تأثیر جیره غنی‌شده با آستاگزانتین و نمک صفراوی بر رشد، رنگ‌پذیری و میزان کارتنوئید پوست ماهی پَرِت خونی (*Cichlasoma synspilum*♀ × *Cichlasoma citrinellum*♂)

امین مخلص آبادی فراهانی، سالار درافشان*، فاطمه پیکان حیرتی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان ۸۳۱۱۱-۸۴۱۵۶، ایران.

*نویسنده مسئول: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۱۲

چکیده

این مطالعه به‌منظور بهبود رنگ پذیری ماهی پرت، از طریق افزودن نمک صفراوی به جیره غذایی حاوی آستاگزانتین اجرا شد. ماهیان (با میانگین وزنی۲/۶±۲۵/۵ گرم و طولی ۰/۴۳±۶/۳۴ سانتی‌متر) با ۳ جیره متفاوت شامل تیمار شاهد (جیره پایه)، تیمار آستاگزانتین (۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین) و تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی (به‌ترتیب ۴ گرم و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آستاگزانتین و نمک صفراوی) به‌مدت ۹۰ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که شاخص‌های اصلی رشد به‌غیراز نرخ رشد ویژه، در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین، در مقایسه با سایر تیمارها به‌صورت معنی‌داری بهبود یافت ($P<0/05$)، با این وجود چنین تاثیری در تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی مشاهده نشد ($P>0/05$). نتایج ارزیابی رنگ‌سنجی با داده‌های عکس‌برداری نشان داد که زمان لازم برای دستیابی به حداکثر شدت رنگ پوست در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین-نمک صفراوی، حدود یک سوم زمان مورد نیاز برای تیمار آستاگزانتین بود (۳۰ در مقایسه با ۹۰ روز). آنالیز بیوشیمیایی ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی آستاگزانتین-نمک صفراوی سطوح بالاتری از کارتنوئید را در پوست در مقایسه با ماهیان سایر تیمارها نشان دادند ($P<0/05$). ارزیابی رنگ‌سنجی با اسپکتوفتومتری انعکاسی نیز بیانگر رنگ قرمز شدیدتر در ماهیان تغذیه شده با آستاگزانتین-نمک صفراوی بود. بنابراین می‌توان بیان داشت که افزودن نمک صفراوی به جیره حاوی آستاگزانتین می‌تواند منجر به بهبود ابقاء رنگدانه در پوست و به تبع آن بهبود بازارپسندی ماهی شود.

واژگان کلیدی: رنگدانه، بازارپسندی، ماهی زینتی، رنگ سنجی.

مقدمه

ماهی پَرِت خونی (Blood parrot) یکی از ماهیان محبوب زینتی است که از دگرآمیزی دو گونه *Cichlasoma synspilum*♀ و *C. citrinellum*♂ تولید می‌شود. در سال ۱۹۸۰، برای اولین بار این آمیخته در کشور تایلند تولید و در سال‌های بعد در کشورهای ژاپن و چین نیز تولید شد. رنگ بدن و باله‌های ماهیان زینتی یکی از عوامل مهم درفروش و بازاریابی این دسته از ماهیان است و به همین دلیل به‌منظور افزایش رنگ‌پذیری ماهی از روش‌های متعددی همچون تزریق، دست‌کاری‌های ژنتیکی و انواع مکمل‌های غذایی همچون چغندر لبویی (*Beta vulgaris*) (Farahani *et al*., 2015) و جلبک اسپیرولینا (*Arthrospira maxima*) (Shadi and Prinia, 2016) و کرم خاکی (*Eisenia fetida*) استفاده می‌شود (Fattollagi *et al*., 2015).

آستاگزانتین یکی از مکمل‌های غذایی است که می‌تواند از طریق فرآیندهای فیزیولوژیک باعث افزایش رنگ‌دانه، افزایش ایمنی و سرعت بخشیدن به رشد ماهی شود و البته برای انسان نیز بی‌خطر است (Lie *et al*., 2008). آستاگزانتین یک ماده مغذی با پایه چربی و وزن مولکولی ۵۹۶/۸ دالتون و فرمول مولکولی $C_{40}H_{52}O$، در آب غیر محلول و چربی دوست است (Jyonouchi *et al*., 1994). حیوانات توانایی تولید آستاگزانتین را ندارند و این نیاز خود را از طریق جیره تأمین می‌کنند. میزان جذب آستاگزانتین در میان آبزیان متفاوت است و بستگی به گونه، طول دوره تغذیه، غلظت آستاگزانتین، وزن و سن ماهی مورد مطالعه دارد؛ به‌عنوان مثال قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با وزن متوسط ۴۰۰ گرم تنها ۳۹ درصد از آستاگزانتین موجود در جیره را جذب کرده است (Hardy *et al*.,

1990). با توجه به قیمت بالای آستاگزانتین اگر بتوان میزان جذب آن را افزایش داد، علاوه بر میزان افزایش رنگ‌پذیری ماهی، هزینه‌های تأمین جیره نیز کاهش می‌یابد. نمک صفراوی می‌تواند فرآیند امولسیون شدگی چربی‌ها را تسهیل نماید و میزان جذب ترکیبات با پایه چربی را در روده کوچک افزایش دهد (Erdman, 1988). چربی‌ها ابتدا در روده کوچک به شکل آزاد به کمک انتقال‌دهنده‌های لیپوپروتئینی جذب خون می‌شوند. در این مرحله آستاگزانتین موجود در جیره غذایی، آزاد و وارد روده می‌شود (Barbosa *et al*., 1999). نمک صفراوی می‌تواند این فرآیند جذب چربی ها را تسریع نماید (Chen *et al*., 2001; Zhou *et al*., 2002). یکی از این نمک‌های صفراوی با نام تائوکورات سدیم Sodium Taurocholate با فرمول شیمیایی $C_{26}H_{44}NNaO_7S$ می‌باشد که به هضم و جذب چربی‌ها کمک می‌کند که طی آن فرآیند جذب آستاگزانتین را بیشتر و سریع‌تر می‌کند که این فرآیند تواند در نهایت موجب بهبود رنگ بدن ماهی می‌شود. برای ارزیابی میزان رنگ‌پذیری ماهی از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود که از جمله آن‌ها می‌توان به عکاسی در شرایط محیطی ثابت (Yam *et al*., 2003)، ارزیابی بیوشیمیایی میزان آستاگزانتین در بافت پوست ماهی (Yang *et al*., 2012)، استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انعکاسی، استفاده از دستگاه رنگ‌سنج و تست پنل اشاره کرد.

