16(1) 77-84, Spring 2024

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Investigation of the effect of dietary supplemented with autolyzed yeast *Saccharomyces cerevisiae* on biochemical indicator changes (cholesterol and glucose) and the relative expression of some genes involved in immunity (LYZ and TNF-α) in zebra fish (*Danio rerio*)

Freshteh Khalili, Ali Shabani *, Hamed Paknejad, Mohammad Mazandarani

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Key Words

Cholesterol
Glucose
Zebrafish
Gene expression
LYZ
TNF-α
Autolyzed yeast

Abstract

Introduction: Yeasts are one of the most important and widely microorganisms used in food industry. Therefore, the present study was conducted to investigate the effect of dietary enriched with autolyzed *Saccharomyces cerevisiae* yeast on body biochemical parameter changes (cholesterol and glucose) and the relative expression of some genes involved in immunity (LYZ and TNF-α) in zebrafish.

Materials & Methods: For this aim, a number of 480 pieces of healthy zebra fish with an average weight of 0.18 ± 0.08 grams were completely randomly placed in aquariums with a water volume of 40 liters under different treatments of autolyzed yeast including 1 (AY1), 2 (AY2) and 5 (AY3) percent of diet along with a control group (0- basal diet) (three replicates) and were fed at 5% of body weight for 60 days. At the end of the trial, in order to check the biochemical index of the body (glucose and cholesterol) from all the treatments were completely randomly sampled to prepare the body extract (5 pieces from each replicate). Also, the expression of genes involved in immunity, including: LYZ and TNF-α, was evaluated using the whole-body method (3 parts of each replicate).

Results: The results obtained from gene expression after calculation by 2-ΔΔct formula and also other data were analyzed using SPSS software (version 21) through one-way analysis of variance. The results showed that the lowest amount of glucose was significantly observed in the control group (51.86±1.48 g dL-1) ($P<0.05$). The group fed with 2 (37.07±1.48 g mL-1) and 5 (43.37±1.02 g mL-1) percent of autolyzed yeast had higher cholesterol level compared to the control group (25.68± 2.43 g mL-1) and AY1 treatment (27.04 ± 4.57 g mL-1) ($P<0.05$). The highest relative expression of genes involved in immunity was significantly observed in AY3 treatment (feeding with autolyzed yeast at 5% of diet) ($P<0.05$).

Conclusion: In general, the results of this research showed that autolyzed yeast could improve some biochemical indicators of the body and the expression genes involved in the immunity in zebrafish. The best suggested level in the current research is 5% of autolyzed yeast in diet, which can be introduced as an immune stimulant to zebra fish breeding farmed.

* Corresponding Author's email: ali_shabany@yahoo.com
Received: 12 January 2022; Reviewed: 12 February 2023; Revised: 14 April 2023; Accepted: 17 May 2023
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.392400.2954

مقاله پژوهشی

بررسی اثر جیره غذایی حاوی مخمر اتولیز شده *Saccharomyces cerevisiae* روی تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی بدن (کلسترول و گلوکز) و بیان نسبی برخی از ژن‌های دخیل در ایمنی (LYZ و TNF-α) در ماهی زبرا (*Danio rerio*)

فرشته خلیلی، علی شعبانی، حامد پاک‌نژاد، محمد مازندرانی*

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

کلسترول
گلوکز
ماهی زبرا
بیان ژن
LYZ
TNF-α
مخمر اتولیزشده.

چکیده

مقدمه: مخمرها یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در صنایع غذایی می‌باشند. از این‌رو، تحقیق حاضر با هدف‌تعیین اثرجیره حاوی مخمر اتولیزشده ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cerevisiae*) برتغییرات بیوشیمیایی بدن (کلسترول و گلوکز) و بیان نسبی برخی از ژن‌های دخیل در ایمنی (LYZ و TNF-α) ماهی زبرا طرح‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها: بدین‌منظور، تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی زبرا با میانگین وزنی ۰/۰۸±۰/۱۸ گرم به‌صورت کاملاً تصادفی درآکواریوم‌هایی با حجم آب ۴۰ لیتر به‌مدت ۶۰ روز با سطوح مختلف مخمر اتولیزشده در جیره غذایی پایه شامل: 1 (AY1)، 2 (AY2) و 5 (AY3) درصد جیره به همراه یک گروه شاهد (سه تکرار) به‌میزان ۵ درصد وزن بدن مورد تغذیه قرار گرفتند. در پایان دوره، جهت بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی بدن (گلوکز و کلسترول) از تمام تیمارها برای تهیه عصاره بدن (به‌دلیل کوچک بودن‌ماهی) به‌طور کاملاً تصادفی‌نمونه‌برداری‌صوررت گرفت (۵ قطعه از هر تکرار). هم‌چنین، سنجش بیان ژن‌های دخیل در ایمنی شامل: LYZ و TNF-α به‌روش استفاده از کل بدن مورد ارزیابی قرار گرفت (۳ قطعه از هر تکرار). نتایج به‌دست آمده از بیان ژن پس از محاسبه با فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ و هم‌چنین سایر داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۱) از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تجلیل قرار گرفتند.

نتایج: نتایج حاصل نشان داد که کم‌ترین میزان گلوکز به‌طور معنی‌داری در گروه شاهد (۱/۴۸±۸۶/ ۵۱ گرم در دسی‌لیتر) مشاهده شد (P<۰/۰۵). گروه تغذیه شده با ۲ (۱/۴۸±۳۷/۰۷ گرم بر میلی‌لیتر) و ۵ (۱/۰۲±۴۳/۳۷ گرم بر میلی‌لیتر) درصد جیره مخمراتولیزشده دارای میزان کلسترول بیش‌تری در مقایسه با گروه شاهد (۲/۴۳±۲۵/۶۸ گرم بر میلی‌لیتر) و تیمار AY1 (۴/۵۷±۲۷/۰۴ گرم بر میلی‌لیتر) بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن‌های دخیل در ایمنی نیز به‌طور معنی‌داری در تیمار AY3 (تغذیه با مخمر اتولیزشده به‌میزان ۵ درصد جیره) مشاهده شد (P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که مخمر اتولیزشده توانست سبب بهبود برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی بدن و بیان ژن‌های درگیر در ایمنی ماهی زبرا شود. بهترین سطح پیشنهادی درتحقیق‌حاضر، میزان ۵ درصد جیره مخمر اتولیزشده می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک محرک ایمنی برای ارتقاء سیستم ایمنی ماهی زبرا به کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی زبرا معرفی گردد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ali_shabany@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۲۲ دی ۱۴۰۱؛ تاریخ داوری: ۲۳ بهمن ۱۴۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۲۵ فروردین ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ اردیبهشت ۱۴۰۲
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.392400.2954

