per treatment, and 20 fish per 300 L fiberglass tank. The experimental treatments were: 1) Control (no additive), 2) Prebiotic (AgriMOS, containing β -glucan and mannan-oligosaccharides) at 500 mg/kg feed, 3) Probiotic (Dipro, containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, 3.2×10^9 cfu/g) at 1 g/kg feed, 4) Canola bioactive peptides at 500 mg/kg feed, and 5) Canola bioactive peptides at 1 g/kg feed. All additives were coated onto a commercial basal diet using fish oil. Fish were fed for 56 days. Canola bioactive peptides were produced via enzymatic hydrolysis (Alcalase) under optimized conditions (50 °C, pH 8, 4 h), followed by centrifugation, freeze-drying, and molecular weight distribution analysis using HPLC with a TSK gel column. Growth indices including body weight increase (BWI), specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), and survival rate were calculated. At the end of the trial, blood samples were collected from the caudal vein of 5 fish per replicate. Serum cortisol and immunoglobulins (IgA and IgM) were measured using ELISA kits, and glucose was measured by enzymatic-photometric method. Intestinal samples were taken for microbiological analysis (total count, *Lactobacillus*, *E. coli*) using selective media (MRS, Chromoagar, and count agar). Data were analyzed using GLM procedure in SAS, with Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Results:

The canola bioactive peptides had a molecular weight range of 180–3000 Da, comprising 54.90% di- and tripeptides (180–500 Da), 39.30% oligo- and polypeptides (500–>2500 Da), and 5.80% free amino acids (<180 Da). Both levels of canola bioactive peptides significantly improved growth and feed efficiency compared to the control, prebiotic, and probiotic groups ($p < 0.05$). The highest final weight (73.57 g and 58.68 g for 500 mg and 1 g/kg, respectively) and lowest FCR (1.16 and 1.10) were recorded in fish fed bioactive peptides. Mortality rate was lowest in the peptide groups (0.53% and 0.46%) compared to control (4.37%). Prebiotic and probiotic treatments also improved growth over control but were less effective than peptides. Fish fed canola bioactive peptides exhibited significantly lower serum glucose (121.7 and 120.35 mg/dL) and cortisol (33.0 and 33.9 ng/mL) compared to all other groups ($p < 0.05$). In contrast, serum IgM and IgA levels were significantly elevated in the peptide-fed fish (IgM: 2.95 mg/dL; IgA: 2.98 mg/dL) compared to control (IgM: 1.15, IgA: 2.25) and other treatments ($p < 0.05$). The prebiotic and probiotic groups showed intermediate values. The highest intestinal *Lactobacillus* counts were observed in fish fed canola bioactive peptides (3.54 and 3.56 log CFU/g) and probiotic (3.10 log CFU/g), all significantly higher than control (2.19 log CFU/g) ($p < 0.05$). Conversely, *E. coli* counts were significantly lower in peptide-fed groups (1.90 and 1.95 log CFU/g) compared to control (2.27 log CFU/g) ($p < 0.05$). Prebiotic and probiotic treatments also reduced *E. coli* but to a lesser extent. Total bacterial counts followed a similar trend.

Discussion and Conclusion:

The superior growth performance and FCR in fish fed canola bioactive peptides can be attributed to the high proportion ($\approx 55\%$) of di- and tripeptides, which are efficiently absorbed via intestinal peptide transporters (PepT1), enhancing nutrient uptake. The reduced cortisol levels indicate lower stress responses, possibly due to improved gut health and immunomodulation. The increase in serum IgM and IgA reflects stimulation of the humoral immune system, consistent with known bioactivities of plant-derived peptides. Furthermore, the prebiotic-like effect of these peptides promoting *Lactobacillus* and suppressing *E. coli* suggests a dual mechanism: direct antimicrobial action against pathogens and selective stimulation of beneficial commensals. Both tested levels (500 mg/kg and 1 g/kg) showed positive effects, with the lower dose being economically favorable. In conclusion, canola bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis are effective functional feed additives



Study of the effects of canola bioactive peptides, prebiotics and probiotics on growth indices, blood biochemical indices and intestinal bacterial population of Caspian Sea salmon

for Caspian Sea salmon, improving growth, immunity, stress indicators, and gut microbiota composition. They offer a promising alternative to conventional prebiotics and probiotics in aquafeeds.

.



مطالعه اثرات پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک و پروبیوتیک بر شاخص های رشد، شاخص های بیوشیمیایی خون و جمعیت باکتریایی روده ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius kessler*)

عبدال... محمد جعفری^۱، علی طاهری میرقائد*^۱، مرتضی یوسفی^۱، حسینعلی ابراهیم زاده موسوی^۱، سید مرتضی

حسینی^۱

۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۱۰

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی اثر پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک و پروبیوتیک بر شاخص های رشد، بیوشیمیایی خون و جمعیت باکتریایی روده ماهی آزاد دریای خزر بود. تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی آزاد دریای خزر با میانگین وزن اولیه ۱۰ گرم در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۳ تکرار و ۲۰ قطعه به هر تانک فایبرگلاس اختصاص یافت. ماهی ها با تیمار شاهد، ۵۰۰ mg پری بیوتیک، ۱g پروبیوتیک، ۵۰۰ mg و ۱g پپتیدهای زیست فعال در کیلوگرم خوراک به مدت ۵۶ روز تغذیه شدند. نتایج آزمایش نشان داد که ماهی های تغذیه شده با تیمار پپتیدهای زیست فعال کانولا به طور معنی داری وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و نرخ بازماندگی بهتری نسبت به سایر تیمارها داشت ($p < 0/05$). همچنین ماهی های تغذیه شده با تیمار پپتیدهای زیست فعال کانولا، غلظت ایموگلوبین های A و M و کورتیزول خون در مقایسه با سایر تیمارها به ترتیب افزایش و کاهش یافت ($p < 0/05$). تعداد لاکتوباسیلوس های روده ماهی های تغذیه شده با تیمار پپتیدهای زیست فعال کانولا نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت ($p < 0/05$). همچنین تغذیه پپتیدهای زیست فعال کانولا، تعداد کلی فرم های روده ماهی ها در مقایسه با سایر تیمارها کاهش یافت ($p < 0/05$). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، پپتیدهای زیست فعال کانولا می تواند به عنوان افزودنی غذایی فراسودمند در جیره ماهی آزاد دریای خزر استفاده شود.

