Journal of Aquaculture Development
Vol. 19, No. 4, 2026, Pages: 76-92
DOI: 10.71901/jad-2025-4-877

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

The effect of different levels of the enzyme combo on the relative expression of GH and Ghrelin genes in the liver and stomach of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ghorbani Dehkordi, Sh.[1], Yeganeh, S.[1*], Ouraji, H.[1], Farhadi, A.[2]

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

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

Received: 16 August 2023 **Accepted: 7 November 2025**

Abstract

Introduction: Replacing vegetable proteins with fish meal has problems such as the quality and amount of protein in vegetable sources and is inferior to fish meal, but vegetable proteins are preferred over fish meal due to their low price and easy preparation, and their reasonable price allows grain processing. To increase the nutritional value of fish. Commercial enzymes are specifically a combination of several different enzymes that are effective on different types of food components. The objective of this research was to investigate different percentages of combo enzyme in diets containing varying amounts of soybean and its effects on the expression of ghrelin and growth genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Materials and methods: Fish with an approximate initial weight of 12.87 ± 0.51 grams were prepared and adapted to the test conditions for 2 weeks. This experiment, which included 8 treatments and 3 repetitions, and for each repetition, 16 pieces of fish were distributed in each tank. From 8 experimental diets including treatment one: replacement of 22.5 (percent) + zero (g) (S22.5) enzyme; Treatment two: replacement of 22.5 + 1 gram of enzyme (S22.5E1); Treatment 3: replacing 22.5 + 1.5 grams of enzyme (S22.5E1.5); Treatment four: replacement of 5.22 + 2 grams of enzyme (S22.5E2); Treatment five: replacement of 45 + zero enzyme (S45); Sixth treatment: replacement of 45 + 1 gram of enzyme (S45E1); Seventh treatment: replacement of 45 + 1.5 grams of enzyme (S45E1.5) and eight treatment: replacement of 45 + 2 grams of enzyme (S45E2) were used. Gene expression analyses for ghrelin and growth were conducted in the stomach and liver of rainbow trout.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

Results and Discussion: The independent effects of the multi-enzyme and soybean flour on the expression factors of growth hormone and ghrelin gene expression were significant (p<0.05), while the interaction effect of these two factors was not significant (p>0.05). The expression levels of growth hormone and ghrelin genes in the liver and stomach of rainbow trout larvae were significantly lower in the 45S treatment compared to the 22.5S treatment (p<0.05). The expression of the ghrelin gene in the liver increased with the addition of enzyme up to 2 grams per kilogram at the 22.5% soybean substitution level (p<0.05). Similarly, the expression of growth hormone in the liver increased with the addition of enzyme up to 2 grams per kilogram of the diet at the 22.5% substitution level (p<0.05). Ghrelin gene expression in the stomach also increased with the addition of enzyme up to 2 grams per kilogram at the 22.5% soybean substitution level (p<0.05), with growth hormone expression showing the same trend (p<0.05).

Conclusion: The results of the present study indicated that high levels of growth and ghrelin gene expression in the liver and stomach were achieved with the diet containing the combo enzyme complex at high fish meal levels combined with 2 grams of the combo enzyme supplement (S22.5E2 treatment). Thus, the use of 2 grams of combo multi-enzyme is recommended to enhance the replacement rate of soybean in rainbow trout diets, leading to improved activity in the examined gene expressions.

Keywords: Multi enzyme combo, Growth hormone, Ghrelin hormone, Gene expression, *Oncorhynchus mykiss*

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

* *Corresponding Author: s.yeganeh@sanru.ac.ir*

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

نشریه توسعه آبزی‌پروری، سال نوزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۴، صفحه های ۹۲-۷۶
DOI: 10.71901/jad-2025-4-877

"مقاله پژوهشی"

تأثیر سطوح مختلف آنزیم کمبو بر بیان نسبی ژن‌های GH و Ghrelin در کبد و معده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

شیوا قربانی دهکردی[۱]، سکینه یگانه[۱*]، حسین اورجی[۱]، ایوب فرهادی[۲]

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۶

چکیده

جایگزینی پروتئین‌های گیاهی با پودر ماهی مشکلاتی از قبیل کیفیت و میزان پروتئین در منابع گیاهی داشته و نسبت به پودر ماهی نامرغوب‌تر است، اما پروتئین‌های گیاهی به دلیل قیمت پایین و قابلیت تهیه آسان نسبت به پودر ماهی در اولویت است. آنزیم‌های تجاری به طور خاص ترکیبی از چندین آنزیم مختلف می‌باشد که بر روی انواع مختلف اجزا مواد غذایی مؤثر می‌باشند. هدف از انجام این تحقیق بررسی درصدهای مختلف آنزیم کمبو در جیره‌های حاوی مقادیر مختلف سویا و اثرات آن بر بیان ژن های گرلین و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بود. ماهیان با وزن اولیه تقریبی حدود ۰/۵۱ ± ۱۲/۸۷ گرم تهیه و به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایش سازگار شدند. این آزمایش که شامل ۸ تیمار و ۳ تکرار بود و برای هر تکرار ۱۶ قطعه ماهی در هر مخزن توزیع شد. از ۸ جیره آزمایشی شامل تیمار یک: جایگزینی ۲۲/۵ (درصد) + صفر (گرم) (22.5S) آنزیم؛ تیمار دو: جایگزینی ۲۲/۵+۱ گرم آنزیم (22.5S1E)؛ تیمار ۳: جایگزینی ۲۲/۵+۱/۵ گرم آنزیم (22.5S1.5E)؛ تیمار چهار: جایگزینی ۲۲/۵+۲ گرم آنزیم (22.5S2E)؛ تیمار پنج: جایگزینی ۴۵+صفر آنزیم (45S)؛ تیمار شش: جایگزینی ۴۵+۱ گرم آنزیم (45S1E)؛ تیمار هفت: جایگزینی ۴۵+۱/۵ گرم آنزیم (45S1.5E) و تیمار هشت: جایگزینی ۴۵+۲ گرم آنزیم (45S2E) مولتی استفاده شد. بیان ژن‌های گرلین و رشد در معده و کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین-کمان انجام شد. اثر مستقل مولتی‌آنزیم و آرد سویا بر فاکتورهای بیان ژن هورمون رشد و بیان ژن هورمون گرلین اثر معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$) ولی اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری را نشان نداند ($p>۰/۰۵$). مقادیر بیان ژن هورمون رشد و گرلین در کبد و معده لارو ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان در تیمار S45 نسبت به تیمار S22.5 به طور معنی‌داری کمتر بود ($p<۰/۰۵$). بیان ژن گرلین در کبد با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). بیان ژن هورمون رشد در کبد با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم جیره در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). بیان ژن گرلین در معده با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)، همچنین بیان ژن هورمون رشد در معده با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم جیره در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عملکرد بالای بیان ژن‌های رشد و گرلین در کبد و معده در جیره حاوی کمپلکس آنزیم کمبو در سطوح بالای پودر ماهی همراه با ۲ گرم مکمل آنزیم کمبو (تیمارS22.5E2) بدست آمد. بنابراین استفاده از مولتی‌آنزیم کمبو به میزان ۲ گرم جهت افزایش درصد جایگزینی سویا در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که منجر به بهبود فعالیت بیان ژن‌های مورد بررسی گردید، پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: مولتی‌آنزیم کمبو، هورمون رشد، هورمون گرلین، بیان ژن، *Oncorhynchus mykiss*