مقدمه

آبزیان پرورشی، در طول دوره پرورش با عوامل محدودکننده‌ای ازجمله بیماری‌ها و شرایط نامطلوب محیطی روبرو هستند که در صورت عدم کنترل شرایط محیطی، عوامل بهداشتی و نیز اعمال مدیریتی نامناسب با کاهش رشد، کاهش بازدهی خوراک و بروز شدت‌های مختلفی از بیماری‌های مزمن تا حاد مواجه می‌شوند، لذا، حفظ حالت پایدار داخلی بدن و به‌کارگرفتن راهکارهایی جهت پیشگیری از وقوع بیماری تضمین کننده آبزی‌پروری موفق خواهد بود (۱، ۲). در سال‌های اخیر با توجه به اثرات جانبی، زیست‌محیطی و مقاومت‌های دارویی در استفاده از ترکیبات شیمیایی به‌خصوص آنتی‌بیوتیک‌ها، محدودیت‌هایی در استفاده از این ترکیبات اعمال شده‌است (۳، ۴). از این‌رو، توجه به سایر مکمل‌های غذایی در جیره غذایی آبزیان در جهت افزایش عملکرد رشد و بهبود سلامت آن‌ها افزایش یافت (۵، ۶). یکی از ترکیباتی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است مکمل‌های میکروبی شامل باکتری‌ها و مخمرها می‌باشند (۷، ۸). این مکمل‌ها یا محصولات جانبی زیستی‌شان با داشتن ارزش غذایی بالا و قابلیت بالقوه به‌عنوان مکمل‌های غذایی می‌توانند فواید متعددی برای میزبان داشته باشند (۹). برای مثال، تاکنون اثرات مثبت استفاده از برخی از محصولات جانبی مخمرها مانند: آلفا و بتاگلوکان، کیتین، اسیدهای نوکلئیک، اولیگوساکاریدهای مانان، بتاکاروتن، بکمپلکس، تورولن و تورولاالودین به‌عنوان مکمل خوراکی در جیره غذایی آبزیان ثابت شده است (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵) که می‌توانند به‌طور مستقیم روی رشد، بهبود عملکرد سیستم ایمنی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر مثبت داشته و درنتیجه نقش مهمی در افزایش مقاومت میزبان در برابر بیماری‌های رایج ویروسی و باکتریایی ایفا کنند (۹). پژوهشگران در سال‌های اخیر به فکر استفاده از محصولات جانبی مخمرها افتادند. یکی از این محصولات، مخمر اتولیزشده ساکارومایسس سرویسیه می‌باشد. دیواره سلولی این مخمر غنی از پلی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدهاست (۱۶، ۱۷). مانان الیگوساکارید، یک الیگوساکارید و کمپلکس گلوکومانانو پروتئینی مشتق‌شده از منابع مختلفی است و یکی از این منابع مهم آن، دیواره سلولی مخمر نانوایی است (۱۸) که سبب بهبود عملکرد رشد، افزایش کارایی تغذیه و تقویت سیستم ایمنی دام و طیور و آبزیان شده است (۱۹، ۲۰). گلوکان‌ها نیز ترکیبات پلی‌ساکاریدی و در حقیقت نوعی پلیمر گلوکز با وزن مولکولی بالا هستند (۲۱) که تاکنون گزارش‌هایی از تاثیر مثبت آن‌ها در افزایش ایمنی آبزیان وجود داشته است (۲۲). مخمر اتولیزشده محصول تخریب سلولی است که توسط آنزیم‌های خودسلول فعال می‌شود که اجزای سلولی را حل می‌کند (۲۳، ۲۴). ترکیب مخمر اتولیزشده بسته به فرآیندی که برای تولید آن استفاده می‌شود متفاوت است. معمولاً مخمر اتولیز شده ساکارومایسس سرویسیه حاوی ۲۹ تا ۶۴ درصد بتا-گلوکان، ۳۱ درصد مانان الیگوساکارید، ۱۳ درصد پروتئین و ۹ درصد لیپید است (۲۵). ۱۰ نوع آمینواسید شامل: آلانین، آرژنین، آسپاراژین، اسید آسپارتیک، سیستئین، اسیدگلوتامیک، گلوتامین، گلیسین، هیستیدین و لیزین نیز اجزای اصلی مخمر اتولیزشده هستند (۲۶، ۲۷). مخمر اتولیزشده دارای یک فعالیت کاهشی قوی و اثر بازدارندگی و مهاری بر یون‌های فلزات واسطه و رادیکال‌های آزاد است که باعث زوال ماکرومولکول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۲۸). هم‌چنین، به دلیل داشتن الیگوساکارید و پلی‌ساکاریدهای غیرقابل هضم خاصیت پری‌بیوتیکی آن اثبات شده‌است (۲۹، ۳۰). در همین راستا، Glencross و همکاران گزارش کردند که ترکیبات زیست فعال مخمر مانند: گلوکان‌ها، نوکلئوتیدها، پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌های کاروتنوئید، لیپیدها، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها توانستند پاسخ ایمنی میزبان آبزی را فعال کرده و میکروبیوتای روده را بهبود بخشند (۳۱). با توجه به اهمیت دیواره سلولی مخمر در تقویت سیستم ایمنی در ماهیان، و با توجه به این که هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با اثرات مخمر اتولیزشده ساکارومایسس سرویسیه روی شاخص‌های بیوشیمیایی بدن و بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل حیوانی صورت نگرفته است، لذا مطالعه حاضر، با هدف بررسی تأثیر استفاده از مخمر اتولیزشده ساکارومایسس سرویسیه روی تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن و بیان برخی از ژن‌های دخیل در ایمنی ماهی زبرا صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش، ۴۸۰ قطعه ماهی زبرای سالم با میانگین وزنی ۰/۱۸±۰/۰۸ گرم از فروشنده تجاری در تهران خریداری شد. جهت سازگاری ماهیان با شرایط آزمایش و قبل از تیماربندی، به‌مدت دو هفته در تانک‌های ۴۰ لیتری که از قبل با آب نمک ضدعفونی شده بودند نگه‌داری شدند. در این دو هفته ماهیان با غذای تجاری مورد تغذیه قرار گرفتند (۳۲). پس از گذشت مدت زمان لازم جهت سازگاری و وزن‌کشی اولیه، ماهیان به‌صورت کاملاً تصادفی در ۱۲ عدد آکواریوم با حجم آب ۴۰ لیتر توزیع شدند (۴۰ قطعه در هر آکواریوم)، نحوه تیماربندی ماهیان براساس مطالعات قبلی با کمی تغییرات صورت پذیرفت: ۰ (گروه شاهد)، ۱ (AY1)، ۲ (AY2) و ۵ (AY3) درصد مخمر اتولیزشده به‌ازای کیلوگرم جیره تجاری (۳۳، ۳۴). مقدار غذادهی ۵ درصد مجموع وزن بدن ماهیان در نظر گرفته شده بود که در ۳ وعده غذایی (۸ صبح، ۱۴ بعد از ظهر و ۸ شب) به‌مدت ۶۰ روز انجام شد (۳۵). در این مطالعه، از غذای بیومار ساخت کشور فرانسه با قطر ۰/۵ میلی‌متر استفاده شد. میزان چربی، پروتئین و کربوهیدرات تقریبی جیره در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱: آنالیز تقریبی جیره بیومار فرانسه (۳۶)