کلید واژه ها: پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک، پروبیوتیک، تعداد لاکتوباسیلوس های روده، ایموگلوبین های A و M، کورتیزول، ماهی آزاد دریای خزر

* mirghaed@ut.ac.ir

مقدمه

علم بیوتکنولوژی در سال های اخیر منجر به تولید فرآورده های مختلف غذایی شده است. یکی از این فرآورده ها، هیدرولیز پروتئین می باشد که منجر به تولید پپتیدها با وزن ملکولی پایین با قابلیت جذب بالا و محلول در آب خواهد شد. پپتیدها که نخستین بار در سال ۱۸۸۰ میلادی توسط ناگلی به عنوان محرک رشد باکتریایی در محیط کشت معرفی شدند که با اندازه کوچک نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای متابولیک موجود زنده ایفا خواهند کرد (۱). براساس مطالعات اخیر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین با روش های مختلف (آنزیمی و تخمیری)، داری ویژگی های فرا سودمند از جمله آنتی اکسیدانتی، محرک رشد، تقویت کننده سیستم ایمنی و ضد میکروبی می باشند (۱، ۲، ۳ و ۴). همچنین نتایج حاصل از پژوهش ها نشان داد که پروتئین های هیدرولیز شده از منابع مختلف گیاهی می توانند اثرات مثبتی بر رشد، بازماندگی، ترشح آنزیم های گوارشی، مقاومت به آلودگی باکتریایی، متابولیت های خونی و ترکیب شیمیایی بدن داشته باشند. در این خصوص دن و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثر سطوح مختلف پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کتان بر رشد، قابلیت هضم، ترکیب شیمیایی بدن و شاخص های بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی را بررسی و سطح بهینه ۵ درصد را توصیه کردند (۵). همچنین در مطالعه هوروی و همکاران در سال ۲۰۰۵، افزایش استفاده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی سبب افزایش جذب غذا در ماهی آزاد شد اما بهترین نرخ رشد با جیره های حاوی مقدار متوسط پروتئین هیدرولیز شده ماهی بدست آمد (۶). وجود درصد بالای پروتئین در بافت ماهیان نشان دهنده نیاز آن ها به اسیدهای آمینه جهت سنتز پروتئین می باشد که ضروری است از منابع موجود در جیره

تأمین شوند. جذب اسید آمینه از طریق انتقال دهنده پپتیدها در سرتاسر دیواره سلولی روده انجام می شود که سرعت جذب با اندازه پپتیدها رابطه مستقیم دارد. این انتقال دهنده ها به صورت پروتئینی مسئول حمل انتخابی دی و تری پپتیدها در سرتاسر دیواره سلولی روده می باشند. یکی از این انتقال دهنده ها PepT1 است که در قسمت اپیتلیوم روده باریک حضور دارد. در این خصوص جنسیانا و همکاران در سال ۲۰۱۳، اثر پپتیدهای حاصل از منابع مختلف پروتئین گیاهی بر بیان ژن انتقال دهنده پپتیدها را در ماهی شانک^۱ بررسی کردند (۷). براساس نتایج آن ها، اثر پپتیدهای حاصل از منابع مختلف پروتئین گیاهی بر بیان ژن انتقال دهنده پپتیدها (PepT1) متفاوت بود. بنابراین استفاده از تکنیک های هیدرولیز منابع مختلف پروتئین گیاهی و حیوانی با تسهیل هضم و جذب مواد مغذی در ماهی ها جهت افزایش بهره وری تولید، بسیار مهم و کاربردی می باشد (۸). کانولا دومین محصول دانه روغنی تولیدی کشور است اما به دلیل وجود برخی مواد ضد مغذی مانند سیناپین، گلوکوزینولات ها، فیتات و تانن سبب محدودیت مصرف آن در جیره حیوانات پرورشی شده است به طوری که مصرف زیاد آن منجر به اثرات منفی بر عملکرد رشد خواهد شد (۸). لذا در پژوهش حاضر جهت بهبود عملکرد رشد و افزایش شاخص های ایمنی و ضد میکروبی از پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی کنجاله کانولا به عنوان افزودنی غذایی در جیره ماهی آزاد دریای خزر استفاده شد (۹ و ۵).