* عهده‌دار مکاتبات: skyeganeh@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

مقدمه

تقاضای رو به رشد برای مصرف ماهی و کاهش ذخایر طبیعی، منجر به رشد صنعت آبزی‌پروری در سطح جهانی شده است. دلیل این امر، کیفیت بالای پروتئین، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب مفید در ماهی‌ها می‌باشد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دلیل مرغوبیت گوشت و تقاضای بازار، به‌عنوان یکی از گونه‌های با ارزش در بخش آبزی‌پروری شناخته می‌شود (Palmegiano *et al.,* 2006; Fatahi *et al*., 2025).

برای رسیدن به موفقیت و پایداری در صنعت آبزی‌پروری، لازم است هزینه‌های پرورش بهینه‌سازی شوند. به‌طوری که هزینه خوراک بین ۵۰ تا ۶۰ درصد کل هزینه‌ها را شامل می‌شود و پودر ماهی به‌عنوان گران‌ترین ماده اولیه در جیره‌های غذایی ماهی شناخته می‌شود (Palmegiano *et al.,* 2006). آبزی‌پروری متراکم برای رشد ماهیان در تمام مراحل زندگی نیازمند تغذیه مؤثر و اقتصادی است. بنابراین، توسعه و طراحی خوراک ماهی که شامل تمامی مواد مغذی ضروری برای رشد، بقای بهینه و تولید مثل باشد، الزامی است (Sampath *et al.,* 2020).

در بسیاری از فرمولاسیون‌های خوراک ماهی، پروتئین‌ها و چربی‌ها از منابع گیاهی یا حیوانی (معمولاً به عنوان محصولات جانبی صنایع غذایی) به‌جای پودر ماهی و روغن ماهی به کار می‌روند. با اینکه برخی از خوراک‌های تجاری از مواد جایگزین با منبع غیر دریایی استفاده می‌کنند و ویژگی‌های تغذیه‌ای مناسبی دارند، اما نمی‌توانند ارزش غذایی ویژه‌ای که جیره‌های حاوی پودر ماهی و روغن ماهی ارائه می‌دهند، به‌طور کامل تأمین کنند. لذا، بهینه‌سازی در دسترسی و ارزش غذایی مواد خام جایگزین از طریق فناوری مهندسی زیستی و به‌ویژه فناوری آنزیمی حائز اهمیت است (Sampath *et al.,* 2020).

یکی از رویکردهای مؤثر برای کاهش هزینه غذا، افزایش سهم پروتئین‌های گیاهی در جیره‌های غذایی است. پودر ماهی به‌عنوان یک منبع پروتئینی کلیدی در تغذیه آبزیان، به ویژه در گونه‌های گوشتخوار، شناخته می‌شود و شامل منابع باکیفیت مواد مغذی ضروری از قبیل آمینواسیدهای ضروری، اسیدهای چرب آزاد ضروری، ویتامین‌ها، مواد معدنی و فاکتورهای رشد ناشناخته است (Hardy *et al.,* 2002). به‌دنبال افزایش تقاضا، ناپایداری منابع و افزایش هزینه پودر ماهی، تحقیق در جهت یافتن منابع پروتئینی جایگزین به شدت ضروری است.

با این‌حال، جایگزینی پودر ماهی با پروتئین‌های گیاهی، چالش‌هایی از جمله کیفیت پروتئین پایین را به همراه دارد و به‌طور کلی پروتئین‌های گیاهی از نظر کیفیت پایین‌تر از پودر ماهی به شمار می‌روند. با این وجود، پروتئین‌های گیاهی به دلیل هزینه کمتر و ساده‌تر بودن تأمین نسبت به پودر ماهی، دارای مزیت‌های قابل توجهی هستند. قیمت مناسب این پروتئین‌ها امکان استفاده از غلات را فراهم می‌آورد تا ارزش غذایی خوراک‌های ماهی افزایش یابد (Willora *et al.,* 2022; Najafi *et al*., 2024).

عوامل ضد تغذیه‌ای موجود در سویا، علاوه بر تأثیر مستقیم بر کاهش هضم‌پذیری پروتئین این ماده، می‌توانند باعث التهاب در دستگاه گوارش، به‌ویژه در روده شوند که این امر منجر به اختلال در فرآیند

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

گوارش و کاهش رشد می‌گردد. مواد موجود در سویا مانند آرابینوزایلان که از پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای هستند، هضم نشاسته را مختل می‌سازند. اما استفاده از آنزیم زایلاناز می‌تواند این مواد را تجزیه کرده و هضم نشاسته در سویا را بهبود بخشد. با این حال، بخش نشاسته‌ای کنجاله سویا ترکیب یکنواختی ندارد و ممکن است مقداری از آن نیز غیرقابل هضم باشد (Cavrois-Rogacki *et al*., 2022).

آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیزورهای آلی عمل می‌کنند و می‌توانند باعث شروع یا تسریع واکنش‌های شیمیایی شوند و ترکیبات آلی مختلفی را به محصولات جدید تبدیل کنند، در غیر این صورت، این واکنش‌ها با سرعت کافی پیش نمی‌روند (Ghobadi *et al*., 2009). تمامی آنزیم‌های گوارشی در گروه هیدرولازها قرار می‌گیرند. از سال ۱۹۲۰، محققان تأثیرات مثبت آنزیم‌ها بر خوراک پرندگان، به‌ویژه در خوراک‌هایی که حاوی دانه‌های غلات و مقدار زیادی فیبر هستند، را مشاهده کرده‌اند (Liang *et al*., 2022).

مکمل‌های آنزیمی، که به‌عنوان افزودنی‌های مهم در جیره‌های غذایی دام، طیور و آبزیان شناخته می‌شوند، با هدف بهبود قابلیت هضم، افزایش رشد و بهره‌وری اقتصادی تولید، مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مکمل‌ها به‌طور معمول به جیره‌ها اضافه می‌شوند تا بهره‌وری از مواد مغذی را افزایش داده و به بهبود راندمان هضم و جذب کمک کنند. استفاده از این مکمل‌ها می‌تواند منجر به بهره‌برداری بهتر از مواد اولیه ارزان‌تر با فرآوری کمتر و بهبود عملکرد رشد و ترکیب لاشه نسبت به منابع گران‌تر غذایی شود (García Martínez *et al*., 2024).

آنزیم‌های تجاری معمولاً ترکیبی از چندین آنزیم مختلف هستند که بر بخش‌های مختلف مواد غذایی تأثیر می‌گذارند. از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به زایلاناز، آرابینوکسیلاناز، بتا-گلوکاناز، سلولاز، فیتاز و پروتئاز اشاره کرد. یکی از چالش‌های جدی در استفاده از مواد گیاهی، وجود پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای است. به‌ویژه، ماهی‌ها و دیگر حیوانات تک‌معده‌ای آنزیم‌هایی نظیر سلولاز، بتاگلوکاناز و بتا زایلاناز ندارند که بر هضم پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای مؤثر باشند (Maas *et al.,* 2020).

مولتی‌آنزیم کمبو، با عملکرد چندگانه، شامل ۹ نوع آنزیم متنوع از جمله سلولاز، آمیلاز، پروتئاز قارچی، پروتئاز خنثی، پروتئاز قلیایی، زایلاناز، بتاگلوکاناز، همی‌سلولاز و لیپاز است. با توجه به ترکیب مولتی‌آنزیم کمبو، فرض بر این است که می‌توان از آن در جیره غذایی آبزیان، به‌ویژه در نوع گوشتخوار مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان، استفاده کرد تا قابلیت هضم جیره‌های غذایی حاوی آرد سویا افزایش یابد (Mortazavi Tabrizi *et al.,* 2012).

هورمون گرلین، که به عنوان هورمون گرسنگی شناخته می‌شود، نقش‌های مهمی در تنظیم اشتها و متابولیسم دارد. در قزل‌آلای رنگین‌کمان تحقیقات نشان داده‌اند که ژن‌های مرتبط با گرلین ممکن است در تنظیم نیازمندی‌های غذایی و رشد این ماهی‌ها نقش داشته باشند. از جمله این نقش‌ها می‌توان به اینکه گرلین با تحریک اشتها و افزایش مصرف غذای ماهی‌ها در ارتباط است. این هورمون همچنین می‌تواند بر روی متابولیسم چربی تأثیر بگذارد و به ذخیره‌سازی منابع انرژی کمک کند (Jönsson, 2013). سطوح مختلف گرلین ممکن است به طور مستقیم بر روی رشد قزل‌آلا

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

تأثیر بگذارد. این هورمون می‌تواند تأثیرات مثبتی بر روی فرایندهای رشد مانند سنتز پروتئین داشته باشد. تحقیقات نشان می‌دهند که گرلین می‌تواند در پاسخ به شرایط استرس‌زا در محیط آبی و تغییرات محیطی واکنش‌های فیزیولوژیکی قزل‌آلای رنگین‌کمان را تحت تأثیر قرار دهد (Jönsson, 2013).

تأثیر سطوح مختلف آنزیم کمبو در جیره‌های حاوی مقادیر مختلف سویا بر بیان نسبی ژن‌های GH (هورمون رشد) و Ghrelin در کبد و معده بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و با توجه به نقش کلیدی این دو ژن در فرآیندهای متابولیکی و رشد ماهی، این تأثیر می‌تواند به بهبود هضم و جذب مواد مغذی در بچه ماهی‌ها کمک کند، بازدهی جیره را بهبود بخشد و به تبع آن، بر بیان ژن‌های مربوط به رشد تأثیر بگذارد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آبان ماه سال ۱۴۰۲ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفت. ماهیان با وزن اولیه تقریبی حدود ۰/۵۱ ± ۱۲/۸۷ گرم خریداری‌شده و به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایش سازگار شدند. این آزمایش که شامل ۸ تیمار و ۳ تکرار بود و برای هر تکرار، ۱۶ قطعه ماهی در هر مخزن توزیع شد. ۸ جیره آزمایشی که حاوی سطوح مختلف کنجاله سویا و آنزیم کمبو بود، تنظیم شد که شامل جیره با درصد متداول کنجاله سویا: ۲۲/۵ درصد و جیره حاوی ۴۵ درصد جایگزینی آرد ماهی با کنجاله سویا بود و سپس جیره‌های مختلف با مقادیر صفر، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم آنزیم کمبو در کیلوگرم در جیره (بازرگانپور و همکاران، ۱۳۹۶) تهیه شدند، به طوری که تیمارهای آزمایش به صورت زیر در نظر گرفته شدند:

تیمار ۱: جیره ۲۲/۵ درصد کنجاله سویا + صفر آنزیم کمبو (22.5S)

تیمار ۲: جیره ۲۲/۵ درصد کنجاله سویا + ۱ گرم در کیلوگرم در جیره آنزیم کمبو (22.5S1E)

تیمار ۳: جیره ۲۲/۵ درصد کنجاله سویا + ۱/۵ گرم در کیلوگرم در جیره آنزیم کمبو (22.5S1.5E)

تیمار ۴: جیره ۲۲/۵ درصد کنجاله سویا + ۲ گرم در کیلوگرم در جیره آنزیم کمبو (22.5S2E)

تیمار ۵: جیره ۴۵ درصد کنجاله سویا + صفر آنزیم کمبو (45S)

تیمار ۶: جیره ۴۵ درصد کنجاله سویا + ۱ گرم در کیلوگرم در جیره آنزیم کمبو (45S1E)

تیمار ۷: جیره ۴۵ درصد کنجاله سویا + ۱/۵ گرم در کیلوگرم در جیره آنزیم کمبو (45S1.5E)

تیمار ۸: جیره ۴۵ درصد کنجاله سویا + ۲ گرم در کیلوگرم در جیره آنزیم کمبو (45S2E)

جیره‌های آزمایشی با میزان پروتئین و انرژی یکسان (شامل ۸ تیمار) دارای دو سطح ۲۲/۵ و ۴۵ درصد کنجاله سویا تهیه شدند (نرم افزار PWUFFDA) (جدول ۱). به منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، ابتدا مواد اولیه خشک شامل پودر ماهی، پودر سویا و آرد گندم و... کاملاً با هم مخلوط شده و بعد روغن به آن‌ها اضافه شد. سپس آب تا مقداری که مخلوط حالت خمیری به خود بگیرد، اضافه گشت. خمیر حاصل از یک چرخ گوشت با قطر صفحه ۳ میلی‌متر عبور داده شد که به صورت رشته‌ای در آمده، پلت‌های خارج‌شده از چرخ گوشت روی پلاستیک گسترده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از فن کاملاً خشک شدند (مقدار رطوبت جیره ۹ درصد). در طول مدت خشک‌شدن، غذاهای پلت‌شده مرتب به هم‌زده شدند تا به صورت یکنواخت مخلوط شوند. پس از خشک‌شدن، جیره‌های غذایی در کیسه‌های پلاستیکی ضخیم

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

بسته‌بندی و شماره‌گذاری شده و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱: جیره‌های آزمایشی فرموله شده برای تغذیه لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 1: Experimental diets formulated for feeding rainbow trout larvae

Diet components	Soybean 22.5%	Soybean 44.5%
Fish powder	36%	
Soybean meal	22.5%	
Corn gluten	12%	
Wheat flour	18%	
Fish oil	4.25%	
Soybean oil	4.25%	
Vitamin supplement	1.5%	
Mineral supplement	1.5%	
Protein	42.65±0.5%	41.26±0.42%
Fat	30.92±0.13%	31.29±0.67%
Ash	10.99±0.15%	9.76±0.84%
Carbohydrates	15.35±0.26%	17.49±0.49%

مولتی‌آنزیم کمبو به عنوان مکمل آزمایشی از شرکت زوبین زرین تهیه شد و به منظور مخلوط‌کردن جیره با مکمل، مولتی‌آنزیم کمبو با آب مخلوط شد و بر روی خوراک به طور دستی اسپری و سپس با استفاده از روغن آفتابگردان پوشش‌دار شد تا گرمای حاصل از پلت‌زنی جیره‌ها باعث خراب‌شدن آنزیم نشود. لازم به ذکر است که جهت یکنواخت‌شدن آزمایش، به تیمار شاهد نیز روغن آفتاب‌گردان به ازای هر کیلوگرم جیره بدون مکمل مولتی‌آنزیم اضافه گردید (Mortazavi Tabrizi *et al.*, 2012).

اجزای ترکیب مولتی‌آنزیم کمبو شامل لیپاز (Flp units/kg75.000)، سلولاز (Cu units/kg75.000)، بتاگلوکوناز (BG units/kg20.000)، همی‌سلولاز (Hcu units/kg20.000)، آمیلاز قارچی (SKB units/kg30.000)، آلکالین پروتئاز (Anson units/kg1.2)، پروتئاز قارچی (Hut units/kg1.000.000) و پروتئاز طبیعی (PC units/kg100.000) می‌باشد (Bedford and Classen, 1992). این پژوهش به مدت ۸ هفته ادامه یافت. خوراک‌دهی در ۳ وعده (ساعات ۸، ۱۳ و ۱۸) (Mortazavi Tabrizi *et al.*, 2012) و در حد سیری ظاهری انجام گرفت. به منظور خارج‌کردن فضولات و پسماندهای غذایی روزانه عمل سیفون‌کردن وان‌های پرورشی انجام شد.

اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌های GH و Ghrelin

نمونه‌برداری و استخراج RNA

به منظور بررسی بیان ژن‌های (آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) مرتبط با رشد (GH) و اشتها (گرلین) در شرایط استریل از هر

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

تانک تعداد ۲ قطعه ماهی (هر تیمار ۶ ماهی) به طور تصادفی صید و جهت بیهوش‌کردن در عصاره گل میخک (۳۰۰ میلی‌گرم درلیتر) قرارگرفتند (Mohammadi and Khara, 2015)، سپس بافت کبد و معده ، جمع‌آوری و داخل تیوپ‌های از قبل استریل‌شده قرار گرفت و بلافاصله به تانک ازت انتقال یافتند. تیوپ‌ها تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA توسط ماده هضم‌کننده بایوزول انجام شد. نمونه‌ها در داخل هاون چینی و در مجاورت ازت مایع کاملاً کوبیده شدند تا دیواره سلول‌ها شکسته شود (این فرآیند بایستی خیلی سریع باشد تا از ذوب‌شدن بافت‌ها جلوگیری شود). مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کوبیده‌شده به تیوپ‌های استریل‌شده منتقل شدند و به مقدار ۱ میلی‌لیتر بایوزول به آن‌ها اضافه شد. تیوپ‌ها به مدت ۱۵ ثانیه و در دمای اتاق ورتکس شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه نگهداشته شدند. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به تیوپ‌ها اضافه شد و نمونه‌ها روی یخ نگهداری شدند. تیوپ‌ها با دور ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریوفیوژ شدند. محلول رویی تیوپ‌ها نگهداشته شد و به تیوپ‌های استریل جدید منتقل شدند. به اندازه حجم محلول در تیوپ‌های جدید محلول ایزوپروپانول سرد که به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداشته شده بودند، اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفیوژ شدند. سپس تیوپ ها روی یخ گذاشته شدند و محلول بالایی دور ریخته شد و مقدار ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد جهت شسته‌شدن پلت RNA به کف تیوپ‌ها اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله، RNA به صورت پلت سفید رنگ متمایل به کرم در ته تیوپ‌ها دیده شد و اتانول تیوپ‌ها دور ریخته شد. پلت‌های RNA در زیر هود کاملاً خشک شدند. به هر تیوپ مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دپس اضافه شد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و تا زمان استفاده جهت تعیین کمیت و کیفیت RNA و سنتز cDNA در فریزر نگهداری شدند (Awad *et al.*, 2015).

ارزیابی کمی و کیفی RNA استخراج شده

RNA استخراج‌شده به دو روش کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفت که جهت ارزیابی کیفی از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ و جهت ارزیابی کمی از دستگاه بایوفتومتر استفاده شد (Safari *et al.*, 2016).

سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از مستر میکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصوص کشور کره و مطابق با دستورالعمل انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر RNA که قبلاً آماده شده بود به همراه یک میکرولیتر آغازگر الیگو به تیوپ‌های جدید اضافه شد و با آب خالص (عاری از نوکلئاز) به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید. سپس روی بلوک حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انکوباسیون شد و به روی یخ منتقل شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر مستر حاوی آنزیم ریورس ترانس-

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

کریپتناز به آن اضافه شد. نهایتاً در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون شدند و سپس محلول حاوی cDNA به حجم ۲۰ میکرولیتر به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (Safari *et al.*, 2016).

Real Time PCR

برای هر تیمار از ۴ تکرار استفاده شد. از ۱۰ میلی‌لیتر بافر سایبرگرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش رونده و ۱ میکرولیتر آغازگر پس رونده برای ژن‌های هدف و رفرنس، ۲/۸ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ‌پلی‌مراز و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق شده صورت گرفت (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر). به منظور اطمینان از شرایط بهینه‌بودن شرایط Real Time PCR، غلظت‌های مختلف (۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای مختلف تهیه شد و با دو آغازگر هدف و رفرنس در ۴ تکرار تکثیر شدند (Ramakers *et al.*, 2003).

جدول ۲: توالی آغازگرهای استفاده شده

Table 2: Sequence of primers used

Primer name	Primer specifications	Primer efficiency	Junction temperature (°C)
B-actin	F: GCCGCGACCTCACAGACTACC R: CAAAGTCCAGCGCCACGTAGCA	98%	60
GH	F: GTACCCTAGCCAGACCCTGATC R: TCTTGAAGCAAGCCAACAACTC	98%	60
Ghrelin	F: CTTRGCCCGCAGYGGGAAGC R: CACCACCACCAACTTCTACAT	98%	60

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف از نظر نرمال‌بودن بررسی شدند. اثرهای متقابل تغذیه آنزیم (در ۴ سطح) و سویا (در ۲ سطح) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با آزمایش فاکتوریل ۴ × ۲ (۸ تیمار) با کمک آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) انجام گرفت. بیان کمی ژن‌های رشد و گرلین با استفاده از فرمول $^{-\Delta\Delta ct}$ ۲ توسط نرم‌افزار اکسل انجام شد (Livak and Schmittgen, 2001). از آزمون دانکن (Duncan) در سطح ۵ درصد برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد (p<۰/۰۵). نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel (نسخه ۲۰۱۳) رسم شدند.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

نتایج

اثر مستقل مولتی‌آنزیم و آرد سویا بر فاکتورهای بیان ژن هورمون رشد و بیان ژن هورمون گرلین اثر معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵) ولی اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری را نشان نداند (p>۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۳: آنالیز واریانس دوطرفه حاصل از تأثیر متقابل آرد سویا و آنزیم بر شاخصه بیان ژن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 3: Two-way analysis of variance from the interaction effect of soybean flour and enzyme on gene expression parameters in rainbow trout

Factors	Soybean meal	Enzyme	Soybean meal × enzyme interaction
Ghrelin hormone gene expression	**P<0.006	*P>0.008	P>0.862*
Growth hormone gene expression	*P<0.007	*P>0.007	*P>0.345

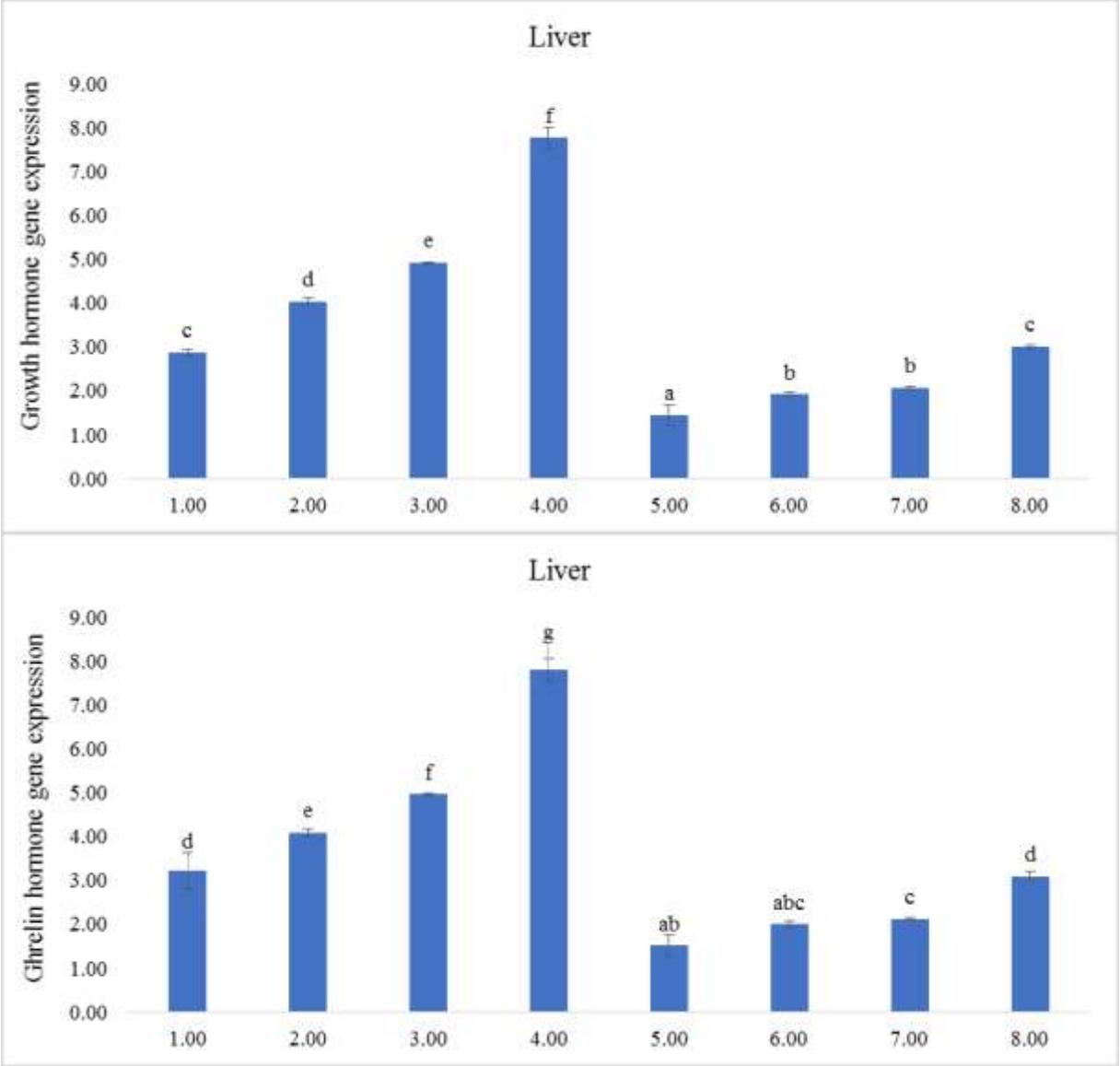
**p<۰/۰۵ (معنی‌دار) و* p>۰/۰۵ (عدم معنی‌دار).

بیان ژن

مقادیر بیان ژن هورمون رشد و گرلین در کبد لارو ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان در تیمار S45 نسبت به تیمار S22.5 به طور معنی‌داری کمتر بود (p<۰/۰۵). بیان ژن گرلین با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت (p<۰/۰۵)، در سطح ۴۵ درصد جایگزینی، افزودن ۱/۵ و ۲ گرم آنزیم در کیلوگرم نسبت به تیمار ۴۵ درصد بدون آنزیم افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). بیان ژن هورمون رشد با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم جیره در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت (p<۰/۰۵)، در سطح ۴۵ درصد جایگزینی، افزودن ۱، ۱/۵ و ۲ گرم آنزیم در کیلوگرم نسبت به تیمار ۴۵ درصد بدون آنزیم افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). اما بین تیمارهای حاوی ۱ و ۱/۵ گرم آنزیم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نداشت (p<۰/۰۵). در تمامی سطوح آنزیم، میزان بیان این دو ژن در سطح ۲۲/۵ درصد بیشتر از ۴۵ درصد سویا بود (p<۰/۰۵)، اما افزودن ۲ گرم آنزیم در کیلوگرم در تیمار حاوی ۴۵ درصد سویا توانست بیان این دو ژن را به میزان برابر در تیمار حاوی ۲۲/۵ درصد سویا بدون آنزیم بهبود بخشد (p>۰/۰۵) (شکل ۱).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]



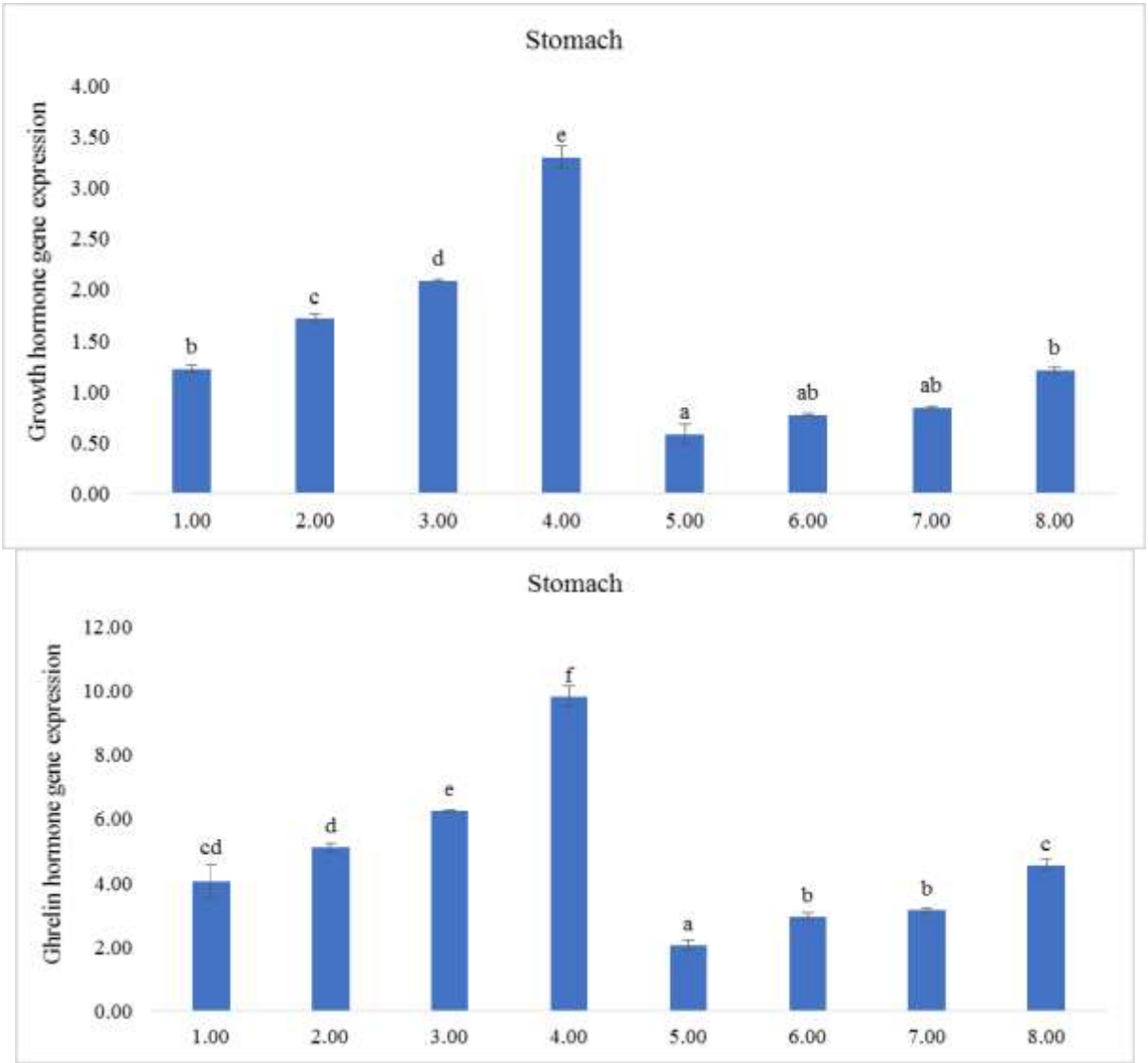
شکل ۱: میانگین (±SD) بیان ژن هورمون رشد و گرلین کبد در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف آرد سویا و مولتی‌آنزیم در انتهای دوره آزمایش. حروف مشابه عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند (p>۰/۰۵).

Figure 1: Average (SD±) expression of growth hormone and liver ghrelin genes in rainbow trout larvae fed with different levels of soybean meal and multienzyme at the end of the experimental period. Similar letters indicate non-significance (p<0.05). Treatment 1: S22.5; Treatment 2: S22.5E1; Treatment 3: S22.5E1.5; Treatment 4; S22.5E2; Treatment 5: S45; Treatment 6: S45E1; Treatment 7: S45E1.5; Treatment 8: S45E2. S: Soy percentage; E: Grams of enzyme.

مقادیر بیان ژن هورمون رشد و گرلین در معده لارو ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان در تیمار S45 نسبت به تیمار S22.5 به طور معنی‌داری کمتر بود (p<۰/۰۵). بیان ژن گرلین با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت (p<۰/۰۵)، در سطح ۴۵ درصد جایگزینی، افزودن ۱/۵ و ۲ گرم آنزیم در کیلوگرم نسبت به تیمار ۴۵ درصد بدون آنزیم افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). بیان ژن هورمون رشد با افزودن آنزیم تا ۲ گرم در کیلوگرم جیره در سطح جایگزینی ۲۲/۵ سویا افزایش یافت (p<۰/۰۵)، در سطح ۴۵ درصد جایگزینی، افزودن ۲ گرم آنزیم در کیلوگرم نسبت به تیمار ۴۵ درصد بدون

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

آنزیم افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵)، اما بین تیمار بدون آنزیم و تیمارهای حاوی ۱ و ۱/۵ گرم آنزیم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نداشت (p<۰/۰۵). در تمامی سطوح آنزیم، میزان بیان این دو ژن در سطح ۲۲/۵ درصد بیشتر از ۴۵ درصد سویا بود (p<۰/۰۵)، اما افزودن ۲ گرم آنزیم در کیلوگرم در تیمار حاوی ۴۵ درصد سویا توانست بیان این دو ژن را به میزان برابر در تیمار حاوی ۲۲/۵ درصد سویا بدون آنزیم بهبود بخشد (p>۰/۰۵) (شکل۳-۴).



شکل ۲: میانگین (±SD) بیان ژن هورمون رشد و گرلین معده در لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با سطوح مختلف آرد سویا و مولتی‌آنزیم در انتهای دوره آزمایش. حروف مشابه عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند (p>۰/۰۵). تیمار یک: S22.5؛ تیمار دو: S22.5E1؛ تیمار سه: S22.5E1.5؛ تیمار چهار: S22.5E2؛ تیمار پنج: S45؛ تیمار شش: S45E1؛ تیمار هفت: S45E1.5؛ تیمار هشت: S45E2. S: درصد سویا؛ E: گرم آنزیم.

Figure 1: Average (SD±) expression of growth hormone and stomach ghrelin genes in rainbow trout larvae fed with different levels of soybean meal and multienzyme at the end of the experimental period. Similar letters indicate non-significance (p<0.05). Treatment 1: S22.5; Treatment 2: S22.5E1; Treatment 3: S22.5E1.5; Treatment 4; S22.5E2; Treatment 5: S45; Treatment 6: S45E1; Treatment 7: S45E1.5; Treatment 8: S45E2. S: Soy percentage; E: Grams of enzyme.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

بحث

جیره آبزیان بیشترین هزینه در آبزی‌پروری را داراست و بنابراین استفاده کارآمد از خوراک برای صنعت آبزی‌پروری از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار است. برای دستیابی به استفاده مؤثر از خوراک، درک مکانیسم کنترل مصرف خوراک ضروری است. در مغز ماهیان چندین مرکز تغذیه وجود دارد که تغذیه را تنظیم می‌کند و سیگنال‌هایی را از مغز و محیط دریافت می‌کند. سیگنال‌های محیطی متابولیک و عصبی بر مراکز تغذیه تأثیر می‌گذارند و اطلاعاتی در مورد وضعیت تغذیه و مصرف وعده‌های غذایی ارائه می‌دهند (Sobrino *et al.,* 2014). ناحیه هیپوتالاموس مغز، هورمون‌های عصبی ترشح می‌کند که تعادل انرژی را یا از طریق عامل محرک (اورکسیژنیک) یا بازدارنده (بی‌اشتهایی) تنظیم می‌کنند. در ماهیان، نوروپپتیدهای همولوگ دو نوع هستند، مولکول های سیگنال‌دهی اورکسیوژنیک مانند، گرلین، گالانین، نوروپپتید Y، بتااندورفین و مولکول‌های سیگنال بی‌اشتهایی، لپتین، بمبسین، کوله سیستوکینین، کوکائین و سرم اسکریپتامین و آمفتامینوت تنظیم‌کننده عوامل غدد درون‌ریز (هورمون‌های گوارشی) و مواد شیمیایی محیطی (گلوکز) تأثیر مستقیمی بر مراکز تغذیه ای ماهیان دارند (Volkoff, 2016).

گرلین در درجه اول توسط سلول‌های غدد درون‌ریز معده که در چین‌های مخاطی معده یافت می‌شود، تولید می‌گردد (Jonsson and Holmgren, 2012). mRNA گرلین بیشتر در معده و روده بیان می‌شود و همچنین در اندام‌های دیگر مانند مغز، هیپوفیز، قلب، ریه، پانکراس، کلیه و کبد در سطح کمتری بیان می‌شود (Kojima *et al.,* 1999; Mori *et al.,* 2000). گرلین به عنوان یک هورمون چند عملکردی در نظر گرفته می‌شود که در تنظیم هموستاز انرژی و دریافت غذا در پستانداران و همچنین در مهره‌داران غیر پستانداران نقش دارد (Kaiya *et al.* 2008). گرلین پلاسما در هنگام گرسنگی بیشتر وجود دارد و پس از مصرف غذا کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد گرلین مصرف غذا و ساخت چربی را در ماهی تیلاپیا و ماهی قرمز افزایش می‌دهد، در حالی که در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مصرف غذا را مهار می‌کند (Jonsson and Holmgren, 2012). در مطالعه حاضر بیان ژن هورمون گرلین در معده نسبت به کبد بیشتر بود. همچنین کاهش پودر ماهی و افزودن ۲ گرم در کیلوگرم جیره آنزیم کمبو در جیره لار ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان توانست بیان ژن هورمون گرلین و هورمون رشد را در معده به میزان تیمار شاهد افزایش دهد و مصرف خوراک را بهبود بخشد. استفاده از مولتی‌آنزیم کمبو سبب افزایش بیان ژن رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شد همانطور که Safari و همکاران (۲۰۲۲) گزارش دادند که استفاده از آپوزیم سبب بهبود بیان ژن رشد در فیل-ماهی شد.

گرلین به عنوان یک لیگاند درون‌زا برای گیرنده ترشح‌کننده هورمون رشد (GHSR) عمل می‌کند. در پستانداران و همچنین ماهیان، ترشح هورمون رشد (GHS) با فعالیت بر روی GHSR، ترشح هورمون رشد را تحریک می‌کند (Matsuda *et al.,* 2006). بافت-هایی مانند هیپوتالاموس، دستگاه گوارش، کبد، نواحی حسی سیستم عصبی مرکزی و هیپوفیز که در متابولیسم، هضم، تعادل انرژی و ترشح هورمون رشد مهم هستند، دارای GHSR دارند. سطوح بالای بیان mRNA ژن GHSR که در هیپوفیز مهره‌داران شناسایی شده است،

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

ساخت هورمون رشد را تنظیم می‌کند (Kojima *et al.*, 1999). همچنین در مطالعه حاضر افزایش هورمون گرلین با افزایش هورمون رشد همراه بود و احتمالا افزایش بیان ژن هورمون گرلین سبب افزایش غذاگیری در ماهی می‌شود که با نتایج Ebrahimnezhadarabi و همکاران (۲۰۲۵) همخوانی داشت.

همانطور که در ماهی قرمز گزارش شده است، گرلین تولیدشده در بافت‌های محیطی منجر به افزایش دریافت غذا از طریق عصب واگ آوران می‌شود (Matsuda *et al.*, 2006). عمل اساسی گرلین افزایش مصرف غذا از طریق تحریک نوروپپتید Y و نورون‌های اورکسیوژنیک در ماهی قرمز است (Miura *et al.*, 2011). گرلین به GHSR متصل می‌شود و ترشح هورمون‌های رشد را در موش‌ها تحریک می‌کند (Kojima *et al.*, 1999). در ماهیان، چندین عامل برای تحریک ترشح هورمون رشد مانند هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH)، فاکتور آزاد کننده هورمون رشد (GRF)، پلی پپتید فعال‌کننده سیکلاز آدنیلات هیپوفیز (PACAP) و دوپامین در نظر گرفته شده است (Peng and Peter, 1997; Sherwood *et al.*, 2000). در مطالعه حاضر، بیان ژن هورمون رشد در کبد نسبت به معده بالاتر بود، درصورتیکه افزایش آرد سویا تا ۴۵ درصد همراه با ۲ گرم در کیلوگرم آنزیم کمبو توانست مقدار برابری از بیان ژن هورمون رشد و گرلین را در تیمار شاهد را نشان دهد و بهبود عملکرد رشد و مصرف جیره را در زمان استفاده بالاتر از آرد سویا همراه با آنزیم کمبو بدست دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عملکرد بالای بیان ژن‌های رشد و گرلین در کبد و معده در جیره حاوی کمپلکس آنزیم کمبو در سطوح بالای پودر ماهی همراه با ۲ گرم مکمل آنزیم کمبو (تیمارS22.5E2) بدست آمد. بنابراین استفاده از مولتی‌آنزیم کمبو به میزان ۲ گرم جهت افزایش درصد جایگزینی سویا در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که منجر به بهبود فعالیت بیان ژن های مورد بررسی گردید، پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی معاونت محترم علمی و فناوری ریاست جمهوری، استانداری مازندران و مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور با شماره مصوب ۹۴۰۰۸۵-۹۴۰۰۴-۹۴۰۱-۰۲۵-۱۲-۱۲-۰۱۴۸ انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می دانند از کلیه کسانی که در مراحل مختلف اجرای پروژه با آنها همکاری داشته اند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Awad, A., El-Matbouli, M. and Müller, W.E.G., 2015. RNA extraction procedures: a review of technical aspects and protocols for assessing the quality and quantity of RNA. *Molecular Biology Reports, 42*(1), pp.155-166.
2. Bedford, M.R. and Classen, H.L., 1992. Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks, *The Journal of Nutrition*,

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

marine aquaculture, *12*(1), pp.311-325. DOI: 10.1079/9780851996042.0000

9. Jönsson, E., 2013. The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *18*(7), pp.79-85. DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.03.013
10. Jonsson, E. and Holmgren, S., 2012. The endocrine system of the gut. In: Farrell, A.P. (Ed.), Encyclopedia of Fish Physiology: From Gene to Environment. Elsevier, pp.1341-1347.
11. Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R.E. and Unniappan, S., 2008. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. and Physi. Part A: Molecular and Integrative Physiology*, *149*(2), pp.109-128. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.12.004
12. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, *402*(67), pp.656-660. DOI: 10.1038/45230
13. Liang, Q., Yuan, M., Xu, L., Lio, E., Zhang, F., Mou, H. and Secundo, F., 2022. Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. *Marine Life Science and Technology*, *2*(4), pp.208-221. DOI:10.1007/s42995-022-00128-z
14. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(1), pp.402-408. DOI: 10.1006/meth.2001
15. Maas, R.M., Verdegem, M.C.J., Stevens, T.L. and Schrama, G.W., 2020. Effect of exogenous enzymes (phytase and xylanase) supplementation on nutrient digestibility and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed different quality diets. *Aquaculture*, *52*(9), pp.735-723. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735723
16. Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S.I., Uchiyama, M., Kangawa, K. and *122*(3), pp.560-569. DOI:10.1093/jn/122.3.560
3. Cavrois-Rogacki, T., Leeming, D., Lopez, P.M., Davie, A. and Migaud, H., 2022. Plant-based protein ingredients can successfully replace fish meal in the diet of ballan wrasse (*LABRUS BERGYLTA*) juveniles. *Aquaculture*, *54*(6), pp.73-84. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737419
4. Ebrahimnezhadarabi, M., Hosseinifard, S. M., Changizi, R., Vatandoust, S. and Ghobadi, S., 2022. The effects of hydrolyzed canola meal protein on growth, body composition and expression of growth genes and appetite of beluga fish (*Huso huso*). *Applied Biology*, *35*(1), pp.20-35. DOI:10.22051/jab.2021.34652.1404
5. Fatahi, A., Faghani, H., Mohammad Nejad Shamoushaki, M. and Mousavi Sabet, H., 2025. Effect of Cinnamomum verum Powder on the antioxidant defense, liver enzymes and chemical composition muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Development. 19*(1), pp.47-60. [In Persian]
6. García Martínez, E.S., Stumpf, L., Planas, M., Fernández Gimenez, A.V. and López Greco, L.S., 2024. Fishery wastes as feed additive for the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*: Impact on growth, biochemical composition, and digestive activity, *Animal Feed Science and Technology, 3*(18), pp.116-126. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2024.116116
7. Ghobadi, S.h., Matinfar, A., Nezami, Sh.A. and Soltani, M., 2009. Influence of supplementary enzymes Avizyme on fish meal replacement by soy bean meal and its effects on growth performance and survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *3*(2), pp.11-22. [In Persian]
8. Hardy, R.W. and Tacon, A.G.J., 2002. Fish meal–historical uses, production trends and future outlook for sustainable supplies. *Responsible*

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

Shioda, S., 2006. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides*, *27*(9), pp.2321-2325. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.03.028

17. Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S., Kaiya, H., Uchiyama, M., Kangawa, K.,Shioda, S. and Matsuda, K., 2007. Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides 28*(1), pp.1207–1213. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.03.023
18. Mohammadi, M. and Khara, H., 2015. Effect of different anesthetic agents (clove oil, tricaine methanesulfonate, ketamine, tobacco) on hematological parameters and stress indicators of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792. *Comparative Clinical Pathology, 24*(1), pp.1039–1044. DOI: 10.1007/s00580-014-2027-2
19. Mori, K., Yoshimoto, A., Takaya, K., Hosoda, K., Ariyasu, H., Yahata, K., Mukoyama, M., Sugawara, A., Hosoda, H., Kojima, M. and Kangawa, K., 2000. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS letters*, *486*(3), pp.213-216. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02308-5
20. Mortazavi Tabrizi, S.J., Nejati, M., Notash, S.H. and Mirzaii, H., 2012. Study of effect several levels of multi-enzyme on performance parameters and survival rate in rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*), *Veterinary Clinical Pathology*, *5*(1), pp.1103-1110. [In Persian]
21. Najafi, Z., Ouraji, H., Yeganeh, S. and Farhadym A., 2024. Effects of alternative changes of dietary protein source on growth, protein efficiency, digestibility and amino acid profile in Beluga (*Huso huso*). *Journal of Aquaculture Development. 18*(3), pp.96-108. DOI: 10.71901/jad-2024-1-819 [In Persian]
22. Palmegiano, G.B., Daprà, F., Forneris, G., Gai, F., Gasco., L., Guo, K., eiretti, P.G., Sicuro, B. and Zoccarato, I., 2006. Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, *25*(8), pp.357-367. DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.04.011
23. Peng, C. and Peter, R.E., 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Zoological Student*. *36*, pp.78–89. DOI: 10.1530/eje.0.1320012
24. Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.A. and Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters, 339*(1), pp.62-66. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4
25. Safari, R., Zarei, M., Dashtban, M. and Khorasgani, M.R., 2016. Optimization of cDNA synthesis for real-time PCR analysis in fish. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 100*(2), pp.232-240. DOI: 10.1016/j.ygcen.2004.03.006
26. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Imanpour, M.R., Hajibegloo, A., Sanchouli, H., Homayouni, M. and Siddik, M.A.B., 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*, pp.737784. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737784
27. Sampath, W.W.H.A., Rathnayake, R.M.D.S. and Yang, M., 2020. Roles of dietary taurine in fish nutrition. *Marine Life Science Technology, 2*, 360–375. DOI: 10.1007/s42995-020-00051-1
28. Sherwood, N.M., Krueckl, S.L. and McRory, J.E., 2000. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Reviews*, *21*(6), pp.619-670. DOI: 10.1210/edrv.21.6.0414
29. Sobrino, I., Rincón, M.Á. and Oca, J., 2014. Understanding the neuroendocrine control of feeding and growth in fish: a review. *Aquaculture Research,* 45(9), pp.1553-1576.
30. Volkoff, H., 2016. Neuroendocrine

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]

control of feeding in fish: a review. *General and Comparative Endocrinology, 232*, pp.71-79. DOI:10.3389/fnins.2016.00540

31. Willora, F.P., Vatsos, I.N., Mallioris, P., Bordignon, F., Keizer, S., Martınez-Llorens, S., Sørensen, M. and Hagen, Ø., 2022. Replacement of fishmeal with plant protein in the diets of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus*, L. 1758): Effects on digestive enzymes and microscopic structure of the digestive tract. *Aquaculture*, *561*, pp.738601. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738601

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.71901/jad-2025-4-877]