	پروتئین	چربی	خاکستر	رطوبت	فیبر	انرژی (کیلوکالری)
درصد	۵۲/۴۵	۱۸/۴۴	۱۱/۳۵	۱۵/۶۶	۱/۲	۴۶۷۱/۳۲

مخمر اتولیزشده با نام تجاری نوتری‌بیست‌آکوا از شرکت دانش بنیان بهان کیمیاآنزیم (کیمیازیم) خریداری شد. محصول خریداری شده جهت حصول اطمینان از عدم وجود رطوبت احتمالی در آن، به مدت ۲۴ ساعت در آون (مدل بیندرED53، آلمان) با دمای ۳۷ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۳۷). سپس، مخمر اتولیزشده در سطوح ذکر شده به‌صورت جداگانه به جیره تجاری اضافه گردید. برای به حداقل رساندن میزان آبشویی ترکیبات از ژلاتین ۴ درصد به عنوان پوشش استفاده شد. هم‌چنین، برای به حداقل رساندن خطای احتمالی به جیره گروه شاهد نیز ژلاتین ۴٪ افزوده شد، (۳۸). جیره‌های تهیه شده در یک محیط خنک و تمیز به تا زمان خشک شدن قرار گرفتند. در انتها هر جیره درون یک زیپ‌پلاست جداگانه باذکر مشخصات درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (۳۶). در هر بار آماده‌سازی جیره، وزنی معادل ۱۰ روز مصرف درنظر گرفته می‌شد. در انتهای آزمایش، به‌منظور بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن به‌صورت کاملاً تصادفی از ماهیان نمونه‌برداری شد. به‌همین منظور، قبل از نمونه‌برداری غذادهی ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت متوقف شد. جهت اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن، ماهی‌ها بلافاصله پس از نمونه‌برداری و بی‌هوشی با پودر گل میخک به‌میزان ۵۰میلی‌گرم در یک لیتر آب، هموژنایز شدند. سپس، نمونه‌های هموژنیزه شده به‌همراه بافر فسفات استریل با pH ۴/۷ مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند. در انتها، مایع رویی یا همان سوپرناتات جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش‌های مربوطه در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد(۳۹). برای سنجش میزان کلسترول در نمونه‌های گرفته شده از کیت تجاری شرکت پارس آزمون و بر اساس دستورالعمل مندرج روی بسته با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perstige 24i) در طول موج ۵۴۶ نانومتر استفاده شد (۴۰). سنجش گلوکز نیز با روش آنزیمی گلوکوز هگزوکیناز ساخت شرکت Sigma Aldrich آلمان برحسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر انجام شد(۴۱). جهت انجام بررسی‌های ژنتیکی ژن‌های مرتبط با ایمنی (TNF-α وLyz) از بافت کل بدن نمونه‌برداری گردید، از این‌رو، پس از صید ۳ قطعه ماهی از هر تکرار و بی‌هوشی به‌روش آسان‌کشی (قرار دادن در مجاورت یخ) (۴۲) نمونه‌های تهیه شده بلافاصله در ازت مایع قرار گرفتند و تا زمان شروع آزمایشات در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(۴۳). استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNAx Plus مطابق روش پیشنهادی شرکت سازنده (ایران- سیناژن) در حضور ازت مایع انجام شد. ابتدا نمونه‌ها با استفاده از هاون و بوته چینی در مجاورت ازت مایع کوبیده شدند و بافت هدف به‌صورت هموژن درآمد؛ سپس فرآیند استخراج انجام شد. جهت ارزیابی کیفی RNA کل از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. هم‌چنین برای سنجش کمیت (غلظت) RNA از دستگاه نانودراپ-ND (Thermo Scientific 1000) استفاده گردید. با استفاده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100) مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر قرائت شد(۴۴). برای از بین بردن DNA ژنومی احتمالی در RNA استخراج شده‌از (DNase Invitrogen, CA, USA) استفاده شد. cDNA با استفاده از کیت جنت بایو محصول کشورکره و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سنتز گردید (۴۵). در این آزمایش از پرایمرهای استفاده شده در مطالعات قبلی Safari و همکاران استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ آمده است (۳۹).

جدول۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای ماهیان زبرای تغذیه شده با مخمر اتولیزشده (۳۹)

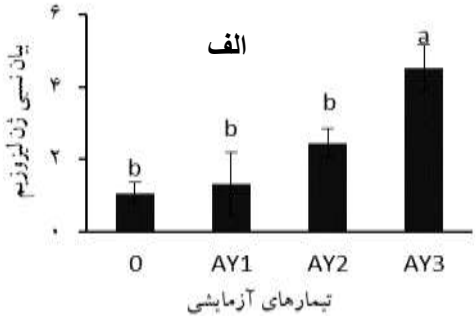
شماره دسترسی	توالی (´۳-´۵)	نام ژن
AY427649.1	رفت: CTGCTTCACGCTCCATAAGA برگشت: CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	TNF-α
NM_139180.1	رفت: GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC برگشت:CGTAGTCCTTCCCCGTATCA	LYZ
NM_131031.1	رفت:AGCAGATGTGGATCAGCAAG برگشت:TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	Betta-actin

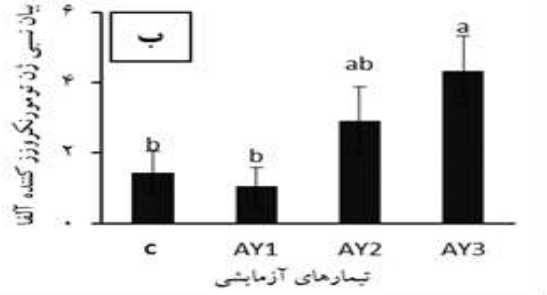
در این تحقیق Real time PCR در تیوپ‌های مخصوص و در ۳ تکرار تکنیکی برای هر تیمار انجام گردید. محتویات هر تیوپ به مقدار ۲۰ میکرولیتر به این شرح بود: ۱۰ میکرولیتر بافر سایبرگرین، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پیش‌رونده ژن هدف و رفرنس، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلی‌مراز، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف و رفرنس، ۶/۴۰ میکرولیتر آب، ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده و ۱ میکرولیتر دی متیل سولفواکساید. نتایج به‌دست آمده توسط دستگاه Real time PCR تحت عنوان CT می‌باشد که نشان‌دهنده تعداد چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌کند (۴۴). داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن‌های ایمنی بعد از محاسبه با فرمول-2 ΔΔct (ΔΔCt) برابر است با ΔCt ژن هدف منهای ΔCt کالیبراتور) (۴۶) و هم‌چنین داده‌های مربوط به سایر شاخص‌های اندازه‌گیری شده جهت بررسی نرمالیتی با استفاده از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفتند؛ سپس، داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند

دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Standard error) نمایش داده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. تمامی نمودارها و جدول‌ها با استفاده از نرم‌افزار آفیس ۲۰۱۶ ترسیم شدند.