مواد و روش ها

طرح آزمایشی و تیمارهای آزمایشی

جهت انجام این پژوهش، تعداد ۳۰۰ قطعه بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius kessler*) در ۱۵ تانک فایبرگلاس با حجم آب حدود ۳۰۰ L^۲ با تراکم ۲۰ عدد در هر واحد پرورشی با میانگین وزن اولیه ۱۰ g به مدت ۵۶ روز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش استرس ناشی از انتقال ماهیان به حوضچه ها و سازگاری با شرایط پرورشی

^۱. Liter

جدید، ضمن قطع غذاهای به مدت ۴۸ ساعت قبل از انتقال، ماهیان به مدت ۲ هفته با غذای فاقد تیمارهای آزمایشی تغذیه شدند. در طول دوره آزمایش آب بطور دائم در حال تعویض بود و شاخص های فیزیکی و شیمیایی آب شامل اکسیژن محلول، دما (۱۴/۱) و pH (۷/۸) در محدوده متناسب با پرورش ماهی اعمال گردید. تیمارهای آزمایشی شاهد (بدون افزودنی غذایی)، ۵۰۰ mg/kg پری بیوتیک اگری موس، ۱ g/kg پروبیوتیک دیپرو، ۵۰۰ mg/kg و ۱ g/kg پپتیدهای زیست فعال با روش چرب نمودن سطح خوراک به روغن ماهی (به مقدار یکسان برای تمام خوراک ها) به خوراک تجاری اضافه شدند. پروبیوتیک دیپرو^۱ حاوی سویه های باسیلوس لیکنی فورمیس^۲ و باسیلوس سوبتیلیس^۳ با $3/2 \times 10^9$ cfu/g محصول شرکت تک ژن^۴ ایران بود. پری بیوتیک اگری موس^۵ حاوی بتاگلوکان و مانان اولیگوساکارید بود و از شرکت لالمند^۶ فرانسه تهیه شده بود.

تولید پپتیدهای زیست فعال کانولا

تولید پپتیدهای زیست فعال کانولا براساس روش کریم زاده و همکاران (۱۳۹۴)^۷ (۱۰). به شرح ذیل انجام شد. ابتدا پودر کنجاله کانولا در آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۵ مخلوط شده و pH مخلوط حاصل در سطح ۱۰ تنظیم شد. پس از حرارت دادن در دمای 45°C به مدت ۳۰ min در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. pH سوپرناتانت حاصل توسط محلول ۱ mol اسید کلریدریک در حد ۴/۵ تنظیم و سپس سانتریفیوژ شد. پروتئین ته نشین شده در آب مقطر حل و pH آن در سطح ۷ تنظیم شد. مایع حاصل ابتدا در دمای 30°C - منجمد و سپس توسط دستگاه فریز درایر خشک شد تا پودر پروتئین خالص کانولا به دست آمد. به منظور تولید پپتید، پروتئین خالص کانولا در غلظت ۵٪ در رآکتور ۲۵۰ ml حل شد و درجه حرارت و pH محلول قبل از شروع فرآیند هیدرولیز در حد اپتیمم فعالیت آنزیم تنظیم شد. ظرف مخصوص هیدرولیز بر روی صفحه مگنتیک داغ قرار داده شد و طی فرآیند

هیدرولیز مخلوط به طور دائم بهم زده شد. هیدرولیز پروتئین خالص کانولا توسط آنزیم پروتئاز تجاری آلکالاز محصول شرکت نوزایم دانمارک در دمای 50°C و pH=۸ طی مدت ۴ h با غلظت آنزیم به پروتئین ۱ به ۲۰ انجام شد. طی فرآیند هیدرولیز، pH مخلوط توسط هیدروکسید سدیم mol ۱ در سطح ۸ ثابت نگه داشته شد. بعد از اتمام هیدرولیز، pH توسط محلول ۱ mol کلریدریک در سطح ۴ تنظیم شد و سپس جهت غیر فعال سازی آنزیم، مخلوط در آب جوش به مدت ۱۰ m حرارت داده شد. جهت زدودن ناخالصی ها، مخلوط فوق به مدت ۳۰ min در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع حاصل ابتدا در ظرف پتری دیش ریخته شد و در دمای 30°C - منجمد شد. محلول منجمد توسط دستگاه فریز درایر خشک شد و در نهایت پودر پپتیدهای زیست فعال کانولا به دست آمد.

تعیین وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال کانولا

توزیع وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال کانولا با استفاده از ژل تی اس کی^۸ همراه با دستگاه کرماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۹ انجام شد. استونیتریل در آب (۱:۱، حجم/حجم) حاوی تری فلورو اسید استیک (٪ ۰/۱، حجم/حجم) به عنوان فاز متحرک استفاده شد. جذب در ۲۲۵ نانومتر با سرعت جریان ۰/۵ ml در دقیقه تحت انجام شد. آلبومین سرم گاوی (۶۶۰۰۰ دالتن)، سیتوکروم c (۱۲۳۸۴ دالتن)، باکترسین (۱۴۲۳ دالتن) و گلوکاتینون (۳۰۷ دالتن) به عنوان استاندارد وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش شاخص های رشد

برای آگاهی از عملکرد تیمارهای آزمایشی بر چگونگی رشد ماهیان، در انتهای دوره پرورش اقدام به اندازه گیری شاخص های رشد شامل افزایش وزن بدن (BWI)، نرخ رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) ماهیان در

^۷. lallmand

^۸. Karimzadeh et al

^۹. TSK gel

^{۱۰}. High-performance liquid chromatography

^۲. Dipro

^۳. *Bacillus Licheni formis*

^۴. *Bacillus subtilis*

^۵. Tag gen zist

^۶. Agrimos

بررسی جمعیت باکتریایی روده

به منظور بررسی تغییرات در ترکیب میکروبیوتای روده ماهی آزاد در انتهای دوره به طور تصادفی تعداد ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب شدند. پس از ضدعفونی کردن و شستشو با آب مقطر، نمونه ها با تیغ اسکالپل استریل، کالبدگشایی و روده آن ها خارج شد. نمونه های روده پس از تخلیه کامل محتویات، توزین و جهت هموژن کردن به هاون های چینی استریل منتقل شد. پس از هموژن کردن نمونه های روده با استفاده از محلول نمکی استریل (۰/۸۷ NaCl) رقت های 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه شد. از هر رقت حجمی معادل ۰/۱ میلی لیتر به محیط کشت کانت آگار جهت تعیین تعداد کل باکتری ها، محیط کشت MRS جهت تعیین لاکتوباسیلوس ها و محیط کشت کروم آگار جهت تعیین اشریشیاکلی منتقل و در سطح پخش شدند (۱۰) در همه موارد پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلنی ها بعد از شمارش، در عکس رقت مورد استفاده ضرب شده و سپس لگاریتم آن ها محاسبه تا لگاریتم تعداد کلنی در واحد وزن (log CFU/g) به دست آید.