هدف از این مطالعه بهبود جذب آستاگزانتین با استفاده از افزودن نمک صفراوی به جیره غذایی و بررسی میزان رشد و شدت رنگ‌پذیری در ماهی زینتی پَرت تحت تاثیر ترکیب غذایی جدید بود. همچنین برای اولین بار از سه روش رنگ‌سنجی بیوشیمایی، ارزیابی تصویری و اسپکتوفتومتر انعکاسی برای ارزیابی شدت رنگ پذیری پوست ماهی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، ۱۹۸ قطعه ماهی پرت از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان زینتی انصاری واقع در خمینی شهر اصفهان، با میانگین وزنی ۲/۶ ± ۲۵/۵ گرم (انحراف از معیار±میانگین) و میانگین طولی ۰/۴۳±۶/۳۴ سانتی‌متر خریداری و به‌مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاهی در سالن آکواریوم گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان سازگار شدند. در طول دوره آزمایش، میانگین دمای آب ۲۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۸ میلی‌گرم بر لیتر، میزان pH ۸/۱، هدایت الکتریکی ۴۸۲/۲ میکروزیمنس، آمونیاک ۱/۳۷میلی‌گرم بر لیتر و فسفات کل ۰/۰۹ قسمت در میلیون بود. برای این آزمایش سه تیمار، هر تیمار دارای سه تکرار و هر تکرار دارای ۳۳ قطعه ماهی بود. آزمایش شامل (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و (۳) تیمار تغذیه‌شده با ۴ گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمک صفراوی بر مبنای نتایج Yang و همکاران (۲۰۱۲) تنظیم شد. آستاگزانتین (با نام تجاری Lucantin pink ساخت شرکت BUSF آلمان، حاوی ۱۲ درصد استاگزانتین خالص) و نمک صفراوی (ساخت شرکت FULKA آمریکا) برای این آزمایش تهیه شد. ماهیان تحت آزمایش به‌مدت ۹۰ روز با جیره‌های تعیین‌شده روزانه ۳ بار (۸ و ۱۲ صبح و ۴ بعدازظهر) به‌میزان ۲ درصد وزنی تغذیه شدند (جدول ۱). جیره بر اساس نیازمندی‌های ماهیان زینتی بر اساس NRC (۲۰۱۱) تنظیم شد.

شاخص‌های رشد: شاخص‌های رشد ماهی در هر ماه یک‌بار و با استفاده از زیست‌سنجی حداقل ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار، ۵ قطعه از هر تکرار مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای رشد از قبیل وزن کسب‌شده، ضریب تبدیل غذایی، فاکتور وضعیت و نرخ ویژه رشد با استفاده از اطلاعات حاصل از زیست‌سنجی محاسبه شد (Bahrami Babaheydari *et al*., 2014).

سنجش شدت رنگ‌پذیری بر اساس ارزیابی با دوربین دیجیتال: در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ آزمایش از هر تیمار ۵ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی جدا و پس از بیهوشی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تهیه عکس از ماهیان از دوربین ساخت شرکت Olympus آمریکا باقدرت تفکیک ۶/۱ مگا پیکسل استفاده شد. از یک اتاقک تاریک و یک منبع نور ثابت با زاویه تابش ۴۵ درجه به سمت نمونه استفاده و تنظیمات دوربین را به‌حالت دستی برگردانده و میزان ISO ۱۰۰ قرار داده شد. عکس گرفته‌شده با فرمت

جدول ۱ - فرمول و ترکیبات جیره (٪ از جیره).

تیمارهای آزمایش / اجزاء جیره	تیمار شاهد	تیمار آستاگزانتین	تیمار آستاگزانتین- نمک صفراوی
پودر ماهی	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶
سویا	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶	۲۱/۱۶
کلزا	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷	۱۵/۸۷
ذرت	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳	۲۴/۹۳
جو	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲	۱۱/۱۲
مکمل‌های معدنی[۱]	۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸
مکمل‌های ویتامینی[۲]	۲/۳۸	۲/۳۸	۲/۳۸
روغن آفتاب‌گردان	۰/۵	۰/۵	۰/۵
آستاگزانتین[۳]	۰	۰/۴	۰/۴
نمک صفراوی[۴]	۰	۰	۰/۱۲
نمک	۰/۵۲	۰/۱۲	۰
مجموع	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
میزان پروتئین خام جیره	۳/۷۷	۳/۷۷	۳/۷۷
چربی خام	۳۷/۰۳	۳۷/۰۳	۳۷/۰۳
رطوبت	۳/۸۳	۳/۸۳	۳/۸۳
فیبر خام	۳/۳۶	۳/۳۶	۳/۳۶

[۱]مکمل معدنی ساخت شرکت خوراک دام و آبزیان مازندران، ایران (آهن ۲۱/۶۲ درصد، روی ۳۶/۰۵ درصد، سلنیوم ۰/۰۷ درصد، کبالت ۰/۳۶درصد، مس ۲۱/۶۳ درصد، منگنز ۱۸/۰۲ درصد، ید ۲/۱۶ درصد، کولین کلراید ۰/۰۴ درصد). [۲]مکمل ویتامینی ساخت شرکت ارس بازار، ایران حاوی ویتامین‌های A ۱۵/۲۴درصد، D_3 ۳/۰۴ درصد، K_3 ۰/۶۰درصد، E ۳/۰۴ درصد، B_1 ۶/۰۹ درصد، B_2 ۰/۹۱ درصد، B_6 ۰/۹۱ درصد، C ۳۰/۴۸ درصد، کلسیم پنتوتنات ۹/۱۴ درصد، متیونین ۱۸/۲۹ درصد، سیستئین ۹/۱۴ درصد. [۳]ساخت شرکت BUSF آلمان. [۴]ساخت شرکت FULKA آمریکا.