نتایج

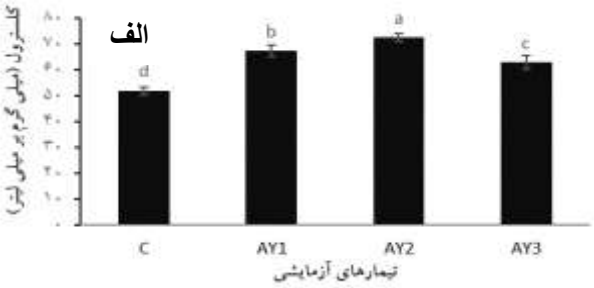
نتایج به‌دست آمده از بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده در شکل ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از این شکل نشان داد که بیش‌ترین میزان گلوکز در مقایسه با گروه شاهد در تمامی تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین، میزان کلسترول بین تیمارهای AY2 و AY3 اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)؛ اگرچه، بین این دو تیمار با گروه شاهد و تیمار AY1 اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده در شکل ۲ آورده شده است. نتایج حاصل از این شکل نشان داد که بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن لیزوزیم و فاکتورنکروزکننده تومورآلفا در تیمار AY3 (تغذیه با مخمر اتولیزشده به‌میزان ۵ درصد جیره) وجود داشت که در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود (P<۰/۰۵).

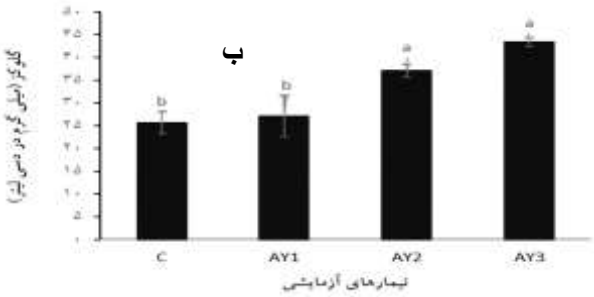




شکل ۲: بیان نسبی ژن‌های دخیل در ایمنی: الف) لیزوزیم، ب) فاکتورنکروزکننده تومورآلفا در ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره‌غذایی حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده به مدت ۶۰ روز

عدم وجود حروف لاتین نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (P>۰/۰۵).





شکل۱: شاخص‌های بیوشیمیایی عصاره بدن در ماهیان زبرای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده به‌مدت ۶۰ روز؛ الف) گلوکز، ب) کلسترول

وجود تفاوت در حروف لاتین نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (P<۰/۰۵).

AY1: 1 درصد جیره مخمر اتولیزشده، **AY2: 2** درصد جیره مخمر اتولیزشده، **AY3: 5** درصد جیره مخمر اتولیزشده، **C**: گروه شاهد

بحث

در تعاریف انجمن بین‌المللی شیمی محض و کاربردی، الیگوساکاریدها را ساکاریدهایی معرفی کردند که قند آن‌ها بین ۳ تا ۱۰ بخش است و همین بخش است که ساختار اصلی مکمل‌های پری‌بیوتیکی را تشکیل می‌دهد (۴۷). تاکنون تحقیقات نشان داد که برخی از انواع پری‌بیوتیک‌ها مانند مانان الیگوساکارید، گلوکان و فروکتوالیگوساکارید توانسته‌اند اثرات مثبتی روی شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم خون، ایمنی ذاتی، عملکرد رشد و بهبود فلور میکروبی برخی از گونه‌ها داشته باشند (۴۸، ۴۹، ۵۰). گلوکز یکی از شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون می‌باشد که سنجش آن به‌عنوان شاخصی مناسب به‌منظور بررسی‌های فیزیولوژیکی می‌باشد (۵۱). این شاخص نیز به‌عنوان اندیکاتوری مطرح است که در شرایط استرس نیز می‌تواند برای فهمیدن وضعیت عمومی بدن فاکتور مهمی به‌شمار آید (۵۲). گلوکز به‌همراه کورتیزول دو شاخصی هستند که در شرایط استرس مقدارشان افزایش می‌یابد (۵۳، ۵۴). هم‌چنین، در شرایط عادی نیز، زمانی‌که مقدار زیادی از مواد غذایی با میزان بالای کربوهیدرات مصرف شود، گلوکز موجود در خون در اثر تجزیه و هضم کربوهیدرات‌ها افزایش می‌یابد، این بدان معناست که گلوکز به‌شدت تحت تاثیر فاکتورهای محیطی شامل: وضعیت تغذیه‌ای، تغییرات فصلی و بلوغ جنسی قرار دارد (۵۵). میزان گلوکز در گونه‌های مختلف در محدوده‌ای میان ۳۵۰-۲۵ میلی‌گرم