تجزیه و تحلیل داده ها

داده های به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با رویه GLM و با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی دار ۵٪ انجام شد.

مدل آماری آزمایش به صورت زیر است:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

X_{ij} : ارزش هر مشاهده
 μ : میانگین مشاهدات
 T_i : اثر تیمار
 e_{ij} : خطای آزمایشی

تیمارهای مختلف آزمایش و شاهد بر اساس منابع موجود (۲۵) از معادلات ریاضی محاسبه شده است.

$$BWI = BWf - BWi: (BWI) \text{ افزایش وزن بدن}$$

$$SGR = \text{نرخ رشد ویژه } (SGR):$$

$$[(LnWt - LnW0) \div t] \times 100$$

$$FCR = F/(Wt - W0): (FCR) \text{ ضریب تبدیل غذایی}$$

$$BWf = \text{متوسط وزن نهایی.}$$

$$BWi = \text{متوسط وزن اولیه.}$$

$$t = \text{تعداد روزهای پرورش.}$$

$$W0 = \text{میانگین وزن اولیه (گرم).}$$

$$Wt = \text{میانگین وزن نهایی (گرم).}$$

$$F = \text{مقدار غذای مصرف شده توسط ماهی.}$$

اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی خون

در پایان آزمایش جهت خون گیری از تیمارهای آزمایشی، ۵ قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و سپس با عصاره پودر گل میخک (۱۷۰ ppm) بیهوش شدند (۲۹). پس از خشک نمودن بدن ماهی از آب و موکوس اضافی، بوسیله سرنگ از ورید ساقه دمی خون گیری انجام شد. خون استحصالی از هر ماهی درون تیوپ ها ۱/۵ cc فاقد ماده ضد انعقاد خون ریخته و نمونه ها در یک مخزن حاوی یخ، به آزمایشگاه هماتولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ظرف مدت سه ساعت منتقل شدند. کورتیزول با استفاده از کیت سنجش کورتیزول به روش ELISA مستقیم^۱ با استفاده از کیت (مونوبند^۲، کالیفرنیا، آمریکا) اندازه گیری شد (۲۶). در آزمایش حاضر جهت اندازه گیری میزان گلوکز از کیت تشخیص کمی گلوکز (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) به روش آنزیمی-فتومتری در طول موج ۵۴۰ استفاده گردید. همچنین سنجش میزان ایمونوگلوبولین M (IgM) در نمونه های سرم بر اساس روش کدورت سنجی (۲۷) با استفاده از کیت سنجش ایمونوگلوبولین (Biosystems ساخت شرکت اسپانیا) در طول موج ۳۴۰ انجام شد (۲۸).

¹². Monobind

¹¹. Direct Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay

نتایج

ترکیب پپتیدهای زیست فعال کانولا

نتیجه حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها بسته به نوع منبع پروتئینی مورد استفاده و روش هیدرولیز، حاوی نسبت‌های متفاوتی از دی و تری پپتیدها، اولیگو پپتیدها، پلی پپتیدها و اسیدهای

آمینو آزاد می‌باشد. با توجه به جدول ۱، پپتیدهای زیست فعال استخراج شده از کنجاله کانولا به روش آنزیمی در دامنه وزن مولکولی ۱۸۰ تا ۳۰۰۰ دالتون بود و حاوی ۵۴/۹۰٪ دی و تری پپتید (۱۸۰ تا ۵۰۰ دالتون)، ۳۹/۳۰٪ اولیگوپپتید و پلی پپتید (۵۰۰ تا بیش از ۲۵۰۰ دالتون) و ۵/۸۰٪ اسید آمینو (کمتر از ۱۸۰ دالتون) بود.

جدول ۱: توزیع وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال کانولا

ردیف	دامنه وزن مولکولی (دالتون)	پپتیدهای زیست فعال (درصد)
۱	> ۳۰۰۰	۰/۰۹
۲	۲۰۰۰-۳۰۰۰	۰/۸۹
۳	۱۰۰۰-۲۰۰۰	۱۱/۶۳
۴	۵۰۰-۱۰۰۰	۲۶/۶۹
۵	۱۸۰-۵۰۰	۵۴/۹۰
۶	۱۸۰ <	۵/۸۰

شاخص‌های رشد

باتوجه به نتایج جدول ۲، وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. به طوری که بیشترین وزن و کمترین ضریب تبدیل غذایی متعلق به پپتیدهای زیست فعال کانولا بود ($p < 0.05$). همچنین ماهی‌های تغذیه شده با تیمارهای پپتیدهای زیست فعال

کانولا دارای کمترین تلفات بود ($p < 0.05$). بنابراین در پژوهش حاضر استفاده از پپتیدهای زیست فعال کانولا به عنوان افزودنی غذایی در جیره ماهی آزاد دریای خزر سبب بهبود شاخص‌های رشد شد.