JPEG در نرم‌افزار Photoshop CS از منو Histogram و Palette هر یک از شاخص‌های L, a, b موردبررسی قرار گرفت (Yam *et al*., 2003). سیستم رنگ‌سنجی L, a, b پیشنهاد شده توسط CID (۱۹۷۶) به‌عنوان مقیاس رنگ‌سنجی در نظر گرفته شد. در این سیستم شاخص L میزان روشنایی را اندازه‌گیری می‌کند و از ۰ تا ۱۰۰ متغیر می‌باشد که مقدار صفر برای رنگ سیاه مطلق و مقدار ۱۰۰ برای سفید مطلق در نظر گرفته می‌شود به‌صورتی که هر چه عدد به‌دست‌آمده به صفر نزدیک‌تر باشد، پوست ماهی تیره‌تر است که نشان‌دهنده تجمع بیشتر رنگ‌دانه‌های در سطح پوست ماهی است (Pavlidis, 2006). در مورد دو پارامتر رنگی a و b نیز پارامتر a رنگ‌بندی قرمز تا سبز را تعیین می‌کند که مقدار به‌دست‌آمده آن ۱۰۰+ تا ۱۰۰- متغیر است به‌طوری‌که هر چه عدد به‌دست‌آمده از صفر (رنگ خنثی) به سمت مثبت حرکت کند به رنگ قرمز متمایل می‌شود و هر چه به سمت منفی حرکت سوق پیدا کند رنگ سبز پدیدار می‌شود. شاخص b نیز رنگ‌بندی زرد تا آبی را مشخص می‌کند که مقدار آن از ۱۰۰+ تا ۱۰۰- متغیر است به‌صورت که اعداد مثبت در محدوده رنگی زرد، صفر حالت خنثی و اعداد منفی در محدوده رنگ آبی است و هر چه به سمت انتهایی این محدوده عددی حرکت کنیم بر میزان زردی یا آبی بودن رنگ افزوده می‌شود.

ارزیابی بیوشیمیایی محتوای کاروتنوئید پوست: در پایان دوره آزمایش از هر تیمار، ۵ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب شد، سپس ماهیان با استفاده با محلول غلیظ پودر گل میخک به میزان ۳ گرم به ازای هر ۱ لیتر آب بی‌هوش و کشته شدند، سپس بخش‌هایی از پوست و باله دمی آن‌ها (به میزان تقریبی ۳ گرم) جداشده و درون محلول استون خالص با حجم حدود ۱۰ برابر حجم بافت قرار داده شدند؛ بعد از هموژن کردن بافت در محلول استون و تخریب کامل بافت، محلول حاصل به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها را از کاغذ صافی عبور داده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نور توسط نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ساخت شرکت Jasco مدل V-500 تولیدشده در کشور ژاپن واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. محتوای کاروتنوئید با استفاده از رابطه زیر برحسب

جدول ۲ – شاخص‌های رشد ماهی‌های پرت تغذیه شده با تیمارهای متفاوت حاوی رنگدانه به مدت ۹۰ روز.

تیمارهای آزمایش / شاخص رشد	شاهد	آستاگزانتین	آستاگزانتین-نمک صفراوی
طول اولیه (سانتی‌متر)	۶/۳۳±۱/۴۴[a]	۶/۲۵±۱/۲۵[a]	۶/۳۴±۱/۵۱[a]
وزن اولیه (گرم)	۲۶/۰۲±۰/۰۳[a]	۲۷/۰۵±۰/۰۳[a]	۲۵/۵۲±۰/۰۳[a]
طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۰/۱۲±۰/۴۱ [a]	۱۱/۴۳±۰/۲۶ [a]	۱۰/۰۰±۰/۴۷ [a]
وزن نهایی (گرم)	۳۴/۹۱±۴/۳۷ [a]	۴۸/۸۷±۵/۱۰ [b]	۳۵/۱۳±۰/۹۲ [a]
افزایش وزن (گرم)	۸/۸۹±۴/۳۴ [a]	۲۱/۸۴±۵/۰[b]	۹/۶۱±۰/۹۵[a]
شاخص وضعیت (٪)	۳/۴±۰/۱۳ [a]	۳/۹±۰/۱۱ [b]	۳/۵±۰/۰۳[a]
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	۳/۳۵±۰/۰۱ [a]	۴/۲۵±۰/۱۱ [b]	۳/۵۳±۰/۴۰ [a]
ضریب تبدیل غذایی	۲/۸۱±۰/۶۷ [a]	۱/۱۴±۰/۷۶ [b]	۲/۶۰±۰/۱۴۴ [a]
بازماندگی (٪)	۷۵/۷۵±۰/۷[a]	۸۹/۳۹±۰/۷[a]	۸۰/۹۰±۱/۴۱[a]

در هر ردیف، وجود حداقل یک حرف مشابه، بیانگر عدم وجود تفاوت معنی دار است.

میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد (Shahgholian, 2016).

$$S = \frac{A \times K \times V}{E \times G}$$

S محتوای کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم، A میزان جذب در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر، K ضریب ثابت ۱۰، V حجم محلول استخراجی (استون برحسب میلی‌لیتر)، E ضریب خاموشی (۲۵۰۰ برای کاروتنوئید) است.