بر دسی‌لیتر قرار دارد (۵۶). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که میزان گلوکز خون گروه شاهد از تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود که احتمال می‌رود این کاهش به‌دلیل نبود منبع پری‌بیوتیکی در جیره پایه باشد و از سویی دیگر، افزایش معنی‌دار گلوکز در خون تیمارها را می‌توان به وجود منبع غنی پری‌بیوتیکی یعنی مخمر اتولیزشده نسبت داد. اگرچه، برای اظهار نظر دقیق‌تر می‌بایست آنزیم‌های گوارشی به‌خصوص آنزیم آمیلاز و نیز دیگر شاخص استرس یعنی کورتیزول مورد سنجش قرار می‌گرفت که در تحقیق حاضر این بررسی‌ها صورت نگرفته است. با این‌حال، در تطابق با نتایج مطالعه حاضر می‌توان به تحقیقات Kiihlwein و همکاران (۵۷)، Dobsikova و همکاران (۵۸) در ارتباط با بررسی پری‌بیوتیک‌های حاوی گلوکان‌ها و Ebrahimi و همکاران (۵۹) در ارتباط با پری‌بیوتیک تجاری ایمونوژن در ماهی کپورمعمولی اشاره کرد. تحقیقات نشان داد که پری‌بیوتیک‌ها چون جزو دسته الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم قرار دارند، به‌دلیل فقدان آنزیم‌های هیدرولیزکننده اتصالات نوع بتا (β) بین واحدهای منوساکاریدی در بدن موجودات، این مواد در بسیاری از موجودات ازجمله ماهی‌ها قابل جذب نمی‌باشند. لذا، این ترکیبات در برابر فرایند گوارش مقاومت کرده و تنها توسط برخی از باکتری‌های بی‌هوازی موجود در دستگاه گوارش قابلیت تجزیه شدن را پیدا می‌کنند. این باکتری‌ها بیش‌تر شامل بیفیدوباکترها، لاکتوباسیلوس‌ها و سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک بوده که قادرند با تخمیر الیگوساکاریدها اثرات مفیدی برای میزبان به‌همراه داشته باشند. بنابراین تغذیه ماهی‌ها با این نوع کربوهیدرات‌ها می‌تواند سبب افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده شود و در اثر فعالیت این باکتری‌ها کربوهیدرات‌ها به مونومرهای تشکیل‌دهنده آن‌ها یعنی گلوکز تبدیل می‌شوند (۶۰) و ممکن است بتوان افزایش گلوکز در تیمارهای تغذیه شده با پری‌بیوتیک مخمراتولیزشده را توجیه نمود. در تحقیق حاضر، مشاهده گردید که میزان کلسترول در گروه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۲ و ۵ درصد جیره مخمراتولیزشده در مقایسه با دو گروه دیگر، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. کلسترول موجود در بدن ماهی، نقش حیاتی در اعمال مختلف بدن دارد. به‌طور کلی، در سلول‌های پوستی، کلسترول به تستوسترون (T) تبدیل می‌شود. سپس از طریق لایه گرانولوزا منتشر و در نهایت توسط آروماتاز (P450Arom) که توسط ژن CYP19a کدگذاری می‌شود، به E2 (استرادیول) تبدیل می‌شود. پس از سنتز، استرادیول از طریق جریان خون به کبد منتقل می‌شود، وارد سلول‌های کبدی شده و به گیرنده‌های استرادیول (ER) متصل می‌شود. کمپلکس E2-ER به عناصر پاسخگو به استروژن (ERE) در پروموترهای ژن‌های vtg (ویتلوژنین) متصل می‌شود و سنتز ویتلوژنین را آغاز می‌کند (۶۱). هم‌چنین، افزایش کلسترول خون در نتیجه مکمل‌سازی جیره با کلسترول به‌میزان ۱/۲٪، سبب افزایش مقاومت ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر چالش باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا شد (۶۲). بنابراین، در تحقیق حاضر می‌توان چنین بیان کرد که مخمراتولیزشده به‌عنوان یک پری‌بیوتیک ممکن است توانسته باشد با تاثیر بر فلور میکروبی روده میزبان سبب افزایش هضم چربی‌ها شود و از این طریق با تاثیر احتمالی روی جذب مواد مغذی، سبب افزایش کلسترول خون گردد. ممکن است این میزان کلسترول بتواند زمان رسیدگی جنسی را کاهش دهد و مقاومت ماهیان را در برابر چالش‌های احتمالی افزایش دهد که البته اظهار نظر دقیق در ارتباط با این موضوع به تحقیقات بیش‌تری در سطح مولکولی و بافت‌شناسی نیاز دارد که در این پژوهش از انجام آن صرف نظر شد. در تطابق با نتایج تحقیق حاضر می‌توان به مطالعه Torrecillas و همکاران اشاره کرد (۶۳). آن‌ها گزارش کردند ماهیان سیم دریایی که با رژیم غذایی حاوی مانان الیگوساکارید تغذیه کرده بودند، اسیدهای چرب آزاد و کلسترول بیش‌تری در مقایسه با گروه شاهد داشتند که این امر می‌تواند با کمک به حفظ ساختار و عملکرد غشاء، به کاهش نرمی لایه دوتایی لیپیدی کمک کند (۶۴). بنابراین مانان الیگوساکارید نقش مهمی در افزایش میزان کلسترول و حفظ استحکام سلولی داشت. با این‌حال، Gelibolu و همکاران، گزارش کردند که رژیم غذایی حاوی مانان الیگو ساکارید در ماهی سیم دریایی سبب کاهش معنی‌دار میزان کلسترول گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد شد (۶۵). به‌نظر می‌رسد که این نوسان در متغیرهای هماتولوژیک و بیوشیمیایی ممکن است با ویژگی‌های گونه‌ها، میزان ورود و دریافت پری‌بیوتیک، مواد تشکیل دهنده جیره، دوره پرورش و شاخص‌های دیگر مربوط به فیزیولوژی ماهی مرتبط باشد (۴۹). نتایج حاصل نشان داد که بیش‌ترین میزان بیان نسبی ژن لیزوزیم و فاکتور نکروزکننده تومور آلفا به‌طور معنی‌داری در تیمار AY3 (تغذیه با مخمر اتولیزشده به‌میزان ۵ درصد جیره) وجود داشت. افزایش معنی‌دار این ژن‌ها در تحقیق حاضر در نتیجه استفاده از جیره حاوی مخمراتولیزشده به‌دلیل وجود ترکیباتی با خاصیت پری‌بیوتیکی سبب تحریک سیستم ایمنی ماهیان زبرا شده که این امر نشان‌دهنده افزایش پاسخ ایمنی اختصاصی بچه‌ماهیان می‌باشد. در واقع، پری‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی ماهی زبرا در تحقیق حاضر، با تحریک گیرنده‌های روده میزبان افزایش پاسخ ایمنی و بیان نسبی ژن‌های دخیل در ایمنی را منجر شدند. تحقیقات نشان داد که در سیستم ایمنی ماهیان و در رابطه با التهابات، مولکول فاکتور نکروز کننده تومور که یک سایتوکین است، نقش مهمی دارد. این مولکول سایتوکینی در پی ایجاد تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود. در واقع، TNF-α یک تعدیل‌کننده اصلی و سایتوکین موثر بر پاسخ‌های التهابی و ضدمیکروبی مطرح می‌باشد (۶۶). TNF-α به‌مقدار زیادی در کلیه ماهیان بیان می‌شود (۶۷). فاکتور نکروزکننده تومور آلفا مانند سایر اعضای خانواده خود (سایر سایتوکین‌ها) به‌صورت یک تریمر به پذیرنده اختصاصی خود متصل می‌شود. این حالت موجب اتصال متقاطع پذیرنده‌ها به‌وسیله لیگاند شده که در نتیجه این پیوند، پیام به‌درون سلول انتقال می‌یابد. براساس مطالعات ازجمله عناصر تغذیه‌ای که سبب افزایش ترشح سایتوکین‌ها، اینترلوکین‌ها (IL) و

