Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics
Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

انجمن علمی ماهیان زینتی ایران
Iranian Ornamental Fish Society (IOFS)

(OPEN ACCESS)

Effect of dietary administration of Pectin and Natuzyme multi-enzyme on growth performance, growth (GH and IGF-1) and immune (IL1-β and Lyz) related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*)

Tahereh Darnahal[*1], Mohammad Reza Imanpour[2], Roghieh Safari[3]

1. Corresponding Author, Ph.D. Student of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mahbobehdarnahal@yahoo.com
2. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: imanpour@yahoo.com
3. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 11.12.2022
Revised: 12.16.2022
Accepted: 12.17.2022

Keywords:
Common carp,
Gene expression,
Growth and immunity genes,
Natozyme multienzyme,
Pectin

ABSTRACT

Background and Objectives: In this experiment, the effect of using pectin and natozyme multi-enzyme separately and in combination on blood serum biochemical indicators in common carp fry (*Cyprinus carpio*) was investigated.

Materials and Methods: For this purpose, the number of 540 common carp fry with an average weight of about 10 gr for 8 weeks with experimental diets with nine treatments and each treatment with three repetitions including basic diet (0), 1% pectin, 2% pectin 0.05% natozyme multi-enzyme, 0.1% natozyme multi-enzyme, combination of pectin (1%) and natozyme multi-enzyme (0.05%), pectin combination (2%) and natozyme multi-enzyme (0.05%), Pectin composition (1%) and natozyme multi enzyme (0.1%), pectin composition (2%) and natozyme multi enzyme (0.1%) were fed. For genetic study, liver, brain and kidney tissues were sampled; RNA extraction and cDNA synthesis were performed using kits. Growth-related genes (GH and IGF-1) and immunity (IL1-β and Lyz) were evaluated using real time PCR. The data were evaluated by two-way analysis of variance using SPSS software.

Results: In the results of the separate and combined effects of natozyme and pectin on the expression of growth genes, no significant difference was observed in the separate treatments of natozyme and pectin ($P>0.05$), but the combined treatment with an interaction effect showed a significant difference with other treatments ($P\leq0.05$). The results of separate effects of natozyme and pectin on LYZ and IL-1 gene expression, there was a significant difference between the separate treatments of natozyme and pectin, so that pectin was higher than natozyme ($P\leq0.05$). In addition, combined treatment with interaction effect showed a significant difference with other treatments ($P\leq0.05$). The results of this experiment showed that the use of 0.1% natozyme multienzyme and 2% pectin in the diet of common carp can have a positive effect on the expression of growth and immunity genes in this fish.

Cite this article: Darnahal, Tahereh, Imanpour, Mohammad Reza, Safari, Roghieh. 2025. Effect of dietary administration of Pectin and Natuzyme multi-enzyme on growth performance, growth (GH and IGF-1) and immune (IL1-β and Lyz) related genes expression in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (1), 193-208.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20777.1723
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

اثرات به‌کارگیری پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-1) و ایمنی (IL1-β و Lyz)، در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

طاهره دارنهال*[۱]، محمدرضا ایمانپور[۲]، رقیه صفری[۳]

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mahbobehdarnahal@yahoo.com
۲. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: imanpour@yahoo.com
۳. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۸/۲۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۹/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۹/۲٦

واژه‌های کلیدی:
بیان ژن،
پکتین،
ژن‌های رشد و ایمنی،
کپور معمولی،
مولتی‌آنزیم ناتوزیم

چکیده

سابقه و هدف: در این آزمایش اثرات به‌کارگیری پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-1) و ایمنی (IL1-β و Lyz) در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ٥٤۰ قطعه ماهی با وزن اولیه ۱±۱۰ گرم با نه تیمار و هر تیمار با سه تکرار شامل جیره پایه (صفر)، ۱ درصد پکتین، ۲ درصد پکتین، ۰/۰۵ درصد مولتی‌آنزیم ناتوزیم، ۰/۱ درصد مولتی‌آنزیم ناتوزیم، ترکیب پکتین (۱ درصد) و مولتی‌آنزیم ناتوزیم (۰/۰۵ درصد)، ترکیب پکتین (۲ درصد) و مولتی‌آنزیم ناتوزیم (۰/۰۵ درصد)، ترکیب پکتین (۱ درصد) و مولتی‌آنزیم ناتوزیم (۰/۱ درصد)، ترکیب پکتین (۲ درصد) و مولتی‌آنزیم ناتوزیم (۰/۱ درصد) به‌مدت دو ماه تغذیه شدند. جهت مطالعه ژنتیکی، در پایان دوره از بافت‌های کبد، مغز و کلیه نمونه‌برداری شد، استخراج RNA و سنتز cDNA با استفاده از کیت‌های موجود انجام گرفت و بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-1) و ایمنی (IL1-β و Lyz) با استفاده از Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در پایان داده‌ها توسط آنالیز واریانس دوطرفه با استفاده از نرم‌افزار Spss ارزیابی شدند. در نتایج اثرات مجزا و ترکیب آنزیم ناتوزیم و پکتین بر بیان ژن‌های رشد، اختلاف معنی‌داری

در تیمارهای مجزای آنزیم ناتوزیم و پکتین مشاهده نشد (P>۰/۰۵) ولی تیمار ترکیبی با اثر متقابل اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P≤۰/۰۵). نتایج اثرات مجزا و ترکیب مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین بر بیان ژن LYZ و IL-1 اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مجزای مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین وجود داشت به گونه‌ای که در تیمار پکتین از مولتی‌آنزیم ناتوزیم بالاتر بود (P≤۰/۰۵) هم‌چنین تیمار ترکیبی با اثر متقابل اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (P≤۰/۰۵). نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از ۰/۱ درصد مولتی‌آنزیم ناتوزیم و ۲ درصد پکتین در جیره غذایی ماهی کپور معمولی می‌تواند بر بیان ژن‌های رشد و ایمنی در این ماهی تأثیر مثبتی را دارا باشد.