جدول ۲. اثر پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک و پروبیوتیک بر شاخص‌های رشد و تلفات ماهی آزاد دریای خزر

شاخص	شاهد	پری بیوتیک	پروبیوتیک	پپتید mg/kg	پپتید g/kg	خطای استاندارد میانگین‌ها	سطح احتمال
وزن نهایی (گرم)	۴۰/۵۹ ^c	۴۵/۶۷ ^b	۴۵/۱۴ ^b	۵۷/۷۳ ^a	۵۸/۶۸ ^a	۸/۲۱	< ۰/۰۰۱
ضریب تبدیل غذایی	۱/۴۲ ^a	۱/۲۸ ^b	۱/۳۰ ^b	۱/۱۶ ^c	۱/۱۰ ^c	۰/۷۹	۰/۰۰۱
تلفات (درصد)	۴/۳۷ ^a	۲/۳۳ ^b	۲/۱۲ ^b	۰/۵۳ ^c	۰/۴۶ ^c	۵/۳۰	< ۰/۰۰۲

abc: میانگین‌هایی که در هر ردیف با حروف متفاوت نشان داده شده است دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($p < 0.05$).

شاخص‌های بیوشیمیایی خون

باتوجه به نتایج جدول ۳، استفاده از پپتیدهای کانولا در جیره غذای ماهی آزاد دریای خزر و بررسی اثرات آن بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون نشان داد که غلظت گلوکز و

کورتیزول خون ماهی‌های تغذیه شده با تیمارهای پپتیدهای زیست فعال کانولا نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافت و در مقابل غلظت ایمنوگلوبین A (IgA) و ایمنوگلوبین M (IgM) خون افزایش یافت.

جدول ۳. اثر پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک و پروبیوتیک بر غلظت گلوکز و کورتیزول، IgA و IgM خون ماهی آزاد دریای خزر

شاخص	شاهد	پری بیوتیک	پروبیوتیک	پپتید mg/kg ۵۰۰	پپتید 1 g/kg	خطای استاندارد میانگین ها	سطح احتمال
IgM (میلی گرم در دسی لیتر)	^c ۱/۱۵	^c ۱/۱۳	^b ۱/۲۹	^b ۱/۳۰	^a ۲/۹۵	۰/۳۳	۰/۰۰۱
IgA (میلی گرم در دسی لیتر)	^c ۲/۲۵	^c ۲/۲۷	^b ۲/۴۰	^b ۲/۴۴	^a ۲/۹۸	۰/۱۸	۰/۰۰۳
گلوکز	^a ۱۹۵/۱	^b ۱۳۹/۵	^b ۱۳۶/۳	^c ۱۲۱/۷	^c ۱۲۰/۳۵	۲/۹	۰/۰۰۱
کورتیزول	^a ۴۶/۵	^b ۴۲/۲	^b ۴۱/۷	^c ۳۳/۰	^c ۳۳/۹	۳/۲	۰/۰۰۱

^{abc}: میانگین هایی که در هر ردیف با حروف متفاوت نشان داده شده است دارای اختلاف معنی داری می باشند ($p < 0.05$).

جمعیت باکتریایی روده

داری بالا تر بود ($p < 0.05$). در حالی که تیمار شاهد پایین ترین جمعیت لاکتوباسیلوس ها را داشت ($p < 0.05$). همچنین جمعیت/شریشیاکلی روده ماهی های تغذیه شده با تیمارهای پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک و پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری پایین تر بود ($p < 0.05$).

با توجه به نتایج جدول ۴، تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت کل باکتری های، لاکتوباسیلوس ها و /شریشیاکلی روده معنی دار بود ($p < 0.05$)، به طوری که جمعیت لاکتوباسیلوس های روده ماهی های تغذیه شده با تیمارهای پپتید زیست فعال کانولا و پروبیوتیک در مقایسه با سایر تیمار ها به طور معنی

جدول ۴. اثر پپتیدهای زیست فعال کانولا، پری بیوتیک و پروبیوتیک بر جمعیت باکتریایی روده ماهی آزاد دریای خزر ($\log_{10}$ cfu/g)

شاخص	شاهد	پری بیوتیک	پروبیوتیک	پپتید ۵۰۰mg/kg	خطای استاندارد میانگین ها	سطح احتمال
کل باکتری	^{ab} ۴/۸۹	^b ۴/۷۶	^a ۵/۰۸	^a ۵/۱۹	^a ۵/۱۵	۲<.000
لاکتوباسیلوس	^c ۲/۱۹	^b ۳/۰۷	^b ۳/۱۰	^a ۳/۵۶	^a ۳/۵۴	<.0001
شریشیاکلی	^a ۲/۲۷	^b ۱/۹۵	^b ۱/۹۲	^b ۱/۹۵	^b 1/۹۰	<.0001

^{abc}: میانگین هایی که در هر ردیف با حروف متفاوت نشان داده شده است دارای اختلاف معنی داری می باشند ($p < 0.05$).

بحث

در پژوهش حاضر با توجه به گزارشات پژوهشگران در خصوص نقش پپتیدها در افزایش جذب مواد مغذی و بهبود شاخص های رشد (۱۴) سعی شده تا از پپتیدها با وزن مولکولی پایین به عنوان افزودنی غذایی در جیره ماهی آزاد دریای خزر استفاده شود. براساس نتایج این پژوهش، استفاده از پپتیدهای زیست فعال کائولا به عنوان افزودنی غذایی در جیره ماهی آزاد دریای خزر سبب بهبود شاخص های رشد و افزایش بازماندگی ماهی شد ($p < 0.05$). رشد و توسعه موجودات نتیجه مستقیم جذب مواد مغذی می باشد لذا عوامل مختلفی از جمله انتقال دهنده های پپتیدها نقش به سزای در بازده جذب مواد مغذی دارند. انتقال دهنده های پپتیدها، پروتئین های متصل به غشای سلول می باشند که مسئول انتقال انتخابی پپتیدهای کوچک در سرتاسر دیواره سلولی هستند. این گروه از انتقال دهنده ها براساس عملکرد و محل فعالیت دارای انواع مختلفی می باشند که mRNA نوع Pep T1 در روده ماهی قزل آلا دارای فراوانی بیشتری می باشد. براساس نتایج مطالعات انجام شده میزان فراوانی mRNA این ژن در مراحل مختلف توسعه و ترکیبات مختلف جیره از جمله استفاده اسیدهای آمینه، پپتیدها و فاکتورهای رشد، متفاوت می باشد (۱۴). لذا در این پژوهش بهبود شاخص های رشد به دلیل تسهیل جذب مواد مغذی با استفاده از پپتیدهای وزن مولکولی پایین که حاصل هیدرولیز پروتئین کنجاله کائولا است، باشد. همچنین براساس بررسی منابع، در استفاده از پپتیدها در جیره غذایی بیشتر به جنبه های درمانی آن توجه می شود. بطوریکه در اکثر این پژوهش ها، از موجوداتی که دچار تنش های مختلف (از جمله بیماری، عبور از یک مرحله زندگی و غیره) بودند، استفاده شد زیرا کاهش مصرف خوراک به همراه چنین تنش های منجر به کاهش جذب مواد مغذی خواهد شد. در برخی از این مطالعات با یک چنین رویکردی مشخص شد که کاهش اشتها و سوء تغذیه در این شرایط ممکن است به علت کاهش ارتفاع پرزهای روده باریک و تغییر میکروبیوتایدستگاه گوارش باشد. در این خصوص کریم زاده و همکاران (۱۳۹۶) که از پپتیدها در جیره

غذایی جوجه گوشتی استفاده کردند نیز افزایش طول پرزهای روده و بهبود باکتری های مفید روده را گزارش نمودند (۱۵). لذا با توجه به این نتایج می توان بیان کرد که بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی در پژوهش حاضر به علت بهبود دستگاه گوارشی موجود و افزایش قابلیت هضم و جذب برخی از مواد مغذی باشد. از آنجا که در این گونه پژوهش ها نوع منبع پروتئینی و درجه هیدرولیز تأثیر بسزایی در نتایج خواهند داشت (۱۴) باید ذکر شود که در اکثر مطالعات موجود از منابع پروتئینی مختلف با درجه هیدرولیز پایین تر بعنوان جایگزین بخشی از منابع پروتئینی جیره استفاده شده است (۵ و ۶) با این وجود نتایج حاصل از پژوهش حاضر که از پروتئین هیدرولیز شده با درجه بالای هیدرولیز که حاوی مقادیر بالاتری از دی و تری پپتیدها (۵۴) استفاده شد، با یافته سایر پژوهشگران حتی آن هایی که از پروتئین هیدرولیز شده با درجه پایین در جیره غذایی گونه های پرورشی مورد مطالعه استفاده نموده بوند، همخوانی نشان داد.

همچنین اوتاسزوسکا و همکاران در سال ۲۰۱۰ در یک بررسی مقایسه ای تأثیر اسیدهای آمینه آزاد و دی پپتیدها در جیره غذایی ماهی قزل آلا بر بیان ژن انتقال دهنده پپتیدها را مورد مطالعه قرار دادند. براساس نتایج گزارش شده ماهی های تغذیه شده با تیمار پپتید نسبت به تیمار شاهد از نظر رشد و بقا از شرایط بهتری برخوردار بودند (۱۴). کورتیزول یکی از شاخص های مورد بررسی در این پژوهش است که واکنش اولیه آن در پاسخ به شرایط تنش محیط پرورشی ماهی با افزایش رهاسازی آن در خون می باشد. لذا با توجه نقش پپتیدها در تقویت سیستم ایمنی و بهبود شرایط که در مطالعات دیگر ثابت شده است (۵) انتظار بر این بود که استفاده آن در جیره غذایی ماهی آزاد دریای خزر سبب کاهش سطح کورتیزول در سرم خون شود. که این اتفاق در خون ماهی های تغذیه شده با تیمار پپتیدهای زیست فعال کائولا مشاهده شد. در این خصوص باید به این نکته اشاره نمود که براساس برخی از نتایج گزارش شده در این زمینه، غلظت کورتیزول در سرم خون بعد از خوردن غذا افزایش

می یابد. مطالعات تکمیلی مشخص نمود که تأثیر غذاهای حاوی پروتئین بیشتر، در مقابل کربوهیدرات این موضوع را تشدید خواهد کرد (۱۷ و ۱۸). بندیک و همکاران (۲۰۰۵) در طی بررسی مکانیسم آزاد سازی کورتیزول دریافتند که استفاده از پپتیدهای حاصل از پروتئین هیدرولیز شده توانایی بیشتری در کاهش سطح کورتیزول خواهد داشت (۱۹). در این پژوهش نیز ما شاهد روند مشابهی بوده ایم و کمترین مقدار کورتیزول را در سرم خون گروهی از ماهیان که در جیره شان از پپتیدهای استفاده شد، مشاهده گردید. همچنین دن و همکاران (۲۰۱۰) نقش پروتئین هیدرولیز شده پودر کتان را در جیره غذایی ماهی کپور بر سیستم ایمنی مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که سطح کورتیزول در سرم خون ماهیانی که از مقدار بیشتری پروتئین هیدرولیز شده تغذیه شدند، پایین تر بود و دلیل آن را به حضور بیشتر پپتیدهای کوچکتر در جیره مورد استفاده نسبت دادند (۵). در واقع پپتیدهای زیست فعال موجود در پروتئین هیدرولیز شده قبل از جذب و ورود به سرم خون یک اثر تحریک کننده بر مخاط دستگاه گوارش خواهند داشت (۱۹). علاوه بر این حضور پپتیدهای زیست فعال در معده ممکن است سبب تحریک آزادسازی هورمون های روده ای مانند کوله-سیستوکینین شود و در نتیجه فعالیت ترشحی محور «هیپوتالاموس، هیپوفیز و آدرنال» تحریک کند (۲۰). البته باوجود اطلاعات موجود در خصوص نقش محور «هیپوتالاموس، هیپوفیز و آدرنال» در ترشح و آزاد سازی کورتیزول، نحوه عملکرد و عوامل تأثیر گذار بر این محور به روشنی مشخص نمی باشد اما آنچه که مسلم است افزودنی مورد استفاده در پژوهش حاضر، حاوی درصد بالایی از (۵۴/۹۰) پپتیدها با وزن ملکولی پایین می باشد لذا به استناد پژوهش های مشابه می توان یک چنین اثری را انتظار داشت. متعاقب کاهش کورتیزول در نتیجه افزایش پپتیدها در جیره غذایی میزان گلوکز نیز کاهش یافت و کمترین مقدار آن در گروه های پپتیدهای زیست فعال کانولا مشاهده شد. این

موضوع در راستای افزایش میزان و قابلیت جذب پپتیدها می باشد که بواسطه پپتیدهای زیست فعال کانولا در اختیار ماهی قرار گرفت. لذا جهت تأمین انرژی لازم برای سوخت ساز پس از کاهش کورتیزول، مقدار گلوکز نیز کاهش یافت که بازتاب این موضوع را می توان در حصول نتایج بهتر در شاخص های رشد در گروه پپتیدهای زیست فعال کانولا مشاهده نمود.

ایمنوگلوبولین ها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی موجودات در برابر عوامل بیماری زا مطرح می باشند. ایمنوگلوبولین نوع M و A در آبریان از اهمیت ویژه ای برخوردار هستند (۲۱). در مطالعاتی که از محرک های ایمنی در تغذیه موجودات استفاده شده است غلظت آن ها در خون افزایش نشان می دهد (۲۱). براساس نتایج بدست آمده در این مطالعه استفاده از پپتیدهای زیست فعال کانولا در جیره ماهی آزاد دریای خزر موجب افزایش غلظت IgM و IgA در سرم خون شد و بیشترین مقدار آن در گروهی از ماهیان که در جیره آن ها از پپتیدهای زیست فعال کانولا استفاده شد، مشاهده شد که مشابه یافته های سایر محققین می باشد (۲۲). پروتئین ها حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات زیست فعال می باشند که می تواند اثرات مطلوبی بر سیستم ایمنی موجودات بگذارد (۲۳) این اثرات را می توان به پپتیدهای موجود در پروتئین نسبت داد که در نتیجه هضم در دسترس موجود قرار می گیرد (۲۴). لذا تولید پپتیدها با وزن ملکولی کوچک که هدف این پژوهش بود (۵۴/۹۰٪ با وزن مولکولی در دامنه 10^4 تا 10^5 da) می تواند سبب بروز یک چنین پاسخی شده باشد.

نتایج حاصل از جمعیت باکتریایی روده نشان داد که استفاده از پپتیدهای زیست فعال کانولا در جیره ماهی آزاد دریای خزر می تواند جمعیت لاکتوباسیلوس ها و اشریشیاکلی را به ترتیب افزایش و کاهش دهد. در واقع پپتیدهای زیست فعال کانولا به عنوان یک محیط کشت خوب برای رشد لاکتوباسیلوس ها عمل کرد. پپتیدها به ویژه

جمعیت باکتری‌های گرم مثبت مفید مانند لاکتوباسیل‌های روده می‌شوند (۱۵).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر استفاده از مقادیر ۵۰۰ mg/kg و 1 g/kg پپتیدهای زیست فعال کانولا در جیره ماهی آزاد دریای خزر سبب افزایش عملکرد رشد و بهبود شاخص‌های ایمنی و جمعیت باکتریایی مفید روده شد. لذا پیشنهاد می‌شود از پپتیدهای زیست فعال کانولا به عنوان افزودنی غذایی فراسودمند در جیره ماهی آزاد دریای خزر استفاده شود.

تشکر و قدر دانی

پژوهشگران از سرکار خانم دکتر مریم تاج آبادی مدیر عامل محترم شرکت تک ژن زیست و همچنین مهندس نادری کارشناس محترم شرکت پاک گستر پرند به خاطر در اختیار قرار دادن پروبیوتیک دیپرو و پری بیوتیک اگری موس تشکر می‌نمایند.

اولیگو پپتیدها و پلی پپتیدها دارای ویژگی پریبیوتیکی هستند و بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا داخل روده گیرنده‌هایی دارند که می‌توانند به پپتیدها متصل و از روده دفع شوند همچنین به دلیل ماهیت شیمیایی آن‌ها، در بخش‌های بالایی دستگاه گوارش هضم و جذب نمی‌شوند و هنگامی که وارد کولون و روده کور می‌شوند به عنوان سوبسترای باکتری‌های این ناحیه از دستگاه گوارش عمل می‌کنند. با توجه به اینکه پپتیدها دارای ویژگی پریبیوتیکی هستند می‌توانند سبب افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده شوند و باکتری‌های مفید روده با تولید متابولیت‌هایی مانند باکتریوسین و اسید لاکتیک سبب کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا روده میزبان شوند (۱۰). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داد که تغذیه با پپتیدها، جمعیت باکتریایی مفید موجود در دستگاه گوارش حیوان را حفظ و ویژگی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک تا حد زیادی به فرآورده‌های حاصل از متابولیسم آن‌ها نسبت داده می‌شود. پپتیدها با کاهش جمعیت باکتریایی گرم منفی بیماری‌زا مانند اشریشیاکلی و از طریق کاهش pH سبب افزایش

منابع

1. Wang, J., Yan, X., Lu, R., Meng, X., Nie, G. Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review. *Aquaculture and Fisheries*. 2017; 1-14.
2. Che, L., Robinson, D. Industrial choice for protein production by large scale cell cultures. *Curr Opin Biotechnol*. 2001; 12: 180.
3. Pasupuleti, V.K. Proteins power up. *Food Technology*. 2006; 2: 55.
4. Sobharani, P., Agrawal, R. Supplementation of adjuvants for increasing the nutritive value and cell viability of probiotic fermented milk beverage. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*. 2009; 1: 14.
5. Gui D, Liu W, Shao X, Xu W. Effects of different dietary levels of cottonseed meal protein hydrolysate on growth, digestibility, body composition and serum biochemical indices in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Animal Feed Science and Technology*. 2010 Mar 30;156(3-4):112-20.
6. Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*. 2005; 11: 301.
7. Genciana, T., Lidia, R., Marisol, I., AnnaGiulia, C., Silvia, M., Giovanni, B., Marco, S. PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. *Biomedical and Life Sciences*. 2013; 2: 17.
8. Lacki, K., Duvnjak, Z. Decrease of phenolic content in canola meal using a polyphenol oxidase preparation from *Trametes versicolor*: effect of meal saccharification. *Biotechnology Techniques*. 1998; 12(1): 31.
9. ValdezOrtiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C.I., Germán-Báez, L.J., Gutiérrez-Dorado, R., Medina-Godoy, S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (*Sulphur yellow*) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative Characterization. *LWT, Food Science and Technology*. 2012; 46: 91.
10. Karimzadeh, S., Rezaei, M., Teimouri, A. Effects of Canola Bioactive Peptides on Performance, Digestive Enzyme Activities, Nutrient Digestibility, Intestinal Morphology and Gut Microflora in Broiler Chickens. *Poultry Science Journal*. 2016; 4 (1): 27.
11. Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology Biochem*. 2004; 30: 21.
12. Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H. Feed intake, growth, and protein utilization by post-smolt Atlantic salmon (*Salmon salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*. 2004; 239: 331.
13. Oliva-Teles, A., Cerqueira, A.L., Gonc, A.P. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*. 1999; 179: 195.
14. Ostaszewska, T., Kamaszewski, M., Grochowski, P., Dabrowski, K., Verri, T., Aksakal, E., Szatkowska, I., Nowak, Z., Dobosz, S. The effect of peptide absorption on PepT1 gene expression and digestive system hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 2010; 155: 107.
15. Karimzadeh, S., Rezaei, M., Teimouri, A. Effect of canola meal peptides, antibiotic, probiotic and prebiotic on intestinal morphology and gut bacterial population in broiler chicks. *Applied Microbiology in Food Industries*. 2017; 2: 16.
16. Duncan, J.R., Prasse, K.W., Mahaffey, E.A. *Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology*. 3rd ed. Ames. USA. Iowa State University Press. 1994; PP: 112.
17. Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., Ahmad, M. Elevation of serum cortisol concentration following ingestion of a high protein meal in normal subjects. *Clin Res*. 1997; 27:680A.
18. Gibson, E.L., Checkley, S., Papadopoulos, A., Poon, L., Daley, S., Wardle, J. Increased salivary cortisol reliably induced by a protein-rich midday meal. *Psychosom Med*. 1999; 61: 214.

19. Benedict, C., Hallschmid, M., Scheibner, J., Niemeyer, D., Schultes, B., Merl, V., Fehm, H.L., Born, J., Kern, W. Gut protein uptake and mechanisms of meal-induced cortisol release. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90 (3): 1692.
20. Abelson, J.L., Young, E.A. Hypothalamic-pituitary adrenal response to cholecystokinin-B receptor agonism is resistant to cortisol feedback inhibition. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28: 169.
21. Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 101(3-4): 203.
22. Hong-gang, T., Tian-xing, W., Zhan-yu, Z., Xiao-dong, P. 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.* 2008; 9: 686.
23. Pascual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Sánchez, A., Gaxiola, G., Taboada, G., Suárez, J., Maldonado, T., Rosas, C. Litopenaeus vannamei juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture.* 2004; 236(1-4):431.
24. Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino, I.J., Cahu, C. 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. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 2007; 147(1): 205.
25. Ronyai, A., peteri, A., Radics, F. Cross breeding of starlet and lena river sturgeon. *Aquaculture Hungrica szarwas.* 1990; 6:13-18.
26. Deane, E.E., Woo, N.Y. Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. *Life sciences.* 2003; 72(7): 805-818.
27. Yamamoto, T., Yonemasu, K. Multiple molecular forms of serum immunoglobulin M in a patient with Waldenstro'm's macroglobulinemia. *Clinica Chimica Acta.* 1999; 289: 173-176.
28. Narayanan, S. Method-Cmparison Studies on immunoglobulins. *Clin chem.* 1982; 28: 1528-1531.
29. Rastiannasab A., Hosseini, S.A., Sharif Rohani, M., Gandomkar, H., Nekoyiefard, A., Gorjipour, E. The control of recovery process with clove tree (*Eugenia caryophyllata*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific fisheries Journal.* 2014; 23; 117-123.