عامل نکروز توموری الفا می‌گردند وجود مقادیر زیاد بتاگلوکان، پلی‌ساکاریدهای سولفاته و یا نوکلئوتیدها می‌باشد (۶۸). مخمر اتولیز شده یکی از منابع غنی پلی‌ساکاریدهای غیرقابل هضم از جمله بتاگلوکان می‌باشد که می‌تواند ازجمله عوامل توجیه‌کننده افزایش بیان ژن‌های ایمنی در این بررسی باشد. این فاکتور به‌صورت یک پیش‌پپتید ساخته شده و سپس در درون سلول، به‌وسیله یک آنزیم مبدل فاکتور نکروز کننده تومور آلفا پردازش شده به فرم بالغ خود تبدیل می‌شود که طول آن به اندازه ۱۵۷ اسید آمینه است. در همین راستا می‌توان به مطالعات Torrecillas و همکاران (۶۹)، Jami و همکاران (۷۰)، Khosravi-Katuli و همکاران (۷۱)، Medina-Gali و همکاران (۷۲)، Rodríguez و همکاران (۷۳) اشاره کرد که گزارش کردند که با افزودن پری‌بیوتیک مانان‌الیگوساکارید و بتاگلوکان به جیره غذایی بیان نسبی ژن TNF-α افزایش یافت. از سویی دیگر، لیزوزیم یکی از شاخص‌های بسیار مهم در سیستم ایمنی ماهی است، زیرا این مولکول پروتئینی می‌تواند به‌طور مستقیم لکوسیت‌ها و ماکروفاژها را فعال کرده و عمل فاگوسیتوز را در ماهیان آب شیرین افزایش دهد (۷۴). لذا افزایش لیزوزیم از جمله عوامل مهمی است که از بروز بیماری‌ها در ماهیان جلوگیری می‌کند. در همین راستا Chen و همکاران، گزارش کردند که بیان نسبی ژن لیزوزیم در ماهیان تیلاپیای نیل تغذیه شده با بتاگلوکان به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۷۵). هم‌چنین، مطالعه Yousefi و همکاران، در ارتباط با تاثیر پری‌بیوتیک گالاکتوالیگوساکارید روی افزایش بیان نسبی ژن لیزوزیم ماهی زبرا در تطابق با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد که بیان کردند پری‌بیوتیک‌ها با تعدیل‌سازی محیط روده‌میزبان، سبب افزایش بیان‌نسبی ژن‌های‌ایمنی می‌گردند (۳۲). به‌طورکلی، خاصیت پری‌بیوتیکی محصولات جانبی مخمرها ثابت شده است (۷۶، ۷۷). نتایج تحقیق حاضر نیز در تایید مطالعات گذشته نشان‌داد که استفاده از سطوح متفاوت مخمر اتولیزشده سبب بهبود میزان کلسترول، گلوکز و بیان ژن‌های دخیل در ایمنی ماهی زبرا شد. هم‌چنین، بهترین سطح پیشنهادی در تحقیق حاضر، میزان ۵ درصد جیره مخمر اتولیزشده می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان یک محرک ایمنی برای ارتقاء سیستم ایمنی ماهی زبرا به کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهی زبرا معرفی گردد.

منابع

1. **Van Doan, H., Hoseinifar, S.H., Sringarm, K., Jaturasitha, S., Yuangsoi, B., Dawood, M.A., Esteban, M.Á., Ringø, E. and Faggio, C., 2019.** Effects of Assam tea extract on growth, skin mucus, serum immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*. Fish & Shellfish Immunology. 93: 428-435.
2. **Dawood, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M. and Yokoyama, S., 2015.** Effects of heat killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) supplemental diets on growth performance, stress resistance and immune response of red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture. 442: 29-36.
3. **Dos Santos Ramos, M.Á., Da Silva, P.B., Spósito, L., De Toledo, L.G., Bonifacio, B.V., Rodero, C.F., Dos Santos, K.C., Chorilli, M. and Bauab, T.M., 2018.** Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. International Journal of Nanomedicine. 27: 1179-1213.
4. **Langdon, A., Crook, N. and Dantas, G., 2016.** The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. Genome Medicine. 8(1): 1-6.
5. **Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Dawood, M.A., El Basuini, M.F., El-Hais, A.M. and Olivier, A., 2018.** Effect of partial replacement of fish meal by fermented rapeseed meal on growth, immune response and oxidative condition of red sea bream juvenile, *Pagrus major*. Aquaculture. 490: 228-235.
6. **Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G. and Mohanta, K.N., 2013.** Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 97(3): 405-430.
7. **Shadrack, R.S., Manabu, I., Yokoyama, S., Koshio, S., Miguel, V.A., Yukun, Z., Mzengereza, K., Seo, S., Dossou, S. and El Basuini, M.F., 2022.** Specific importance of low-level dietary supplementation of yeast strain in red sea bream. Annals of Animal. 22(3): 1073-1085.
8. **Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M.A., Ringø, E., Ahmadifar, E. and Abdel-Latif, H.M., 2022.** Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. Aquaculture. 547: 737514.
9. **Ernesto Ceseña, C., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, G., Luna-Gonzalez, A. and Campa-Cordova, A., 2021.** Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. International Aquatic Research. 13(1): 1-6.
10. **Ching, J.J., Shuib, A.S., Abdul Majid, N. and Mohd Taufek, N., 2021.** Immunomodulatory activity of β-glucans in fish: Relationship between β-glucan administration parameters and immune response induced. Aquaculture Research. 52(5): 1824-1845.
11. **Cheng, A.C., Shiu, Y.L., Chiu, S.T., Ballantyne, R. and Liu, C.H., 2021.** Effects of chitin from *Daphnia similis* and its derivative, chitosan on the immune response and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 119: 329-338.
12. **Ridwanudin, A., Kasuya, H., Haga, Y., Kabeya, N. and Satoh, S., 2021.** Interactive effect of dietary fish oil and pyrimidine nucleotide supplementation on the fatty acid composition of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Enhancement of ARA and DHA contents in the fillet of fish fed-supplemented diet. Aquaculture Research. 52(10): 4934-4945.
13. **El-Nobi, G., Hassanin, M., Khalil, A.A., Mohammed, A.Y., Amer, S.A., Montaser, M.M. and El-Sharnouby, M.E., 2021.** Synbiotic effects of Saccharomyces cerevisiae, mannan oligosaccharides, and β-glucan on innate immunity, antioxidant status, and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Antibiotics. 10(5): 567.
14. **Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Soaudy, M.R., Sabae, S.A., Mahmoud, A.M. and El-Haroun, E.R., 2021.** Comparative study on the effect of dietary β-carotene and phycocyanin extracted from Spirulina platensis on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology. 108: 63-72.
15. **Ernesto Ceseña, C., Vega-Villasante, F., Aguirre Guzman, G., Luna-Gonzalez, A. and Campa-Cordova, A., 2021.** Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. International Aquatic Research. 13(1): 1-6.
16. **Fesel, P.H. and Zuccaro, A., 2016.** β-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. Fungal Genetics and Biology. 90: 53-60.
17. **Van den Abbeele, P., Duysburgh, C., Rakebrandt, M. and Marzorati, M., 2020.** Dried yeast cell walls high in beta-glucan and mannan-oligosaccharides positively affect microbial composition and activity in the canine gastrointestinal tract in vitro. Journal of Animal Science. 98(6): 173.