استناد: دارنهال، طاهره، ایمانپور، محمدرضا، صفری، رقیه (۱۴۰۴). اثرات به‌کارگیری پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد (GH و IGF-1) و ایمنی (IL1-β و Lyz)، در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۴ (۱)، ۲۰۸-۱۹۳.
DOI: 10.22069/japu.2022.20777.1723

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

مصرف ماهی که سرشار از کلسیم، فسفر و سایر مواد معدنی است، یکی از سالم‌ترین مواد غذایی را برای بشر فراهم کرده است. تقاضا برای ماهی احتمالاً با افزایش جمعیت ما هم‌چنان افزایش خواهد یافت (١). در آبزی‌پروری مدرن، ماهی‌ها با جیره‌های مصنوعی تغذیه می‌شوند، در نتیجه نیاز به فرموله کردن دقیق جیره‌هایی است که مستقیماً بر کیفیت محصول نهایی تأثیر می‌گذارند (٢). یکی از موانع اصلی که توسعه پایدار آبزی‌پروری را به چالش می‌کشد، کاهش تولید به دلیل بیماری‌های عفونی و تاخیر رشد ناشی از استرس اجتناب‌ناپذیر هنگام پرورش ماهی در تراکم بالا است. تحت همین محدودیت‌ها می‌توان رشد و سلامتی ماهی را با استفاده از افزودنی‌های خوراک افزایش داد تا از تولید کارآمد و سودآور همراه با محصولی پررونق و با کیفیت اطمینان حاصل شود. بنابراین، علاقه زیادی در میان پژوهش‌گران برای یافتن و ارزیابی مواد بالقوه مؤثری که تأثیر مفیدی بر رشد و سلامت ماهی دارند، به منظور رسیدگی به مسائل فوق‌الذکر وجود داشته است (٣، ٤). تمام رژیم‌های غذایی ماهی حاوی بخش قابل‌توجهی از مواد گیاهی هستند که دارای طیف گسترده ای از عوامل ضدتغذیه‌ای مانند: مهارکننده‌های پروتئاز، اسید فیتیک و پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای می‌باشند که بر سلامت ماهی و عملکرد رشد آن تأثیر منفی می‌گذارند زیرا ماهی در مقایسه با پستانداران به‌دلیل کاهش ترشح آنزیم‌های گوارشی مورد نیاز برای تجزیه این ساختارهای سلولی پیچیده نمی‌تواند آن‌ها را به‌طور مؤثر هضم کند (٥، ٦). برای غلبه بر مشکلات فرآورده‌های گیاهی و گسترش کاربرد آن‌ها، مکمل آنزیم‌های برون‌زا مانند: گلوکاناز، فیتاز، زایلاناز و غیره به‌عنوان یک راه‌حل کلیدی برای قابلیت هضم بهتر مواد مغذی خوراک گیاهی در جیره‌های آبزی‌پروری پیشنهاد شده است (٧، ٨، ٩). استفاده از آنزیم‌های برون‌زا در جیره طیور با قابلیت هضم مواد مغذی، در دسترس بودن انرژی، بهبود سلامت روده، ارتقاء عملکرد رشد و کاهش دفع فسفر در محیط همراه بود (١٠). صرف‌نظر از اثرات مثبت آنزیم‌های برون‌زا بر قابلیت هضم مواد مغذی و کارایی خوراک، ممکن است این آنزیم‌ها فعالیت و ترکیب جامعه میکروبیوتای روده را تغییر دهند که نقش کلیدی در عملکردهای متابولیک و ایمونولوژیک دارند (١١). آنزیم ناتوزیم پلاس یکی از مکمل‌های آنزیمی است که حاوی فیتاز، بتاگلوکاناز، آلفاآمیلاز، سلولاز، همی‌سلولاز، پکتیناز، آمیوگلیکوزیداز، لیپاز، زایلاناز، پروتئاز، اسیدفیتاز، اسیدفسفاتاز وپنتوزاناز می‌باشد (١٢). از دیگر مواد افزودنی غذایی که این روزها مورد توجه پژوهش‌گران قرار گرفته پکتین‌ها هستند. پکتین‌ها به‌عنوان یک فیبر محلول در گروهی از پلیمرهای طبیعی طبقه‌بندی می‌شوند که به عنوان مواد ساختاری در همه گیاهان عمل می‌کنند. فیبرها، کربوهیدرات‌هایی هستند که نمی‌توانند توسط آنزیم‌های گوارشی ماهی هیدرولیز یا توسط روده کوچک جذب شوند و تقریباً ٧ درصد در رژیم غذایی ماهی‌ها گنجانده می‌شوند. پکتین می‌تواند توسط میکروبیوتای ماهی تخمیر شده و ممکن است اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه تولید کند (١٣). از سوی دیگر، پری‌بیوتیک‌ها به‌عنوان کربوهیدرات‌های غیرقابل‌هضم تعریف می‌شوند که ممکن است رشد ماهی (١٤) و ایمنی را افزایش دهند (١٥، ١٦). پکتین، مشتق شده از منابع مختلف، اغلب برای پتانسیل پری‌بیوتیکی آن در گونه‌های مختلف ماهی مورد آزمایش قرار گرفته است (١٧، ١٨). این احتمال وجود دارد که منبع اولیه پکتین، ماهی هدف، روش تجویز و سطوح گنجاندن به‌شدت بر اثربخشی آن تأثیر بگذارد. پکتین هم‌چنین به عنوان یک عامل ژل‌کننده و تثبیت‌کننده در صنایع

غذایی و آرایشی استفاده می‌شود و نشان داده شده است که اثرات مثبت متعددی بر سلامت انسان دارد، از جمله: کاهش سطح کلسترول و گلوکز سرم، کاهش سرطان (۱۹) و تحریک پاسخ ایمنی (۲۰). مقالات محدودی در مورد اثرات متقابل غذایی پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم به‌صورت ترکیبی و مجزا در آبزیان وجود دارد، بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی پتانسیل پکتین مشتق شده از تفاله پرتقال و مولتی‌آنزیم ناتوزیم بر بیان ژن‌های ایمنی و رشد ماهی کپور معمولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: در این پژوهش، ۵٤۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی (با وزن تقریبی ۱/۵۱±۱۰/۳۲ گرم) از یکی از مراکز تکثیر و پرورش کپور معمولی تهیه و به سالن آبزی‌پروری شهید فضلی‌برآبادی انتقال یافت. پس از دو هفته سازگاری، این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۹ تیمار و برای هر تیمار ۳ تکرار (۲۰ ماهی در هر تکرار) انجام پذیرفت که شامل جیره پایه (شرکت فردانه) (صفر)، ۱ درصد پکتین، ۲ درصد پکتین، ۰/۰۵ درصد مولتی‌آنزیم ناتوزیم، ۰/۱ درصد مولتی‌آنزیم ناتوزیم، ترکیب پکتین (۱ و ۲ درصد) و مولتی‌آنزیم ناتوزیم (۰/۰۵ درصد)، ترکیب پکتین (۱ و ۲ درصد) و مولتی‌آنزیم ناتوزیم (۰/۱ درصد) بود. جیره‌های غذایی با اسپری کردن ترکیبات مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین با ژلاتین بر جیره پایه به‌دست آمد. غذادهی به میزان ۵ درصد وزن بدن در ۳ مرحله در روز طی دو ماه به ماهی‌ها داده شد (۱۸). مولتی‌آنزیم و پری‌بیوتیک پکتین پوست پرتقال مورد استفاده در این پژوهش به‌ترتیب از شرکت PINTALUBA و دانشگاه چیانگ مای تایلند تهیه شدند.

نمونه‌برداری بافت: برای نمونه‌برداری از بافت کبد، کلیه و مغز مراحل زیر انجام گردید:

ابتدا ویال‌های ۱/۵، پنس و قیچی در دستگاه اتوکلاو استریل شده و بر روی سینی استریل شده به‌وسیله الکل قرار گرفت، چراغ‌الکلی بر روی سینی روشن نموده، به‌ترتیب از هر تانک دو ماهی به‌صورت تصادفی برداشته شد، با استفاده از گل میخک ماهی بی‌هوش گردید، به‌وسیله تیغ یک برش در قسمت سر ماهی به صورت افقی داده شد و بافت مغز برداشته و سپس، با برش افقی از سمت مخرج به سمت قسمت بافت کبد و کلیه را جدا نموده و در داخل ویال ۱/۵ جداگانه قرار داده و فوراً ویال‌ها به داخل تانک ازت مایع انتقال داده و پس از اتمام نمونه‌برداری تمام نمونه‌ها به ۸۰- درجه منتقل شد.

استخراج RNA: استخراج RNA در مطالعات بیان ژن یکی از حساس‌ترین مراحل انجام کار است که باید با حفظ شرایط کاملاً استریل و دمای نمونه‌ها، RNA با کیفیت مناسب استخراج شود. در این آزمایش استخراج RNA بر اساس روش آواد و همکاران توسط ماده هضم‌کننده بایوزول انجام شد (۲۲) که به‌صورت جزءبه‌جزء توضیح داده می‌شود:

نمونه‌های مربوط به هر تکرار از تیمارها با هم مخلوط شدند (بافت کبد، مغز و کلیه به‌صورت جداگانه) و در داخل هاون چینی در مجاورت کامل ازت مایع جهت شکسته شدن دیواره سلول‌ها کوبیده و تبدیل به پودر شد که این فرایند باید خیلی سریع و همواره در مجاورت ازت مایع باشد تا از ذوب شدن بافت‌ها جلوگیری به عمل آید. سپس به میزان ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه بافت کوبیده شده به تیوب‌های از قبل استریل شده انتقال داده و به میزان ۱ میلی‌لیتر از بایوزول به آن‌ها اضافه شد و پس از ورتکس به‌مدت ۱۵ ثانیه، در دمای اتاق به‌مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. سپس به‌میزان ۰/۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم به تیوب‌ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ نگه‌داری شدند. تیوب‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ (شکل ۱) با دور

١٢٠٠٠rpm در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند، سپس فاز آبی قسمت بالایی تیوب‌ها جدا شد و به تیوب‌های از قبل استریل شده منتقل و هم‌حجم آن‌ها ایزوپروپانول سرد که قبلاً به‌مدت ٣٠ دقیقه در یخچال ٢٠- نگه‌داری شده بود، اضافه شد، سپس به‌مدت ١٠ دقیقه در سانتریفیوژ ٤ درجه سلسیوس با دور ١٢٠٠٠rpm سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، تیوب‌ها به روی یخ انتقال داده و فاز بالایی دور ریخته شد و به میزان ١ میلی‌لیتر از اتانول ٧٥ درجه جهت شستن پلت RNA کف تیوب‌ها به آن‌ها اضافه و به‌مدت ٥ دقیقه با سانتریفیوژ ١٢٠٠٠rpm در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ در مرحله قبل، در این مرحله RNA به‌صورت پلت سفید متمایل به کرم‌رنگ در ته تیوب‌ها مشاهده و اتانول داخل تیوب‌ها دور ریخته شد. در نهایت پلت RNA در زیر هود کاملاً خشک شد، سپس به میزان ٥٠ ماکرولیتر آب DEPC عاری از RNase به ویال‌ها اضافه و به یخچال ٨٠- انتقال داده و تا زمان استفاده جهت تعیین کیفیت RNA و سنتز cDNA در آن‌جا نگه‌داری شدند.

ارزیابی کیفی و کمی RNA استخراج‌شده: RNA استخراج‌شده به دو روش کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفت که جهت ارزیابی کیفی از دستگاه الکتروفورز و ژل آگاروز ١ درصد و جهت ارزیابی کمی جذب نوری در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ در دستگاه نانوفتومتر خوانده شد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام شد. ٥ µL از RNA که قبلاً آماده شده به همراه ١ µL آغازگر الیگو به تیوب‌های جدید اضافه و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ١٠ µL رسید، سپس بر روی بلوک حرارتی در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ دقیقه انکوبه گردید و به روی یخ انتقال داده و ١٠ µL مستر حاوی آنزیم ریورس‌ترانسکریپتاز به آن اضافه شد. درنهایت با دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦٠ دقیقه و ٧٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ دقیقه انکوبه و سپس، محلول حاوی cDNA سنتزشده به حجم ٢٠ µL به دمای ٢٠- منتقل شد.

جدول ١- توالی آغازگرهای استفاده شده.

Table 1. Sequence of primers used.

ژن	شماره دستیابی توالی mRNA (Accession Number)	آغازگرها: پیش‌رونده (forward) و پس‌رونده (reverse)	دمای اتصال
GH	EU908735.1	F: ATGTTTCTGCTCCTGTGTGT R: GCTTCTCTTCTGCCCACTCT	59
IGF-1	NM_131825.2	F: AGTGTACCATGCGCTGTCTC R: AATAAAAGCCCCTGTCTCCA	59
LYZ	NM_139180.1	F: GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC R: CGTAGTCCTTCCCCGTATCA	59
IL1-β	AY427649.1	F: CTGCTTCACGCTCCATAAGA R: CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	59
Beta-actin	NM_131031.1	F: AGCAGATGTGGATCAGCAAG R: TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	59

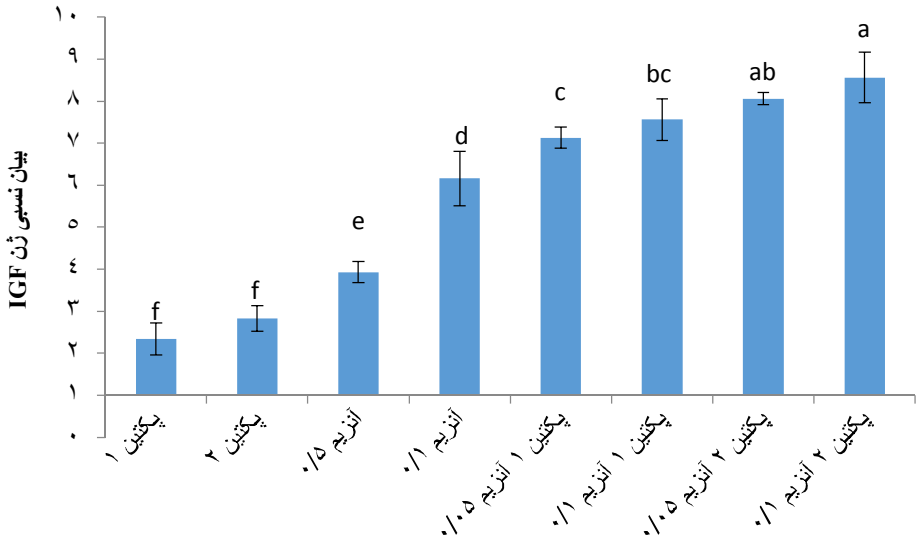
قبل از انجام Real Time PCR برای مطمئن شدن از درستی آغازگرها و اندازه باندهای تشکیل‌شده محصولات حاصل از آن‌ها و هم‌چنین آزمایش نمودن cDNA، PCR معمولی نمونه‌ها با استفاده از ۲ µl نمونه cDNA رقیق‌شده، ۲ µl آغازگر پیش‌رونده (۱۰ پیکومول)، ۲ µl آغازگر پس‌رونده (۱۰ پیکومول)، ۳ µl آب استریل عاری از نوکلئاز و ۵ µl مسترمیکس PCR انجام شد.

Real Time PCR در تیوب‌های مخصوص در ٤ تکرار تکنیکی با استفاده از ۱۰ µl بافر سایبرگرین، ۱ µl آغازگر پیش‌رونده ژن هدف و رفرنس، ۱ µl آغازگر پس‌رونده ژن هدف و رفرنس، ۸µl آب، ۰/۲ µl آنزیم تگ پلیمراز و ۵µl cDNA رقیق‌شده انجام شد. به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط Real Time PCR، سری غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت هر پلت تهیه و با هر دو آغازگر هدف و رفرنس در ٤ تکرار تکثیر و جهت تخمین کارایی و تکرارپذیری آزمایش برای هر آغازگر منحنی استاندارد ترسیم و کارایی برای هر آغازگر ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح تصادفی انجام گرفت. داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن بعد از محاسبه با فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ ($\Delta\Delta Ct$) برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) و بررسی نرمالیته با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Version 24, IBM, Armonk, NY, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای کنترل نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، برای کنترل همگنی واریانس‌ها از آزمون Levene، جهت مشخص نمودن اختلاف میانگین بین تیمارهای مختلف از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون Duncan استفاده شد. آنالیزها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شدند.

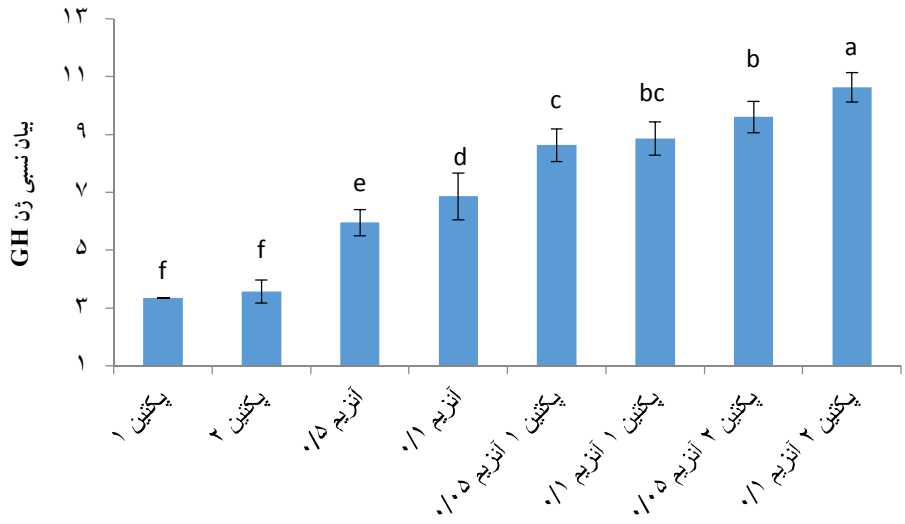
نتایج

بیان ژن‌های رشد در مغز (GH) و کبد (IGF-1): نتایج اثرات مجزا و ترکیب آنزیم ناتوزیم و پکتین بر بیان ژن‌های رشد GH و فاکتور رشد شبه انسولینی IGF-1 در بچه‌ماهی کپور معمولی پس از ۸ هفته تغذیه در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست آمده و اختلاف معنی‌داری در بیان هر دو ژن در سطوح مورد استفاده پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم به‌صورت مجزا مشاهده شد ($P\leq$۰/۰۵). بررسی اثر متقابل دو ماده مورد استفاده (پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم) اختلاف معنی‌داری را برای هر دو ژن رشد مورد مطالعه نشان داد ($P\leq$۰/۰۵) (جدول‌های ۲ و ۳). جهت تعیین بهترین تیمار غذایی مورد استفاده آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارها انجام شد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده و تیمار ترکیبی (پکتین ۲ – مولتی‌آنزیم ۰/۱) بیش‌ترین میزان بیان ژن‌های رشد GH و فاکتور رشد شبه انسولینی IGF-1 را نشان داد ($P\leq$۰/۰۵).



شکل ۱- سطوح بیان ژن IGF در کبد بچه‌ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین طی ۸ هفته آزمایش (n=۸؛ میانگین ± انحرف از معیار) حروف کوچک انگلیسی در هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.

Figure 1. IGF gene expression levels in the liver of common carp fry fed with the multienzyme Nattozyme and pectin during 8 weeks of the experiment (n=8; mean ± standard deviation). Lowercase letters in each graph indicate statistically significant differences between treatments at the 0.05 level.



شکل ۲- سطوح بیان ژن GH در مغز بچه‌ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین طی ۸ هفته آزمایش (n=۸؛ میانگین ± انحرف از معیار) حروف کوچک انگلیسی در هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.

Figure 2. GH gene expression levels in the brain of juvenile common carp fed with multienzyme Nattozyme and pectin during 8 weeks of the experiment (n=8; mean ± standard deviation). Lowercase letters in each graph indicate statistically significant differences between treatments at the 0.05 level.

جدول ۲- آزمون تأثیرات رابطه بین مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین در تیمارهای آزمایشی.

Table 2. Testing the effects of the relationship between the multienzyme Nattozyme and pectin in experimental treatments.

	مولتی‌آنزیم ناتوزیم	پکتین	تلفیق مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین
بیان ژن IGF	0.000*	0.000*	0.003*

وجود علامت ستاره در هر ردیف نشان‌دهنده وجود معناداری در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد

جدول ۳- آزمون تأثیرات رابطه بین مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین در تیمارهای آزمایشی.

Table 3. Testing the effects of the relationship between the multienzyme Nattozyme and pectin in experimental treatments.

	مولتی‌آنزیم ناتوزیم	پکتین	تلفیق مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین
بیان ژن GH	0.000*	0.000*	0.002*

وجود علامت ستاره در هر ردیف نشان‌دهنده وجود معناداری در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد

بیان ژن‌های ایمنی کلیه: نتایج اثرات مجزا و ترکیب آنزیم ناتوزیم و پکتین بر بیان ژن‌های ایمنی لیزوزیم (LYZ) و اینترلوکین ۱ (IL-1) در کلیه بچه‌ماهی کپور معمولی پس از ۸ هفته تغذیه در شکل‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری در سطوح مورد استفاده پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم به‌صورت مجزا مشاهده شد (P≤۰/۰۵). بررسی اثر متقابل دو ماده مورد استفاده (پکتین و مولتی‌آنزیم ناتوزیم) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P≤۰/۰۵) (جدول‌های ٤ و ٥). جهت تعیین بهترین تیمار غذایی مورد استفاده آنالیز واریانس یک‌طرفه بین تیمارها انجام شد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده و تیمار ترکیبی (پکتین ۲- مولتی‌آنزیم ۰/۱ و پکتین ۲- مولتی‌آنزیم ۰/۰۵) بیش‌ترین میزان بیان ژن‌های ایمنی لیزوزیم (LYZ) و اینترلوکین ۱ (IL-1) را نشان داد (P≤۰/۰۵).

جدول ٤- آزمون تأثیرات رابطه بین مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین در تیمارهای آزمایشی.

Table 4. Testing the effects of the relationship between the multienzyme Nattozyme and pectin in experimental treatments.

	مولتی‌آنزیم ناتوزیم	پکتین	تلفیق مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین
بیان ژن LYZ	0.000*	0.000*	0.02*

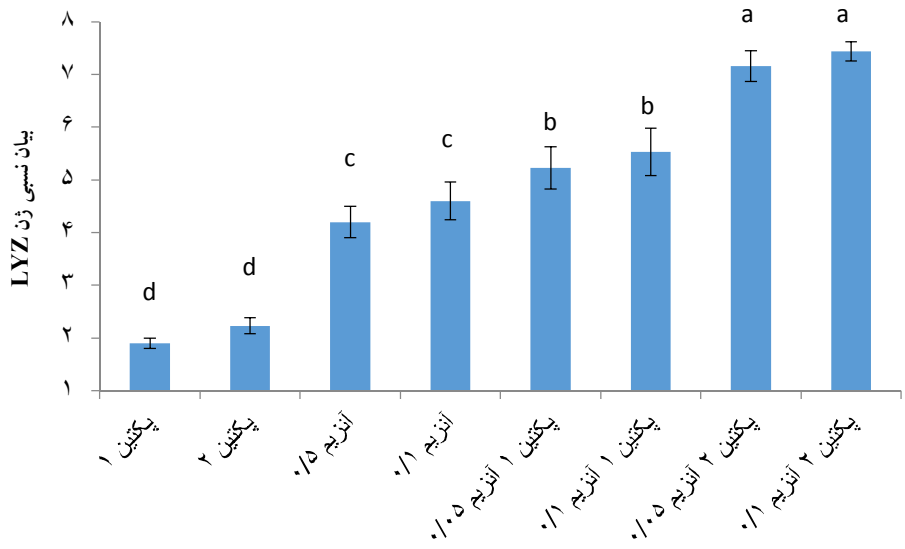
وجود علامت ستاره در هر ردیف نشان‌دهنده وجود معناداری در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد

جدول ٥- آزمون تأثیرات رابطه بین مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین در تیمارهای آزمایشی.

Table 5. Testing the effects of the relationship between the multienzyme Nattozyme and pectin in experimental treatments.

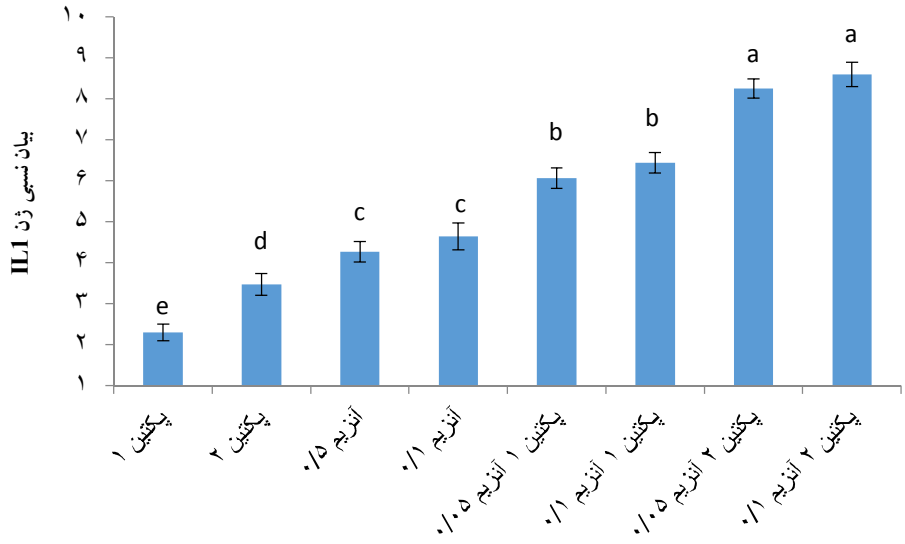
	مولتی‌آنزیم ناتوزیم	پکتین	تلفیق مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین
بیان ژن IL-1	0.000*	0.000*	0.001*

وجود علامت ستاره در هر ردیف نشان‌دهنده وجود معناداری در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد



شکل ۳- سطوح بیان ژن **LYZ** در بافت کلیه بچه‌ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین طی ۸ هفته آزمایش (n=۸؛ میانگین ± انحرف از معیار) حروف کوچک انگلیسی در هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.

Figure 3. LYZ gene expression levels in kidney tissue of common carp fry fed with multienzyme Nattozyme and pectin during 8 weeks of experiment (n=8; mean ± standard deviation). Lowercase letters in each graph indicate statistically significant differences between treatments at the 0.05 level.



شکل ٤- سطوح بیان ژن IL-1 در بافت کلیه بچه‌ماهی کپور معمولی تغذیه شده با مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین طی ۸ هفته آزمایش (n=۸؛ میانگین ± انحرف از معیار) حروف کوچک انگلیسی در هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.

Figure 4. IL-1 gene expression levels in kidney tissue of common carp fry fed with multienzyme Nattozyme and pectin during 8 weeks of experiment (n=8; mean ± standard deviation). Lowercase letters in each graph indicate statistically significant differences between treatments at the 0.05 level.

بحث

بیان ژن، مکانیسمی است که در طی آن اطلاعات ژنتیکی DNA ابتدا به یک محصول حد واسط (mRNA) و عملکردی تبدیل و سپس، به محصول نهایی که می‌تواند یک پروتئین باشد ترجمه می‌شوند. در برخی از موارد در مورد ژن‌هایی که محصول پروتئینی ندارند محصول نهایی می‌تواند یک نوع از RNA باشد. استفاده از روش‌های مولکولی به‌خصوص بررسی بیان ژن‌های فاکتورهای ایمنی و سایر مولکول‌های فیزیولوژیک موردنظر در سطح رونویسی ژن، این امکان را فراهم می‌کند که با فرانگری پاسخ‌های ایمنی از زمان استفاده مکمل، زمان بیان ژن را به‌طور دقیق‌تری به‌دست آورد، هم‌چنین مزیتی که بررسی از طریق رونویسی ژن می‌تواند داشته باشد، این است که با بررسی بیان ژن در بافت‌های مختلف می‌توان معیار دقیق‌تری از پاسخ‌گویی بافت‌های مختلف به محرک و هم‌چنین، مکانیسم عمل محرک به‌دست آورد (۲۳). مکمل‌های غذایی مانند: ترکیبات گیاهی، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و... می‌توانند به‌طور مستقیم مکانیسم‌های دفاعی اولیه را از طریق اثر بر گیرنده‌ها و ژن‌های مسئول، فعال سازند (۲٤)، که این موضوع به نوبه خود باعث افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و انواع تنش‌های محیطی می‌شود. نتایج اثرات مجزا و ترکیب آنزیم ناتوزیم و پکتین بر بیان ژن‌های رشد بچه‌ماهی کپور اختلاف معنی‌داری را در تیمارهای مجزای آنزیم ناتوزیم و پکتین مشاهده شده نشان نداد ولی تیمار ترکیبی با اثر متقابل اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد. همایونی و همکاران (۱٤۰۰)، در مطالعه‌ای به بررسی اثرات به‌کارگیری بتائین و مولتی‌آنزیم ناتوزایم در جیره غذایی بر بیان ژن هورمون رشد (GH) در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پرداختند (۲۵). شاخص بهترین بیان ژن رشد در تیمارهای ترکیبی (۵۰۰ میلی‌گرم ناتوزیم و ۱ و ۱/۵ درصد بتائین) بوده است. ال-اشری و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای به تأثیر زایلاناز غذایی بر عملکرد ژن رشد در ماهی‌های انگشت‌قد تیلاپیا نیل (*Oreochromis Niloticus*)، تغذیه‌شده با رژیم‌های گیاهی پرداختند (۲٦). بالاترین مقادیر هورمون رشد در جیره‌های تغذیه شده با ماهیان حاوی ۰/۵ گرم زایلاناز در کیلوگرم در جیره مشاهده شد. موسوی و همکاران (۲۰۲۲)، در مطالعه‌ای به بررسی اثرات ترکیبی *Pediococcus acidi lactici* و ناتوزایم بر بیان ژن رشد در بچه‌فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرداختند (۲۷). بیان IGF و GH نه‌تنها پس از گنجاندن پروبیوتیک یا ناتوزیم افزایش یافت، بلکه افزودن هم‌زمان آن‌ها اثرات فردی آن‌ها را ارتقا داد. صفری و همکاران (۲۰۲۲)، در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر مولتی‌آنزیم و بتائین بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد در فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرداختند (۲۸). بالاترین عملکرد بیان ژن مرتبط با رشد در تیمارهای ترکیبی (یعنی ۵۰۰ میلی‌گرم آپسوزایم + ۱ درصد و ۱/۵ درصد بتائین) مشاهده شد. حسینی‌فر و همکاران (۲۰۲۱)، در مطاالعه‌ای به بررسی اثرات پکتین حاصل از تفاله سیب بر عملکرد رشد پرداختند. آن‌ها گزارش نمودند در پایان آزمایش، پارامترهای رشد شامل افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیمارهای ۵ و ۱۰ گرم در کیلوگرم نسبت به سایر تیمارها به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافت (۲۹). حسینی و همکاران (۲۰۲۰)، در مطالعه‌ای به بررسی فواید بالقوه پکتین حاصل از پوست پرتقال بر عملکرد رشد در ماهی کپور معمولی پرداختند (۳۰). آن‌ها گزارش نمودند، ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی مکمل پکتین بهبود SGR، WG، FW و FCR را نشان دادند. تجویز آنزیم‌های برون‌زا زیربنای آنزیم‌های درون‌زا و فراهمی زیستی مواد مغذی بوده (۳۱) که به

نوبه خود باعث بیان ژن GH و IGF شد. علاوه بر جذب مواد مغذی توسط آنزیم‌های برون‌زا و تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی میزبان باعث افزایش بیان ژن رشد شده است (۳۲، ۳۳). هم‌چنین مشخص شده است که GH بیان و ترشح IGF را تحریک می‌کند که مسئول جذب سولفات است، در نتیجه سنتز پروتئین، RNA و DNA را افزایش می‌دهد (۳٤، ۳۵). افزایش رشد و بهره‌وری مصرف خوراک به‌دلیل گنجاندن پکتین در جیره غذایی ماهی را می‌توان به مکانیسم‌های مختلفی نسبت داد، از جمله: تأثیر مواد مغذی منتشر شده از پکتین در میکروبیوتای روده با افزایش جمعیت باکتریایی مثبت روده (۳٦) و افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (۳۷، ۳۸) یا فعالیت آنزیم‌های کبدی و روده (۳۸). علاوه بر افزایش اشتها (۳۹)، فیتوکمیکال‌های مشتق شده از پوست پرتقال، جذب مواد مغذی ضروری را افزایش داده و عوامل بیماری‌زا و ترکیبات نامطلوب را حذف می‌کند. پوست پرتقال سرشار از مواد فعال زیستی مانند لیمونوئیدها، فیبرهای غذایی و ترکیبات فنلی است که عملکرد رشد را افزایش می‌دهد (٤۰).

نتایج اثرات مجزا و ترکیب مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین بر بیان ژن LYZ و IL-1 بچه‌ماهی کپور معمولی پس از ۸ هفته تغذیه اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مجزای مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین را نشان داد به‌گونه‌ای که در تیمار پکتین از مولتی‌آنزیم ناتوزیم بالاتر بود. هم‌چنین تیمار ترکیبی با اثر متقابل اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد. حسینی‌فر و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای به بررسی اثرات پکتین حاصل از تفاله سیب (*Malus pomila*) بر بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند (٤۱). نتایج بیان ژن تفاوت معنی‌داری را در تنظیم اینترلوکین (IL-1β) نشان نداد. با این‌حال، افزایش تنظیم لیزوزیم، اینترلوکین (IL-1β) و فاکتور نکروز تومور (TNF-α) در هر دو ۵ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پکتین مشاهده شد. الاشری و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای به تأثیر زایلاناز غذایی بر ایمنی ماهی‌های انگشت‌قد تیلاپیا نیل تغذیه شده با جیره‌های گیاهی پرداختند. افزودن زایلاناز به‌طور قابل‌توجهی ایمنی را در مقایسه با رژیم غذایی شاهد بهبود بخشید (۲٦). حسینی‌فر و همکاران (۲۰۲۱)، در مطالعه‌ای به بررسی اثرات پکتین حاصل از تفاله سیب بر پاسخ‌های ایمنی ذاتی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداختند. سطح ایمنی به‌طور قابل‌توجهی در تمام تیمارها در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (۲۹). حسینی و همکاران (۲۰۲۰)، در مطالعه‌ای به بررسی فواید بالقوه پکتین حاصل از پوست پرتقال بر پارامترهای ایمنی در ماهی کپور معمولی پرداختند. از نظر پارامترهای ایمونولوژیک مخاط پوست، گنجاندن پکتین در جیره غذایی به‌طور معنی‌داری ایمنی را افزایش داد (۳۰). چند آنزیم از جمله بتامانان، زایلاناز در همی‌سل و ناتوزیم که از مخاط روده عبور می‌کنند، محرک‌های قوی سیستم ایمنی ذاتی هستند که منجر به افزایش تکثیر ماکروفاژها و مونوسیت‌ها و در نتیجه تولید سیتوکین می‌شوند (٤۲). علاوه‌بر این بهبود پاسخ‌های ایمنی در نتیجه استفاده از پکتین به‌دست آمده از پوست لیمو در موش صحرایی بیانگر این است که استفاده از مکمل‌های غذایی سبب پاسخ سیستم ایمنی به آنتی‌ژن‌های خوراکی، افزایش نفوذ آنتی‌ژن پروتئینی به خون، فعال‌سازی ماکروفاژها و هم‌چنین افزایش تولید IFNγ و TNF توسط ماکروفاژهای صفاقی گردید (٤۳). هم‌چنین تجویز خوراکی پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از پکتین لیمو در موش منجر به افزایش ترشح GM-CSF و IL-6 و بهبود فعالیت سلول‌های ایمنی گردیده است (٤٤). اخیراً نیز پکتین لیمو به‌عنوان پری‌بیوتیکی با قابلیت

تحریک ایمنی و TLR و T84 سلول‌های اپیتلیال روده شناخته شده است (٤٤). مطالعه حاضر بر اهمیت گنجاندن مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین در جیره غذایی کپور معمولی و پتانسیل آن برای بهبود بیان ژن‌های رشد و ایمنی تاکید می‌کند. بنابراین، مولتی‌آنزیم ناتوزیم و پکتین می‌توانند به عنوان یک افزودنی خوراکی طبیعی در آبزیان برای کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، برای کاهش پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دستیابی به غذای عاری از آنتی‌بیوتیک برای مصرف انسان عمل کنند.

منابع

1. Food and Agriculture Organization. Sustainability in action. (2020). In State World Fisheries and Aquaculture; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 244p.
2. Gatlin III, D. M. (2003). Nutrition and fish health. In *Fish nutrition* (pp. 671-702). Academic Press.
3. Chakraborty, S. B., & Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3 (3), 103-119.
4. No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74 (1-2), 65-72.
5. Hassaan, M. S., El-Sayed, A. I. M., Soltan, M. A., Iraqi, M. M., Goda, A. M., Davies, S. J. & Ramadan, H. A. (2019). Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 503, 282-292.
6. Zduńczyk, Z., Jankowski, J., Mikulski, D., Zduńczyk, P., Juśkiewicz, J., & Slominski, B. A. (2020). The effect of NSP-degrading enzymes on gut physiology and growth performance of turkeys fed soybean meal and peas-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 263, 114448.
7. E Abd Elnabi, H., DI Hassanen, G., A Soltan, M., & A Dokdok, G. (2020). Effect of Protease and Prebiotic mixtures with Free Fishmeal Diets on Physiological Responses and Histological Examinations of the Red Tilapia, *Oreochromis* sp. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 24 (2), 361-378.
8. Hassaan, M. S., Mohammady, E. Y., Adnan, A. M., Abd Elnabi, H. E., Ayman, M. F., Soltan, M. A., & El-Haroun, E. R. (2020). Effect of dietary protease at different levels of malic acid on growth, digestive enzymes and haemato-immunological responses of Nile tilapia, fed fish meal free diets. *Aquaculture*, 522, 735124.
9. Wickramasuriya, S., Kim, E., Shin, T. K., Cho, H. M., Kim, B., Patterson, R., & Heo, J. M. (2019). Multi-carbohydrase addition into a corn-soybean meal diet containing wheat and wheat by products to improve growth performance and nutrient digestibility of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 28 (2), 399-409.
10. Wealleans, A. L., Walsh, M. C., Romero, L. F., & Ravindran, V. (2017). Comparative effects of two multi-enzyme combinations and a Bacillus probiotic on growth performance, digestibility of energy and nutrients, disappearance of non-starch polysaccharides, and gut microflora in broiler chickens. *Poultry science*, 96 (12), 4287-4297.
11. Yaghobfar, A., Sharifi, S. D., & Golestani Milano, G. (2015). The Effect of Natuzyme Plus on Metabolizable Energy and Protein Digestibility of Diets Containing Wheat Grain and Canola

Meal in Broiler Chickens. *Research in Animal Production*, 5 (10), 57-68.

12. Ghodrati, M., Islami, H. R., Shekarabi, S. P. H., Masouleh, A. S., & Mehrgan, M. S. (2021). Combined effects of enzymes and probiotics on hemato-biochemical parameters and immunological responses of juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish & Shellfish Immunology*, 112, 116-124.
13. Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell host & microbe*, 23 (6), 705-715.
14. Guerreiro, I., Enes, P., & Oliva-Teles, A. (2015). Effects of short-chain fructooligosaccharides (scFOS) and rearing temperature on growth performance and hepatic intermediary metabolism in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish physiology and biochemistry*, 41, 1333-1344.
15. Zhou, Q. C., Buentello, J. A., & Gatlin III, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309 (1-4), 253-257.
16. Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16 (2), 117-136.
17. Hosseini, S. M., Hoseinifar, S. H., Mazandarani, M., Paknejad, H., Van Doan, H., & El-Haroun, E. R. (2020). The potential benefits of orange peels derived pectin on serum and skin mucus immune parameters, antioxidant defence and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 103, 17-22.
18. Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Elumalai, P., Tongsiri, S., Chitmanat, C., Jaturasitha, S., & Doolgindachbaporn, S. (2018). Effects of orange peels derived pectin on innate immune response, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 56-62.
19. Jackson, C. L., Dreaden, T. M., Theobald, L. K., Tran, N. M., Beal, T. L., Eid, M., ... & Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology*, 17 (8), 805-819.
20. Inngjerdingen, K. T., Patel, T. R., Chen, X., Kenne, L., Allen, S., Morris, G. A., & Paulsen, B. S. (2007). Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology*, 17 (12), 1299-1310.
21. Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Elumalai, P., Tongsiri, S., Chitmanat, C., Jaturasitha, S., & Doolgindachbaporn, S. (2018). Effects of orange peels derived pectin on innate immune response, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc system. *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 56-62.
22. Awad, E., Mitchell, W. J., & Austin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 34 (8).
23. Paulsen, S. M., Lunde, H., Engstad, R. E., & Robertsen, B. (2003). In vivo effects of β-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 14 (1), 39-54.
24. Bricknell, I. R., Bron, J. E., & Bowden, T. J. (2006). Diseases of gadoid fish in cultivation: a review. *ICES Journal of Marine Science*, 63 (2), 253-266.
25. Homauni, M., Imanpour, M. R., & Safari, R. (2021). Effect of Dietary Administration of Betaine and Natozim Multi-Enzyme on Growth, Indices and Growth Hormone Gene (GH) in Common Carp (*Cyprinus carpio*).
26. A El-ashry, M. (2021). Effect of dietary xylanase on growth performance,

digestive enzymes and physiological responses of nile tilapia, Oreochromis niloticus fingerlings fed plant-based diets. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59 (5), 71-80.

27. Musavi, M., Hasanpour, S., Safari, R., Imanpour, M. R., & Gutiérrez, J. (2022). Combined effects of Pediococcus acidi lactici and natuzyme on growth performance, hematology and immunity indices in juvenile beluga (Huso huso). *Aquaculture Reports*, 24, 101180.
28. Safari, R., Hoseinifar, S. H., Imanpour, M. R., Hajibegloo, A., Sanchouli, H., Homayouni, M., & Siddik, M. A. (2022). The effects of multi-enzyme and betaine on growth performance, body composition haemato-immunological parameters and expression of growth-related genes in beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 549, 737784.
29. Hoseinifar, S. H., Rashidian, G., Ghafarifarsani, H., Jahazi, M. A., Soltani, M., Doan, H. V .& Paolucci, M. (2021). Effects of apple (*Malus pomila*) pomace-derived pectin on the innate immune responses, expressions of key immune-related genes, growth performance, and digestive enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 11 (7), 2117.
30. Hosseini, S. M., Hoseinifar, S. H., Mazandarani, M., Paknejad, H., Van Doan, H., & El-Haroun, E. R. (2020). The potential benefits of orange peels derived pectin on serum and skin mucus immune parameters, antioxidant defence and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 103, 17-22.
31. Ali Zamini, A., Kanani, H. G., azam Esmaeili, A., Ramezani, S., & Zoriezahra, S. J. (2014). Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Comparative Clinical Pathology*, 23, 187-192.
32. Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25 (11), 633-642.
33. Tarkhani, R., Imani, A., Hoseinifar, S. H., Moghanlou, K. S., & Manaffar, R. (2020). The effects of host-associated Enterococcus faecium CGMCC1. 2136 on serum immune parameters, digestive enzymes activity and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings. *Aquaculture*, 519, 734741.
34. Triantaphyllopoulos, K. A., Cartas, D., & Miliou, H. (2020). Factors influencing GH and IGF-I gene expression on growth in teleost fish: how can aquaculture industry benefit? *Reviews in Aquaculture*, 12 (3), 1637-1662.
35. Aksakal, E., Ekinci, D., & Supuran, C. T. (2021). Dietary inclusion of royal jelly modulates gene expression and activity of oxidative stress enzymes in zebrafish. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36 (1), 885-894.
36. Bernard, H., Desseyn, J. L., Bartke, N., Kleinjans, L., Stahl, B., Belzer, C., & Husson, M. O. (2015). Dietary pectin–derived acidic oligosaccharides improve the pulmonary bacterial clearance of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by modulating intestinal microbiota and immunity. *The Journal of infectious diseases*, 211 (1), 156-165.
37. Hoseinifar, S. H., Esteban, M. Á., Cuesta, A., & Sun, Y. Z. (2015). Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23 (4), 315-328.
38. Dawood, M. A., & Koshio, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review. *Aquaculture*, 454, 243-251.
39. Hoseinifar, S. H., Eshaghzadeh, H., Vahabzadeh, H., & Peykaran Mana, N. (2016). Modulation of growth performances, survival, digestive enzyme activities and intestinal microbiota in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae

using short chain fructooligosaccharide. *Aquaculture research*, 47 (10), 3246-3253.

40. Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology*, 19 (2), 73-82.

41. Hoseinifar, S. H., Soltani, M., Rashidian, G., Ghafarifarsani, H., Jahazi, M. A., Doan, H. V., & Paolucci, M. (2021). The effect of different levels of pectin from Malus Pumila pomace on hematological and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 10 (1), 59-70.

42. Ehsani, M., & Torki, M. (2010). Effects of dietary inclusion of guar meal supplemented by β-mannanase on performance of laying hens, egg quality characteristics and diacritical counts of white blood cells. *Am. J. Anim. Vet. Sci*. 5 (4), 237-243.

43. Khramova, D. S., Popov, S. V., Golovchenko, V. V., Vityazev, F. V., Paderin, N. M., & Ovodov, Y. S. (2009). Abrogation of the oral tolerance to ovalbumin in mice by citrus pectin. *Nutrition*, 25 (2), 226-232.

44. Suh, D. C., Kim, Y., Kim, H., Ro, J., Cho, S. W., Yun, G., ... & Lee, J. (2014). Enhanced in vitro skin deposition properties of retinyl palmitate through its stabilization by pectin. *Biomolecules & therapeutics*, 22 (1), 73.