رنگ‌سنجی با اسپکتروفتومتر انعکاسی: پس از پایان آزمایش در روز ۹۰ ام از هر تیمار ۵ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی جدا شدند، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انعکاسی ساخت شرکت Datacolor آمریکا مدل NJ08648 واقع در دانشکده نساجی دانشگاه صنعتی اصفهان قسمت‌هایی از پوست سینه ماهی‌ها بر طبق شاخص‌های L, a, b موردبررسی قرار گرفتند، شاخص‌های L, a, b مطابق با موارد مطرح‌شده در عکاسی با دوربین دیجیتال بود.

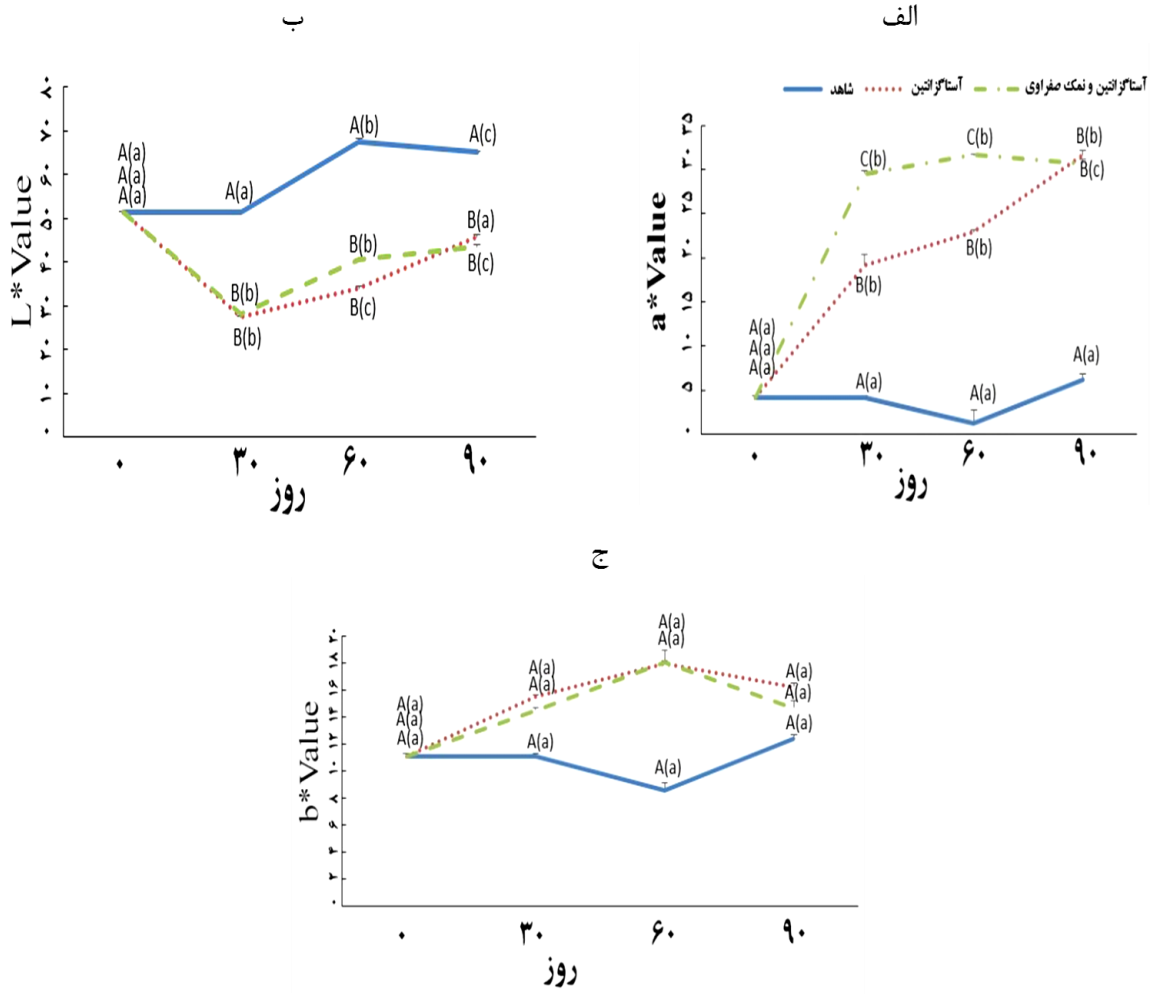
تحلیل آماری: این آزمایش در طرح کاملاً تصادفی انجام و با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح $P<۰/۰۵$ تحلیل شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف در یک‌زمان یا زمان‌های مختلف یک تیمار از آزمون Duncan در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov–Smirnov و آنالیز داده‌ها با استفاده نرم‌افزارهای آماری SPSS 19 و Excel 2013 انجام شد.

نتایج

شاخص‌های رشد: شاخص‌های افزایش وزن، شاخص وضعیت، ضریب تبدیل غذایی به‌غیر از نرخ رشد ویژه در تیمار آستاگزانتین در مقایسه با تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بهبود یافت ولی تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲؛ $P>۰/۰۵$). تلفاتی در گروه‌های آزمایشی در طی دوره آزمایش مشاهده نشد.

داده‌های شدت رنگ‌پذیری بر اساس ارزیابی با دوربین دیجیتال: داده‌های عکس‌برداری توسط دوربین دیجیتال همانند داده‌های اسپکتروفتومتر انعکاسی از استاندارد L, a, b پیروی می‌کند. نمونه‌ای از تصاویر استفاده‌شده در شکل ۱ قابل مشاهده است که آستاگزانتین و تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی قرمزتر از تیمار شاهد می‌باشد. در مقایسه شاخص L (روشنایی) تنها پس از ۳۰ روز از شروع آزمایش تیمارهای آستاگزانتین و تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند و این تفاوت تا روز ۹۰ نیز ادامه یافته است (شکل ۲-الف؛ $P<۰/۰۵$). مقادیر شاخص a نشان می دهد که طی ۳۰ روز اول هر سه تیمار با یکدیگر

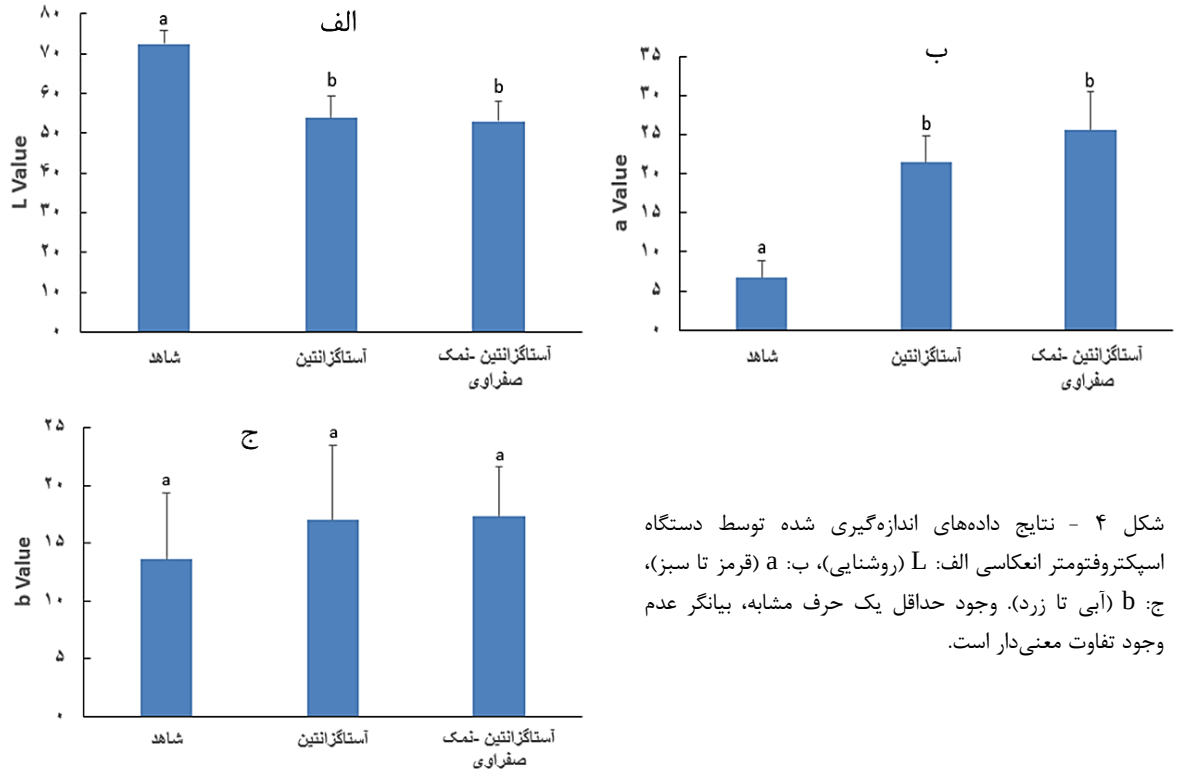
شکل ۱ - تصاویر تهیه‌شده توسط دوربین دیجیتال در روز ۹۰ ام آزمایش الف: تیمار شاهد، ب: تیمار آستاگزانتین، ج: تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی. ماهیان دو تیمار آستاگزانیتن و آستاگزانتین-نمک صفراوی قرمزرنگ‌تر از ماهیان تیمار شاهد است..



شکل ۲ - نتایج داده‌های شدت رنگ‌پذیری بر اساس ارزیابی با دوربین دیجیتال الف: شاخص L ب: شاخص a، ج: شاخص b، (حروف بزرگ برای مقایسه میانگین تیمارها در یک‌زمان مشخص و حروف کوچک داخل پرانتز جهت مقایسه میانگین یک تیمار در زمان‌های مختلف مورد استفاده قرارگرفته است. وجود حداقل یک حرف مشابه بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است.

تفاوت معنی‌داری داشته‌اند و بیشترین میزان افزایش رنگ قرمز به‌ترتیب مربوط به تیمارهای آستاگزانتین-نمک صفراوی، آستاگزانتین و در نهایت تیمار شاهد بود (شکل ۲-ب؛ $P<۰/۰۵$). مقدار شاخص a در روز ۹۰ در دو تیمار آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی با یکدیگر برابر و تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) نسبت به گروه شاهد داشتند و نتایج نشان داد تأثیر مصرف آستاگزانتین در طی ۹۰ روز نتیجه‌ای برابر با مصرف آستاگزانتین-نمک صفراوی تنها طی ۳۰ روز را دارد (شکل ۲- ب). ازنظر شاخص b نیز هیچ نوع تفاوت معنی‌داری یافت نشد ($P>۰/۰۵$) و بدین معناست که در دامنه رنگی آبی تا زرد در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل۲- ج).

شکل ۲ - مقایسه میزان تجمع کاروتنوئید در بافت پوست ماهی به روش بیوشیمیایی. وجود حداقل یک حرف مشابه، بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است.



شکل ۴ - نتایج داده‌های اندازه‌گیری شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انعکاسی الف: L (روشنایی)، ب: a (قرمز تا سبز)، ج: b (آبی تا زرد). وجود حداقل یک حرف مشابه، بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار است.

ارزیابی بیوشیمیایی محتوای کاروتنوئید پوست:
میزان محتوای کاروتنوئید در پوست ماهی پرت پس از ۹۰ روز تغذیه با جیره‌های مختلف مورد آزمایش در تیمارهای مختلف در گستره ۱۴۱ mg/kg الی ۳۴۱ قرار داشت (شکل ۳). با توجه به داده‌ها میزان جذب کاروتنوئید در بافت پوست ماهی پَرِت در تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی به‌صورت معنی‌داری از تیمارهای شاهد و آستاگزانتین بود (شکل ۴؛ $P<۰/۰۵$).

رنگ سنجی پوست با اسپکتروفتومتر انعکاسی:
برای سنجش میزان رنگ پوست ماهی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انعکاسی ۳ شاخص b, a, L موردبررسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد میزان شاخص L یا روشنایی تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری بیشتر (روشن‌تر) از دو تیمار دیگر بود (شکل ۴–الف؛ $P<۰/۰۵$). میزان شاخص a در تیمارهای آستاگزانتین و تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی به‌صورت معنی‌داری بیشتر (قرمزتر) از تیمار شاهد می‌باشد (شکل ۴- ب؛ $P<۰/۰۵$). در نهایت میزان شاخص b تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای

مورد آزمایش نشان نداد این بدین معنی است که در دامنه رنگی آبی تا زرد در بین تیمارها تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل ۴- ج).

بحث

نتایج داده‌های رشد نشان داد که تیمار حاوی آستاگزانتین نسبت به تیمار شاهد ۱۵۰ درصد افزایش رشد داشته است. در مطالعه Tizkar و همکاران (۲۰۱۶) مشخص شد که اضافه کردن آستاگزانتین به جیره غذایی ماهی حوض (*Carassius auratus*) باعث افزایش مصرف غذا درنتیجه بهبود رشد می‌شود. در مطالعه Capelli و Cysewski (۲۰۱۱) نتایج نشان داد که میزان رشد ماهیانی که از مکمل غذایی آستاگزانیتن استفاده کردند ۶ برابر بیشتر از تیمار شاهد بوده است. همچنین در مطالعات دیگر مشخص شد تغذیه از *H. pluvialis* باعث افزایش رشد و بازماندگی در قزل‌آلا می‌شود (Christiansen *et al*., 1995). تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی در مقایسه با تیمار آستاگزانتین رشد کمتری داشت ولی با تیمار شاهد تفاوت نداشت. نمک صفراوی باعث افزایش میزان جذب چربی جیره می‌شود (Erdman, 1988) و چربی بالا در جیره غذایی می‌تواند باعث کاهش مصرف غذا و در نتیجه کاهش رشد و بازده غذایی می شود (Shearer *et al*., 1997; Weatherup *et al*., 1997; Silverstein *et al*., 1999). کاهش شاخص رشد در تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی می‌تواند ناشی از بالا بودن میزان جذب چربی (انرژی) جیره غذایی باشد که باعث امتناع ماهی‌ها از دریافت غذایی کافی می‌شود. مطالعه مشابه در خصوص تأثیر چربی جیره بر رشد و مصرف غذا در سایر ماهیان نیز نشان داد، کاهش مصرف غذا و رشد در سطوح بالای چربی جیره‌های غذایی رخ می‌دهد (Stavros *et al*., 2010). علاوه بر این، کاهش رشد مشاهده شده در تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی می‌تواند ناشی از توانایی محدود ماهی در جذب چربی زیاد و کاهش جذب غذا باشد که رشد کمتر ماهی‌های این تیمار را به دنبال داشت است. این نتیجه‌گیری با منابع علمی (NRC, 1983) و یافته‌های سایر محققین مورد تائید قرار می‌گیرد (El-Saye and Garling, 1988; Ellis and Reigh, 1991). همچنین در مطالعه Ebrahimi (۱۳۹۱) مشخص شد افزایش میزان چربی در جیره لارو یا بچه تاس ماهی (*Huso huso*) باعث افزایش رشد به‌صورت خطی نمی‌شود و همیشه افزایش چربی به معنی افزایش رشد نیست.

نتایج شدت رنگ‌پذیری بر اساس ارزیابی با دوربین دیجیتال در ۳۰ روز اول نشان می‌دهد تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی در شاخص a افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشته‌اند. مقدار شاخص a در روز ۹۰ ام، در دو تیمار آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی با یکدیگر برابر و تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند، نتایج نشان داد تأثیر مصرف آستاگزانتین-نمک صفراوی طی ۳۰ روز برابر با مصرف آستاگزانتین به‌تنهایی در طی ۹۰ را دارد. در مطالعه Mashlchi و همکاران (۲۰۱۰) مشخص شد میزان شاخص‌های رنگ در تیمارهای تغذیه شده با آستاگزانتین بهبود یافته و میزان شاخص a افزایش یافته است و مطالعه Shadi و همکاران (۱۳۹۵) نیز مشخص شد مکمل‌های غذایی رنگ‌دانه دار مانند آستاگزانتین و (*Dunaliella salina*) باعث افزایش شاخص a می‌گردد. نتایج رنگ‌سنجی داده‌های اندازه‌گیری شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انعکاسی نیز نشان داد میزان شاخص a که نشان‌دهنده میزان رنگ قرمز است در تیمارهای آستاگزانتین و آستاگزانتین-نمک صفراوی به‌ترتیب به میزان ۲۱۹/۴ و ۲۸۰/۵ درصد نسبت به تیمار شاهد بیشتر بوده است. نتایج رنگ‌سنجی بیوشیمیایی نشان داد که میزان تجمع آستاگزانتین در بافت پوست ماهی در تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی ۱۰۰ درصد بیشتر از تیمار آستاگزانتین و ۱۴۱/۸ درصد بیشتر از تیمار شاهد بوده است. نتایج مطالعه Yang و همکاران (۲۰۱۲) نیز این نتایج را تائید می‌کند. عوامل متعددی می‌تواند بر رنگ‌پذیری ماهی اثرگذار باشد، یکی از این عوامل مکمل‌های غذایی هستند که ازجمله آن‌ها ویتامین A، ویتامین B و انواع ترکیبات دیگر است (Leng and Li, 2006). میزان چربی غذای ماهی در حدود ۴ الی۲۳ درصد است و با افزایش چربی، میزان جذب آستاگزانتین نیز افزایش می‌یابد. تأثیر چربی بر میزان اثربخشی آستاگزانتین

در ماهی *Xiphophorus helleri* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در بازه ۰ الی ۲۰ درصد چربی در جیره، بیشترین میزان اثر آستاگزانتین در حدود ۲۰ درصد چربی بوده است (Han, 2001). مقدار مناسب چربی در غذا می‌توان باعث افزایش اثربخشی آستاگزانتین شود (Pozo *et al*., 1988). در مطالعه دیگری افزایش میزان ویتامین E در جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان در جذب آستاگزانتین تأثیر معنی‌داری نداشت (Torrissen, 1985). این نتایج نشان می‌دهد که عملکرد آستاگزانتین نه‌تنها با مقدار جذب و تجمع بلکه با میزان سوخت‌وساز نیز در رابطه است. بنابراین برای جذب بیشتر و افزایش کارایی آستاگزانتین باید شاخص‌هایی مانند میزان جذب و سوخت‌وساز بدن ماهی را نیز در نظر گرفت.

در این مطالعه سه روش رنگ‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت. در هر دو روش رنگ‌سنجی با استفاده از دوربین دیجیتال و دستگاه اسپکتروفتومتری انعکاسی شاخص‌های L, a, b مورد بررسی قرار گرفت شاخص L میزان روشنایی، شاخص a طیف رنگی قرمز تا سبز و شاخص b طیف رنگی زرد تا آبی را نشان می‌دهد. از مزایایی استفاده از دوربین عکاسی نسبت به روش‌های دیگر می‌توان به‌سرعت انجام آزمایش، در دسترس بودن تجهیزات موردنظر و عدم نیاز به تلف شدن ماهی اشاره کرد ولی نمی‌توان به دقیق بودن این روش اطمینان حاصل کرد زیرا فقط قسمت کوچکی از تصویر را مورد بررسی قرار می‌دهد و نمی‌توان آن را به تمام سطح پوست ماهی تعمیم داد و علاوه بر آن در این روش شرایط آزمایش متغیر است. روش استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری انعکاسی دقت بالاتری از روش عکاسی دارد، زیرا قسمت بیشتری از سطح پوست ماهی را مورد بررسی قرار می‌دهد و شرایط آزمایش به‌دلیل استفاده از دستگاه‌های دقیق، ثابت می‌باشد. روش رنگ‌سنجی شیمیایی از دو روش دیگر دقیق‌تر بوده و میزان آستاگزانتین در بافت را به‌دقت موردبررسی قرار می‌دهد، ولی در این روش باید پوست ماهی را جدا کرده و درنتیجه ماهی تلف می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد بالاترین میزان حضور آستاگزانتین در پوست ماهی در تیمار آستاگزانتین-نمک صفراوی مشاهده شد و از نظر ظاهری تأثیر مصرف آستاگزانتین-نمک صفراوی طی ۳۰ روز نتیجه‌ای برابر مصرف آستاگزانتین به تنهایی در طی ۹۰ روز را نشان داد. بنابراین به نظر می رسد افزودن سطح معینی از نمک صفراوی به جیره می‌تواند با افزایش جذب آستاگزانتین کمک کند، با این وجود نباید از اثر منفی آن بر رشد غافل شد. در مطالعات آتی، در نظر گرفتن یک تیمار نمک صفراوی به تنهایی و نیز ارزیابی نسبت سطوح مختلف آستاگزانتین و نمک صفراوی پیشنهاد می شود.

منابع

Bahrami Babaheydari S., Dorafshan S., Paykan Heyrati F., Mahboobi Soofiani N., Vahabi M.R. 2014. The physiological changes, growth performance and whole body composition of common carp, *Cyprinus carpio* fed on diet containing wood betony, *Stachys lavandulifolia* extract. *Journal of Agricultural Science and Technology* 16(9), 1565-1574.

Barbosa M., Morais R., Choubert G. 1999. Effect of carotenoid source and dietary lipid content on blood astaxanthin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 176(3), 331-341.

Chen B., Zhou G.H., Liu Q. 2001. Study on the effect of carotenoid, sodium taurocholate and free fatty acids on carotenoids uptake by intestinal cells in vitro. *Journal of Animal Nutrition* 13(2), 47-50.

Christiansen R., Lie O., Torrissen O.J. 1995. Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin, First-feeding fry. *Aquaculture Nutrition* 1(3), 189-198.

Ebrahimi E., Zare P. 2011. Effects of dietary lipid level on growth, feed utilization and survival of juvenile of Beluga (*Huso huso*). *Journal of Natural Environment* 64(2), 93-106. (In Persian)

Ellis S., Reigh R. 1991. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum *Sciaenops ocellstus*. *Aquaculture* 97(4), 383-394.

El-Sayed A.M., Garling D. 1988. Carbohydrate-to-lipid ratio in diets for *Tilapia zillii* fingelings. *Aquaculture* 73(1-4), 157-163.

Erdman J. 1988. The physiologic chemistry of carotenes in man. *Clinical Nutrition* 7(3), 101-106.

Farahani M., Siahrodaki S., Forodi F. 2015. The effect of red beet (*Beta vulgaris*) on the color of the meat and skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal Environment* 8(1), 223-228. (In Persian)

Fattollahi M., Shagolian T. 2016. Enhancement of coloration performance of the ornamental parrot fish (*Amphilophus citrinellus* × *Paraneetroplus melanurus*) using fed earthworms reared by high natural pigment plants. *Journal of Animal Research* 29(4), 449-455. (In Persian)

Foss P., Storebakken T., Austreng E., Liaaenjensen S. 1987. Carotenoids in diets for salmonoids Pigmentation of rainbow trout and sea trout with astaxanthin and astaxanthin dipalmitate in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 65(3-4), 293-301.

Han X.Z. 2001. Influence of feed additives on pigmentation of aquarium fish. PhD. Thesis. Hebei University, Hebei. China.

Hardy R., Torrissen O., Scott T. 1990. Absorption and distribution of 14C labeledcanthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 87(3-4), 331-340.

Jyonouchi H., Zhang L., Gross M., Tomita Y. 1994. Immunomodulating actions of carotenoid enhancement of In Vivo and In Vitro antibody production to T-dependent antigens. *Journal of Nutrition and Cancer* 21(1), 47-58.

Leng X.J., Li X.Q. 2006. The recent advance of aquatic animal pigmentation. *Journal of Fisheries* 30(1), 138-143.

Li X.H., Wang X.J., Mu X.D., Hu Y.C., Wang G.J., Liu C., Luo J.R. 2008. Effects of astaxanthin on the color of blood parrot. *Journal of Anhui Agricultural Sciences* 36(20), 8606-8607.

Mashalchi M., Alishahi M., Javahery M., Hejazi M.A. 2010. Comparison between the effects of Astaxanthin and *Dunaliella salina* on coloration and immune response of *Astronorus ocellatus*. *Marine Biology* 2(1), 75-83.

NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp: National Academies Press, Washington, DC.

Pavlidis M., Papandroulakis N., Divanach P. 2006. A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. *Aquaculture* 258(1), 211-219.

Pozo R., Lavety J., Love R.M. 1988. The role of dietary VE in stabilizing the canthaxanthin and lipids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Aquaculture* 73(1-4), 165-175.

Shadi A., Pirnia A. 2016. Colour Enhancement in the zebra Malawi cichlid (*Pseudotropheus zebra*) by Addition of Spirulina microalga (*Arthrospira maxima*). *Journal of Marine Science and Technology* 15(3), 64-76. (In Persian)

Shahgholian T. 2016. Enhancement of coloration performance of the ornamental parrot fish (*Amphilophus citrinellus* × *Paraneetroplus melanurus*) using fed earthworms reared by high natural Pigment Plants. Shahrekord University, Iran. 84 p. (In Persian)

Shearer K.D., Silverestein J.T., Plisetskaya E.M. 1997. The role of adiposity in food intake control of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comparative Physiology and Biochemistry* 118(4), 1209-1215.

Silverstein J.T., Shearer K.S., Dickhoff W.W., Plisetskaya E.M. 1999. Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. *Aquaculture* 177(1), 161-169.

Stavros C., Panagiotidou M., Papaioannou N Pavlidis M. 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307(1), 65-70

Tizkar B., Soudagar M., Bahmani M., Hosseini S.A., Chamani M., Seidavi A., Ponce-Palafox J.T. 2016. Effects of dietary astaxanthin and [Beta]-carotene on gonadosomatic and hepatosomatic indices, gonad and liver composition in goldfish *Carassius auratus. Journal of Aquatic Research* 44(2), 363-368, (In Persian)

Torrissen O.J. 1985. Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 46(2), 133-142.

Weatherup R.N., McCracken K.J., Foy R., Rice D., Mckendry J., Mairs R.J., Hoey R. 1997. The effects of dietary fat content on performance and body composition of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 151(1-4), 107-184.

Yam V.W., Li B. Yang Y., Chu B.W.K., Wong K.M.C., Cheung K.K. 2003. Preparation, photo-luminescence and electro-Luminescence behavior of Langmuir blodgett films of bipyridylrhenium (I) surfactant complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry* 203(22), 4035-4042.

Yang H., Mu X., Luo D., Hu Y., Song H., Liu C., Luo J. 2012. Sodium taurocholate, a novel effective feed-additive for promoting absorption and pigmentation of Astaxanthin in blood parrot (*Cichlasoma synspilum*♀× *Cichlasoma citrinellum*♂). *Aquaculture*

350(1), 42-45.
Zhou L.M., Zhou G.H., Chen B. 2002. Effects of bile salt on intestinal absorption of carotenoids in goats. *Journal of Nanjing Agricultural University* 25(3): 61-64.

Effect of diet enriched with Astaxanthin and Bile salt on growth and pigmentation and skin carotenoid content of Blood parrot (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂)

Amin Mokhles Abady Farahani, Salar Dorafshan*, Fatemeh Paykan Heyrati

Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran.

*Corresponding author: sdorafshan@cc.iut.ac.ir

Received: 2019/1/6 Accepted: 2019/4/1

Abstract

This study was done to improve pigmentation rate of blood parrot by bile salt incorporation into the diet enriched with astaxanthin. The fish (mean weight 25.5±2.6 g and length 6.34±0.43 cm) were fed for 90 days using three different treatments, including control (basic diet), astaxanthin (enriched with 4g/kg astaxanthin) and astaxanthin-bile salt (enriched with 4 g and 1200 mg of astaxanthin and bile salt per kg of diet, respectively). The results showed that growth performance parameters (specific growth rates as an exception) were significantly improved in the fish fed on astaxanthin enriched diet ($P<0.05$). While fish fed the diet enriched with astaxanthin-bile salt did not show such an improvement ($P>0.05$). Colorimetric analysis showed that the period for the highest pigmentation intensity in fish fed the astaxanthin-bile salt are lower (about one-third) than the fish fed on diet enriched with astaxanthin (30 vs 90 days). At the end of the feeding trail, biochemical analysis showed that the fish fed on astaxanthin+bile salt diet had the highest skin carotenoid concentration ($P<0.05$). Colorimetric analysis using reflection spectroscopy showed the highest red color intensity in fish fed on the diet enriched with astaxantin-bile salt. In summary, it could be concluded that adding bile salt to the astaxantin enriched diet could improve pigment retention rate into the skin of parrot fish which rectify fish marketability.

Keywords: Pigment, Marketability, Ornamental fish, Colorimetric assay.