35. **Zakariaee, H., Sudagar, M., Hosseini, S.S., Paknejad, H. and Baruah, K., 2021.** In vitro Selection of Synbiotics and in vivo Investigation of Growth Indices, Reproduction Performance, Survival, and Ovarian Cyp19α Gene Expression in Zebrafish *Danio rerio*. Frontiers in Microbiology. 12: 758758.

36. **Metinfar, A., Inayat Gholampour, T., Shabani Kakrodi, S. and Fadai Raini, M., 2017.** The effect of garlic essential oil (*Allium sativum*) on growth and survival indicators, some blood biochemical indicators and digestive enzymes of zebra fish (*Danio rerio*). Scientific Journal of Iranian Fisheries, 27(6): 143-149.

37. **Zargari, A., Mazandarani, M. and Hoseini, S.M., 2018.** Effects of safflower (*Carthamus tinctorius*) extract on serum antibacterial activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and *Yersinia ruckeri*. International Journal of Aquatic Biology. 6(1): 1-7.

38. **El Basuini, M.F., Teiba, II., Zaki, M.A., Alabssawy, A.N., El-Hais, A.M., Gabr, A.A., Dawood, M.A., Zaineldin, A.I., Mzengereza, K., Shadrack, R.S. and Dossou, S., 2020.** Assessing the effectiveness of CoQ10 dietary supplementation on growth performance, digestive enzymes, blood health, immune response, and oxidative-related genes expression of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology. 98: 420-428.

39. **Safari, R., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H. and Dadar, M., 2017.** The effects of dietary Myrtle (*Myrtus communis*) on skin mucus immune parameters and mRNA levels of growth, antioxidant and immune related genes in zebrafish (*Danio rerio*). Fish & Shellfish Immunology. 66: 264-269.

40. **Khosravanizadeh, A., Rahdari, A. and Moradian, S.H., 2016.** The effects of multienzyme supplement in food diet on growth, body composition and some biochemical factors of redfish blood (*Carassius auratus*). Aquatic Nutrition. s6(3): 13-24.

41. **Falahatkar, B., Poursaeid, S., Shakoorian, M. and Barton, B., 2009.** Responses to handling and confinement stressors in juvenile great sturgeon *Huso huso*. Journal of Fish Biology. 75(4): 784-796.

42. **Ackerman, J.L. and Bellwood, D.R., 2000.** Reef fish assemblages: a re-evaluation using enclosed rotenone stations. Marine Ecology Progress Series. 206: 227-237.

43. **Safari, R., Hoseinifar, S.H., Imanpour, M.R., Hajibegloo, A., Sanchouli, H., Homayouni, M. and 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.

44. **Miandare, H.K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytkönen, K.T. and Nikinmaa, M., 2013.** Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. General and Comparative Endocrinology. 182: 41-47.

45. **Safari, R., Hoseinifar, S.H., Imanpour, M.R., Mazandarani, M., Sanchouli, H. and Paolucci, M., 2020.** Effects of dietary polyphenols on mucosal and humoral immune responses, antioxidant defense and growth gene expression in beluga sturgeon (*Huso huso*). Aquaculture. 528: 735494.

46. **Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002.** Relative expression software tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research. 30(9): e36.

47. **Mussatto, S.I. and Mancilha, I.M., 2007.** Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydrate Polymers. 68(3): 587-597.

48. **Mohajer, E.M., Vahabzadeh, H., Zamini, A.A., Soudagar, M. and Ghorbani, N.R., 2010.** Effect of dietary immunogen prebiotic on growth and survival indices of giant sturgeon (*Huso huso* Linne, 1758) juveniles. New Technologies in Aquaculture Development, 4(3): 61-72.

18. **Song, S.K., Beck, B.R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H.D. and Ringø, E., 2014.** Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. Fish & Shellfish Immunology. 40(1): 40-48.

19. **Sang, H.M., Fotedar, R. and Filer, K., 2011.** Effects of dietary mannan oligosaccharide on the survival, growth, immunity and digestive enzyme activity of freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (1936). Aquaculture Nutrition. 17(2): e629-635.

20. **Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Moate, R., Davies, S.J., Spring, P., Sweetman, J. and Bradley, G., 2009.** Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Animal Science. 87(10): 3226-3234.

21. **Lam, K.L. and Cheung, P.C., 2013.** Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2(1): 45-64.

22. **Vetvicka, V., Vannucci, L. and Sima, P., 2013.** The effects of β–glucan on fish immunity. North American Journal of Medical Sciences. 5(10): 580.

23. **Reed, G. and Nagodawithana, T., 1991.** Yeast Technology. 2nd Edn. New York, NY: Van Nostrand Reinhold.

24. **Sommer, R., 1998.** Yeast extracts: production, properties and components. Food Australia: official journal of CAFTA and AIFST.

25. **Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Wildenauer, F.X., Lisdat, F., Fleischer, L.G. and Kurz, T., 2008.** Antioxidative activity of (1→ 3), (1→ 6)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. LWT-Food Science and Technology. 41(5): 868-877.

26. **Chow, H.S., Cai, Y., Hakim, I.A., Crowell, J.A., Shahi, F., Brooks, C.A., Dorr, R.T., Hara, Y. and Alberts, D.S., 2003.** Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. Clinical Cancer Research. 9(9): 3312-3319.

27. **Lu, B., Wu, X., Tie, X., Zhang, Y. and Zhang, Y., 2005.** Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. Food and Chemical Toxicology. 43(5): 783-792.

28. **Hu, C., Zhang, Y. and Kitts, D.D., 2000.** Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo Phyllostachys nigra var. Henonis leaf extract in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(8): 3170-3176.

29. **Li, P. and Gatlin III, D.M., 2004.** Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture. 231(1-4): 445-456.

30. **Li, P. and Gatlin III, D.M., 2003.** Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops*× *M. saxatilis*). Aquaculture. 219(1-4): 681-692.

31. **Glencross, B.D., Huyben, D. and Schrama, J.W., 2020.** The application of single-cell ingredients in aquaculture feeds—a review. Fishes. 16;5(3):22.

32. **Yousefi, S., Hoseinifar, S.H., Paknejad, H. and Hajimoradloo, A., 2018.** The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). Fish & Shellfish Immunology. 73: 192-196.

33. **Sönmez, A.Y., 2017.** Evaluating two different additive levels of fully autolyzed yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth performance, liver histology and fatty acid composition. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 17(2): 379-385.

34. **Adeoye, A.A., Obasa, S.O., Fawole, F.J., Wan, A.H. and Davies, S.J., 2020.** Dietary supplementation of autolysed yeast enhances growth, liver functionality and intestinal morphology in African catfish. Aquaculture Nutrition. 26(3): 772-780.

oligosaccharides. Fish & Shellfish Immunology. 34(6): 1485-1495.

64. **Chaudhuri, A. and Chattopadhyay, A., 2011.** Transbilayer organization of membrane cholesterol at low concentrations: implications in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1808(1): 19-25.

65. **Gelibolu, S., Yanar, Y., Genc, M.A. and Genc, E., 2018.** The effect of mannan-oligosaccharide (MOS) as a feed supplement on growth and some blood parameters of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 18(6): 817-823.

66. **Grayfer, L., Walsh, J.G. and Belosevic, M., 2008.** Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha. Developmental & Comparative Immunology. 32(5): 532-543.

67. **Savan, R. and Sakai, M., 2006.** Genomics of fish cytokines. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics. 1(1): 89-101.

68. **Qaidi, A., Binjateh, H.H. and Zargham, D., 1393.** The role of nutrition in increasing the efficiency of the immune system of fishes. Ornamental Aquatic Journal. 1(4): 21-28.

69. **Torrecillas, S., Rivero-Ramírez, F., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Makol, A., Suarez-Bregua, P., Fernández-Montero, A., Rotllant, J. and Montero, D., 2018.** Feeding European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles with a functional synbiotic additive (mannan oligosaccharides and *Pediococcus acidilactici*): An effective tool to reduce low fishmeal and fish oil gut health effects? Fish & Shellfish Immunology. 81: 10-20.

70. **Jami, M.J., Kenari, A.A., Paknejad, H. and Mohseni, M., 2019.** Effects of dietary b-glucan, mannan oligosaccharide, *Lactobacillus plantarum* and their combinations on growth performance, immunity and immune related gene expression of Caspian trout, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Fish & Shellfish Immunology. 91: 202-208.

71. **Khosravi-Katuli, K., Mohammadi, Y., Ranjbaran, M., Ghanaatian, H., Khazaali, A., Paknejad, H. and Santander, J., 1996.** Effects of mannan oligosaccharide and synbiotic supplementation on growth performance and immune response of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) before and after thermal stress. Aquaculture Research. 52(8): 3745-3756.

72. **Medina-Gali, R.M., del Mar Ortega-Villaizan, M., Mercado, L., Novoa, B., Coll, J. and Perez, L., 2018.** Beta-glucan enhances the response to SVCV infection in zebrafish. Developmental & Comparative Immunology. 84: 307-314.

73. **Rodríguez, I., Chamorro, R., Novoa, B. and Figueras, A., 2009.** β-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). Fish & shellfish immunology. 27(2): 369-373.

74. **Siwicki, A.I., 1993.** Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish diseases diagnosis and preventions methods.

75. **Chen, J., Dong, Z., Lei, Y., Yang, Y., Guo, Z. and Ye, J., 2022.** β-glucan mitigation on toxicological effects in monocytes/macrophages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following copper exposure. Fish & Shellfish Immunology. 121: 124-134.

76. **Yousefi, S., Monsef Shokri, M., Allaf Navirian, H. and Hoseinifar, S.H., 2020.** Effects of yeast cell membrane prebiotic (immunowall®) on growth performance and hematological parameters in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Animal environment. 12(3): 221-228.

77. **Rezaeipour, V. and Nahavandi, S., 2018.** Effects of dietary yeast cell wall powder, in combination with butyric acid supplementation, on growth performance, carcass characteristics, ileal microbial counts and serum biochemical metabolites of broiler chickens. Animal Environment. 10(1): 79-86.

49. **Taati, R., Soltani, M., Bahmani, M. and Zamini, AA., 2011.** Growth performance, carcass composition, and immunophysiological indices in juvenile great sturgeon (*Huso huso*) fed on commercial prebiotic, Immunoster. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 10(2): 324-335.

50. **Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A. and Merrifield, D.L., 2011.** The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). Aquaculture. 318(1-2): 90-94.

51. **Bivareh, M.R. and Jafarian, H., 2016.** The effect of Imax probiotic on growth performance, feeding efficiency and some biochemical factors of blood serum of common carp fingerlings. Animal Physiology and Development. 11(1): 13-27.

52. **Kubilay, A. and Uluköy, G., 2002.** The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology. 26(2): 249-254.

53. **Barton, B.A., Weirter, G.S. and Schreck, C.B., 1985.** Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 42(4): 710-417.

54. **Khodadadi, M.O., Ansari, M.A., Peyghan, R.A., Mohammadi, G. and Raissy, M., 2009.** Evaluation of some serum parameters of Benni (*Barbus sharpeyi*) Brood stocks in spawning season. Journal of Marine Science and Technology Research Year. 4(3): 37-43.

55. **Prasad, G. and Charles, S., 2010.** Haematology and leucocyte enzyme cytochemistry of a threatened yellow catfish *Horabagrus brachysoma* (Gunther 1864). Fish Physiology and Biochemistry. 36: 435-443.

56. **Shakoori, A.R., Mughal, A.L. and Iqbal, M.J., 1996.** Effects of sublethal doses of fenvalerate (a synthetic pyrethroid) administered continuously for four weeks on the blood, liver, and muscles of a freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 57: 487-494.

57. **Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D. and Davies, S.J., 2014.** Effects of dietary β-(1, 3) (1, 6) -D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 98(2): 279-289.

58. **Dobšíková, R., Blahová, J., Mikulíková, I., Modrá, H., Prášková, E., Svobodová, Z., Škorič, M., Jarkovský, J. and Siwicki, A.K., 2013.** The effect of oyster mushroom β-1.3/1.6-D-glucan and oxytetracycline antibiotic on biometrical, haematological, biochemical, and immunological indices, and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Fish & Shellfish Immunology. 35(6): 1813-1823.

59. **Ebrahimi, G.H., Ouraji, H., Khalesi, M.K., Sudagar, M., Barari, A., Zarei Dangesaraki, M. and Jani Khalili, K.H., 2012.** Effects of a prebiotic, Immunogen®, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 96(4): 591-599.

60. **Naeimi, A., Alizadeh, A., Hafarian, H. and Ahmadifar, A., 2018.** Effect of Selmanax probiotic on growth, hematological and biochemical factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Journal of Veterinary Research, 74(2): 175-185.

61. **Okumura, S., Okamoto, K., Oomori, R. and Nakazono, A., 2002.** Spawning behavior and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Aquaculture. 206(3-4):165-73.

62. **Deng, J., Kang, B., Tao, L., Rong, H. and Zhang, X., 2013.** Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. Fish & shellfish immunology. 34(1):324-31.

63. **Torrecillas, S., Makol, A., Betancor, M.B., Montero, D., Caballero, M.J., Sweetman, J. and Izquierdo, M., 2013.** Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan