مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۱، ۱۰۲-۹۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,1:95-102, 2014

مقایسه اثر آستاگزانتین و جلبک دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) بر میزان کاروتنوئید پوست، پراکسیداسیون لیپیدها و رنگ ماهی سورم (*Heros serverus*)

مجتبی علیشاهی[1*] مسعود کرمی فر[2] مهرزاد مصباح[1] مهدی زارعی[3]
۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران
۲) دانش آموخته، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران
۳) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران

(دریافت مقاله: ۴ شهریور ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۲۹ آبان ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: محققین از دیرباز به دنبال جایگزین‌های مناسبی برای رنگ دانه‌های صناعی مانند آستاگزانتین بوده‌اند. **هدف:** لذا در این تحقیق اثر تجویز خوراکی آستاگزانتین و جلبک دونالیلا سالینا بر میزان بتاکاروتن پوست، رنگ پوست و باله‌ها و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای عضله ماهی سورم (*H.serverus*) مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** به این منظور تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی با وزن (۲۷±۰/۵ g) به ۳ تیمار در ۳ تکرار تقسیم شدند: تیمار اول با غذای معمولی (G1) و دو تیمار دیگر به ترتیب با ۲۰۰ mg/kg جلبک دونالیلا (G2) و ۲۰۰ mg/kg آستاگزانتین (G3) تغذیه شدند. بعد از ۶ هفته تغذیه از ماهی‌های هر تیمار عکس دیجیتال، نمونه پوست و عضله تهیه گردید. میزان بتاکاروتن پوست و (مالون-دی-آلدئید) MDA عضله و نیز شاخص‌های رنگ (L*,a*,b*, Hue و Chroma) بین تیمارها مقایسه گردیدند. **نتایج:** میزان بتاکاروتن در تیمارهای G3 و G2 نسبت به G1 افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). میزان پراکسیداسیون لیپیدی در تیمار G2 و G3 کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p<0/05$). در ناحیه تنه اگرچه بعضی از شاخص‌های رنگ بهبود یافت ولی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$). در ناحیه باله‌ها شاخص‌های a* و Hue در تیمارهای G2 و G3 به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار G1 داشتند ($p<0/05$). شاخص b* در تیمارهای G2 و G3 کاهش معنی داری نسبت به تیمار G1 را نشان داد ($p<0/05$). شاخص Chroma در تیمار G3 افزایش معنی‌داری نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد ($p<0/05$). شاخص L* در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p>0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** طبق نتایج اگرچه تأثیر آستاگزانتین بر میزان بتاکاروتن و رنگ پوست بیشتر از جلبک دونالیلا می‌باشد، ولی با توجه به قیمت مناسب‌تر، در دسترس بودن و امکان تولید وسیع، از این جلبک می‌توان به عنوان یک جایگزین مناسب برای آستاگزانتین استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آستاگزانتین، بتاکاروتن، جلبک دونالیلا سالینا، ماهی سورم

مقدمه

با توجه به نقش کاروتنوئیدها در رشد، تحریک ایمنی، رنگ، خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی استفاده از منابع کاروتنوئیدها در آبزیان رواج زیادی یافته است (۱۰،۱۲،۲۰،۳۱،۳۷،۴۱،۴۴). کاروتنوئیدهای سنتتیک مانند آستاگزانتین به میزان زیاد در آبزیان پرورشی و زینتی استفاده می‌شوند(۲)، ولی به علت قیمت بسیار بالای این مواد، متخصصین همیشه به دنبال یک جایگزین با اثرات مشابه، قیمت ارزان و در دسترس، مانند جلبک‌های ریز، عصاره‌ها، مشتقات گیاهی و حیوانی بوده‌اند (۱۹). قیمت بالای آستاگزانتین به میزانی است که گاهی تا ۲۰٪ قیمت خوراک را به خود اختصاص می‌دهد درصد هزینه خوراک را شامل می‌شود(۲). دونالیلا یک جلبک سبز تک یاخته‌ای، متحرک و فاقد دیواره سلولی است که همواره به عنوان یک سیستم مدل جهت مطالعات پاسخ موجود به تنش‌های محیطی مورد توجه محققان بوده است (۹،۱۳). این جلبک حاوی رنگدانه بتاکاروتن، اسیدهای حلال، مواد محرک ایمنی مانند فیکوسیانین، پلی ساکاریدها، آهن و روی است (۳۴) و حاوی مقادیری ویتامین C و ویتامین E نیز می‌باشد (۱۸). یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد این جلبک توانایی تولید و تجمع مقادیر زیاد بتاکاروتن تحت شرایطی نظیر شوری زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی است که منجر به نارنجی شدن رنگ سلول و سوسپانسیون جلبکی می‌شود (۳،۴،۵). یکی از جذاب ترین ویژگی‌های موجودات آبزی، رنگ آنها می‌باشد که منبع رنگی آنها از مواد غذایی موجود در محیط زیست طبیعی آنها می‌باشد (۲۳). ماهی‌ها معمولاً قادر به سنتز کاروتنوئید مورد نیاز خود، برای ایجاد رنگ مناسب نیستند و باید به همراه خوراک، این مواد به خوراک ماهی اضافه گردد (۱۵).

کیفیت رنگ ماهی اهمیت زیادی از نقطه نظر تجاری دارد و به طور مستقیم با قیمت، پذیرش مشتری و میزان فروش در ارتباط است (۳۶). امروزه رنگ ماهی را بر اساس درخواست بازار با انواع کاروتنوئیدهای طبیعی یا سنتزی تنظیم می‌نمایند (۲۳). در برخی ماهیان خوراکی مثل آزاد ماهیان رنگ ماهی (پوست و عضله) در بازار پسندی ماهی نقش زیادی داشته به طوری که علیرغم قیمت بالای آستاگزانتین، اکثر تولید کنندگان آزاد ماهی در اروپا با استفاده از این ماده باعث ایجاد طیف‌های رنگ نارنجی و حتی قرمز در ماهی می‌گردند (۴۲).

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۶۱۱-۳۷۳۸۳۸۵ نمابر: ۰۶۱۱-۳۳۶۰۸۰۷ Email: alishahi moj@gmail.com

ماهی سوروم از خانواده‌ی سیکلیده (Cichlidae) و از جنس هروس (*Heros*) می‌باشد. این ماهی بومی امریکای مرکزی است ولی در هر نوع شرایطی مطابق با شرایط اقلیمی آن نواحی قادر به زندگی خواهد بود. ماهی سوروم از گونه‌های پر طرفدار در میان ماهیان آکواریمی محسوب می‌شود این ماهی با مناطق دارای پوشش گیاهی در ارتباط است و از بی مهرگان کوچک و مواد گیاهی تغذیه می‌کند (۲۵،۲۸).

در این تحقیق اثر آستاگزانتین با دونالیلا سالینا بر میزان بتا کاروتن پوست، پراکسیداسیون لیپیدی و رنگ پوست و باله‌های ماهی سوروم مقایسه گردید.

مواد و روش کار

تهیه‌ی جلبک: جلبک دونالیلا سالینای جداسازی شده از دریاچه ارومیه (Dunaliella M1) که به روش‌های مولکولی جنس و گونه آن به اثبات رسیده بود در بیوراکتورهای نوری lit (photobioreactor) ۱۴ با محیط کشت جانسون تغییر یافته (modified junson medium) کشت داده شد (۱۷). غلظت نمک محیط کشت به ۱/۵٪ رسانده شد. میزان نور بیوراکتور با استفاده از دستگاه (SPOT R80 NATURA E27/ESW) Osram lamps به میزان ۴۰۰ µmol m-2s-1 تنظیم گردید. دمای بیوراکتور در حد ۲۵±۰/۵ ^{o}C و pH آن ۷/۵±۰/۳ ثابت گردید. ۷ روز پس از کشت جلبک و تولید بیوماس مناسب در بیوراکتور، به منظور افزایش میزان تولید بتاکاروتن، استرس شوری و نوری برای القای تولید بتاکاروتن بیشتر در دونالیلا انجام شد. به این منظور میزان شوری و میزان نور بیوراکتور به ترتیب به ۳٪ و ۲۰۰۰ µmol m-2s-1، افزایش داده شد. کشت جلبک در بیوراکتور به مدت ۸ روز بعد از شروع استرس نیز ادامه یافت و جلبک‌ها به رنگ نارنجی در آمدند، جلبک‌های حاصل با سانتریفوژ جداسازی و لیوفیلیزه شده و در یخچال تا زمان انجام تحقیق نگهداری گردیدند.

تیمار بندی ماهی‌ها: تعداد ۱۳۵ قطعه ماهی سورم با میانگین وزنی ۲۱±۰/۳۵g متوسط بدون در نظر گرفتن جنسیت از یکی از مراکز تکثیر ماهیان زینتی در شهرستان اهواز خریداری گردید و پس از انتقال به سالن آکواریوم دانشگاه شهید چمران اهواز، ماهی‌ها به مدت یک ماه برای سازش یابی با محیط جدید پرورش داده شدند. سپس ماهی‌ها (۲۷±۰/۵g) به طور تصادفی به سه تیمار هر یک در سه تکرار و در نه آکواریوم (هر آکواریوم شامل ۱۵ قطعه ماهی) به شرح زیر تقسیم شدند:

تیمار اول: شاهد بدون افزودنی غذایی

تیمار دوم: تغذیه شده با خوراک حاوی ۲۰۰ mg/kg پودر جلبک دونالیلا

تیمار سوم: تغذیه شده با خوراک حاوی ۲۰۰ mg/kg آستاگزانتین

تهیه‌ی خوراک‌های تحقیق: برای تهیه خوراک هر تیمار، خوراک استاندارد ساخت شرکت Biomar تولید کشور فرانسه مخصوص ماهیان آکواریومی استفاده گردید. در مورد هر تیمار ۱۰۰g خوراک با اضافه نمودن آب مقطر بصورت خمیر درآورده شد. ۲۰ mg پودر جلبک دونالیلا (تهیه شده در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب کشور) برای گروه ۲ و ۲۰mg پودر آستاگزانتین (Lucantin® pink, Germany) برای گروه ۳ با خمیر خوراک مخلوط و در دستگاه مخلوط کن الکتریکی بصورت کاملاً همگن در آمد. این خوراک با استفاده از چرخ گوشت بصورت پلت‌هایی با اندازه مناسب درآورده شد و بعد از ۱ ساعت قرار دادن در هود ۴۰^{o}C، تا زمان مصرف به فریزر ۲۰^{o}C- منتقل گردید (۲۶). ماهی‌ها با خوراک در نظر گرفته شده برای هر تیمار بصورت روزانه با ۳٪ وزن زنده و در دو نوبت به مدت دو ماه تغذیه گردیدند.

اندازه گیر بتاکاروتن: برای اندازه گیری بتاکاروتن از روش توصیه شده توسط Suzuki و همکاران در سال ۱۹۹۰ استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۱g نمونه پوست توسط ۱۰mL اتیل الکل به صورت کاملاً هموژن در آمده و سپس مخلوط حاصل، اتیل الکل ۹۵٪ و ان هگزان به ترتیب به نسبت ۳ به ۱ به ۱ با هم مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریوفوژ گردید سپس جذب نوری مایع بالایی طول موج ۴۵۳nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. میزان بتاکاروتن از طریق فرمول زیر بدست آمد.

۰/۰۰۲۵۸ / میزان جذب در ۴۵۳nm = (mg/dl) میزان بتاکاروتن

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی: برای این منظور ابتدا ۵g عضله را توسط محلول ۱۰٪TCA (trichloroacetic acid) کاملاً هموژن کرده و حجم نهایی را به ۱۰۰mL رساندیم. سپس سوسپانسیون حاصل را از فیلتر نیتروسلولزی عبور داده و ۳mL از مایع فیلتر شده را با ۳ mL محلول ۰/۰۲mol/L TBA (acid) thiobarbituric مولار مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در ۹۰^{o} انکوبه و میزان جذب نوری در ۵۳۲nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. میزان MDA (Malondialdehyde) از طریق نمودار استاندارد که بر اساس جذب نوری غلظت‌های مختلف MDA رسم شد، محاسبه گردید.

MDA (mg/kg) = ۰/۳۵۵ × ۵۳۲nm میزان جذب در + ۰/۰۰۷

تهیه عکس دیجیتال در شرایط یکسان: در انتهای دوره از ۵ ماهی در هر تیمار پس از بیهوش نمودن ماهی توسط ماده بیهوشی MS222 با دوز ۱۰۰mg/L، عکس دیجیتال گرفته شد. به این منظور یک جعبه کاملا تاریک به ابعاد ۳۰Cm × ۴۰ × ۳۰ تدارک دیده شد و با دو لامپ ۴۰W نور یکسانی در حد ۵۰۰۱ x در داخل محفظه ایجاد گردید و با دوربین دیجیتال Canon مدل SD210 و با رعایت فاصله نمونه از دوربین از همه نمونه‌ها عکس دیجیتال تهیه گردید. برای بررسی کمی رنگ پوست ماهی بین تیمارها از روش توصیه شده توسط yam و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده گردید. این روش مبتنی بر پردازش تصویر گرفته شده با دوربین دیجیتال با میزان نور و شرایط کاملاً مشابه با استفاده از نرم افزار Photoshop Adobe و نیز نرم افزار visual Color picker 2.6 می‌باشد.

اندازه گیری شاخص‌های رنگ پوست: شاخص‌های رنگ در دو ناحیه که شامل: ناحیه‌ی تنه (A)، باله‌ها (B) بود، مورد بررسی قرار گرفت. مناطق در نظر گرفته شده برای بررسی شاخص‌های رنگ بر اساس منابع موجود و از نقاط مشترک در بین تمام ماهی‌ها انتخاب گردید. آنالیز عکس گرفته شده توسط نرم افزار Adobe Photoshop CS5 انجام گردید. این نرم افزار رنگ را بر اساس سه شاخص کمی و به صورت سه محور بیان می‌نماید که شامل مقادیر *L (۰=روشنایی و ۱۰۰= تیرگی)، *a (مقادیر مثبت معادل رنگ قرمز و مقادیر منفی معادل رنگ سبز) و *b (مقادیر مثبت معادل رنگ زرد و مقادیر منفی معادل رنگ آبی) می‌باشند (۸). مزیت این سیستم رنگ CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) در این است که ترتیب آن تقریباً با فضای سه بعدی رنگ که اجزای آن بر اساس درک بصری رنگ نهاده شده، یکسان می‌باشد (۳۵). میزان کروما (بیان کننده شفافیت و کدورت رنگ است، مقادیر بیشتر نشان دهنده شفافیت بیشتر است) از طریق فرمول $C_{ab}=(a^{*2}+b^{*2})^{0.5}$ و میزان زاویه Hue (شاخص خلوص رنگ است و به چگونگی درک و مشاهده رنگ یک شی اشاره دارد (آبی، سبز، زرد، نارنجی، قرمز و غیره) از طریق نرم افزار (2.6 visual Color picker) اندازه‌گیری گردید.

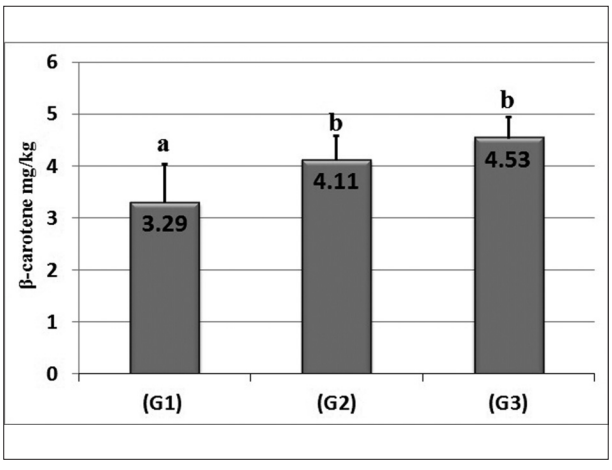
آنالیز داده‌ها: از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. از تست آنوای یک طرفه و تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین هر تیمار در هر آزمایش با بقیه تیمارها استفاده گردید.

نتایج

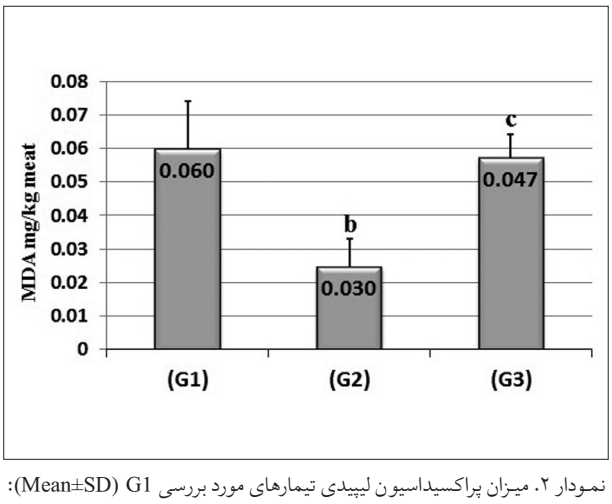
بررسی میزان بتا کاروتن: نتایج مربوط به میزان بتا کاروتن پوست تیمارهای مورد بررسی در نمودار ۱ آورده شده است. میزان بتاکاروتن در تیمارهای آستاگزانتین (G3) و دونالیلا (G2) نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵) و بیشترین میزان بتاکاروتن مربوط به تیمار G3 و برابر (۴/۵۳±۰/۴۱ mg/kg) بود.

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی: نتایج مربوط به میزان پراکسیداسیون لیپیدی در نمودار ۲ آورده شده است. تیمار G2 اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار G1 و G3 را نشان داد (p<۰/۰۵)، همچنین تیمار G3 تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار G1 داشت (p<۰/۰۵). بیشترین و کمترین میزان پراکسیداسیون لیپیدی به ترتب در تیمار G1 و G2 و برابر با (۰/۰۶۰±۰/۰۱۳mg/L) و (۰/۰۳۰±۰/۰۰۶ mg/L) بود.

ناحیه تنه: طبق جدول ۱ شاخص‌های رنگ در ناحیه تنه تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها را نشان نداد (p>۰/۰۵). میزان عددی فاکتور *a در بین تیمارهای تغذیه شده با خوراک حاوی کاروتنوئید نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت و بیشترین افزایش در تیمار G3 (۵/۸۴±۴/۰۷) بود همچنین مقدار Hue نیز در تیمار G3 کمتر از سایر تیمارها بود (۳۷/۶۱±۵/۶۱). سایر شاخص‌ها کاهش یا افزایش محسوسی را نشان



نمودار ۱. میزان بتاکاروتن تیمارهای مورد بررسی G1 (Mean±SD): شاهد، G2: ماهیان تغذیه‌شده با خوراک حاوی دونالیلا به میزان ۲۰۰ mg/kg، G3: ماهیان تغذیه‌شده با خوراک حاوی آستاگزانتین به میزان ۲۰۰ mg/kg. حروف غیر همنام لاتین نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد.



نمودار ۲. میزان پراکسیداسیون لیپیدی تیمارهای مورد بررسی G1 (Mean±SD): شاهد، G2: ماهیان تغذیه شده با خوراک حاوی دونالیلا به میزان ۲۰۰ mg/kg، G3: ماهیان تغذیه‌شده با خوراک حاوی آستاگزانتین به میزان ۲۰۰ mg/kg. حروف غیر همنام لاتین نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد.

ندادند.

ناحیه‌ی باله‌ها: طبق جدول ۲ میزان شاخص *a در تیمار G2 افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار G3 و G1 داشت (p<۰/۰۵)، همچنین تیمار G3 افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار G1 داشت (p<۰/۰۵)، بیشترین و کمترین میزان شاخص *a به ترتیب در تیمار G3 و G1 برابر (۱۴/۳۴±۵/۶۵) و (۱/۱۴±۳/۰۸) بود. مقدار شاخص Hue در تیمار G2 کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار G3 و G1 داشت (p<۰/۰۵)، همچنین تیمار G3 کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار G1 داشت (p<۰/۰۵). بیشترین و کمترین میزان شاخص Hue نیز در تیمار G1 و G3 و برابر (۵۰/۲۴±۵/۲۰) و (۳۴/۸۳±۴/۵۲) بود. میزان شاخص *b نیز در تیمارهای G2 و G3 کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار G1 را نشان داد (p<۰/۰۵)، شاخص Chroma در تیمار G3 افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار G1 و G2

تصویر ۱. مقایسه تغییر رنگ در تیمارهای تغذیه شده با خوراک معمولی (G1)، خوراک غنی شده با دونالیلا (G2) و تغذیه شده با خوراک حاوی آستاگزانتین .(G3)

را نشان داد (p<۰/۰۵) و بیشترین میزان کاهش در تیمار G2 (۴۰/۴۱±۴/۷۸) بود. در مورد شاخص *L تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

بحث

استفاده از منابع طبیعی و سنتتیک کاروتنوئیدها به منظور تأثیر روی رشد، ایمنی و رنگ ماهی، اخیراً بیشتر مورد توجه محققین واقع شده است (۱۹). آستاگزانتین که یک بتاکاروتن سنتتیک می‌باشد به میزان زیاد در آبزی پروری استفاده می‌شود ولی به علت قیمت بسیار بالا، تلاش برای معرفی جایگزین‌های مناسب هدف بسیاری از تحقیقات واقع شده است (۱۹،۴۲). نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز خوراکی آستاگزانتین و دونالیلاسالینا (که یکی از منابع طبیعی بتاکاروتن می‌باشد) باعث افزایش معنی‌دار میزان بتاکاروتن پوست نسبت به تیمار شاهد می‌گردند (p<۰/۰۵). البته تفاوت معنی داری بین میزان بتاکاروتن دو تیمار تغذیه شده با آستاگزانتین و دونالیلا مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). به دلیل عدم توانایی ماهی‌ها در سنتز کامل بتاکاروتن‌های مورد نیاز خود (۱۴،۱۵) افزودن این ماده به جیره ماهی‌ها برای جبران کمبود کاروتنوئیدها معمول می‌باشد. در بسیاری از تحقیقات مشابه گزارش شده است که آستاگزانتین که یک بتاکاروتن صناعی است باعث افزایش بتاکاروتن پوست می‌گردد که این اثر بطور معنی داری بیشتر از منابع طبیعی بتاکاروتن می‌باشد (۴۲). در تحقیقات مشابه در ماهی سیم طلایی رنگدانه‌های آستاگزانتین، کانتازانتین و رنگدانه‌های حاصل از مواد طبیعی باعث افزایش نسبی میزان کاروتنوئیدهای پوست و عضله گردیده‌اند (۷،۲۴).

میزان پراکسیداسیون لیپیدی در تیمارهای تغذیه شده با خوراک حاوی دونالیلا و آستاگزانتین (G2 و G3) نسبت به تیمار شاهد (G1) کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، جالب‌تر اینکه پراکسیداسیون لیپیدی در تیمار تغذیه شده با دونالیلا (G2) نسبت به آستاگزانتین (G3) کاهش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵). هیدرولیز چربی‌ها به وسیله لیپازها و فسفولیپازها القا می‌شود و اسید چرب آزاد شده تحت تأثیر پراکسیداسیون، ترکیباتی با وزن مولکولی کم تولید می‌کند (۴۳) این فرایند با حضور رادیکال‌های آزاد همراه است و به تولید آلدئیدهایی مانند مالون دی آلدئید منجر می‌شود که مسئول پیشرفت فساد و ایجاد طعم و بوی بد و تغییر در رنگ گوشت می‌شود (۱۶،۲۲). کاروتنوئیدهای موجود در سلول‌ها رادیکال‌های آزاد را در محل اولیه‌ی تحریک سرکوب می‌کنند و به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌نمایند (۳۰). کاروتنوئیدها به عنوان عوامل محافظت کننده در برابر پراکسیداسیون در اثر نور نیز عمل می‌کنند (۲۹). افزایش سطح کاروتنوئید بافت باعث افزایش شبکه آنتی اکسیداسیون و در نتیجه کاهش خطرات استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۲،۳۲،۳۳). همچنین بتاکاروتن باعث کاهش حساسیت کبد به پرواکسید شدن چربی‌ها می‌شود و توانایی حفاظتی کبد را بالا برده و مانع از آسیب رسیدن به غشاء سلول‌ها می‌شود (۳۱). هرچند گزارش شده است که آستاگزانتین پتانسیل آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر کاروتنوئیدها مانند لوتئین، زازانتین، کانتازانتین و بتا کاروتن دارد (۳۱،۳۲)، ولی در تحقیق جاری اثرات آنتی اکسیدانی دونالیلا بیشتر از آستاگزانتین بود که می‌توان علت را به حضور احتمالی سایر آنتی اکسیدان‌های طبیعی در جلبک

جدول ۱. شاخص‌های رنگ ناحیه‌ی تنه (Mean±SD) حروف غیر همنام در هر ستون نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد. G1: شاهد، G2: 200 mg/kg دونالیلا، G3: ۲۰۰ mg/kg آستاگزانتین.

	L*	a*	b*	Hue	Chroma
G1	۵۶/۴۵±۲/۶۱ a	۳/۲۲±۲/۲۹ a	۲۹/۵۰±۲/۶۷ a	۴۳/۳۲±۴/۰۲ a	۲۹/۷۷±۲/۵۳ a
G2	۵۵/۲۳±۳/۲۷ a	۵/۴۵±۳/۳۹ a	۲۸/۶۸±۴/۶۹ a	۳۹/۴۲±۷/۵۵ a	۲۹/۴۶±۴/۰۴ a
G3	۵۷/۴۷±۳/۰۰ a	۵/۸۴±۴/۰۷ a	۳۱/۶۸±۴/۹۳ a	۳۷/۶۱±۵/۶۱ a	۳۲/۵۱±۴/۵۳ a

جدول ۲. بررسی شاخص‌های رنگ ناحیه‌ی باله‌ها (Mean±SD) حروف غیر همنام در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بین گروه‌ها می‌باشد. G1: شاهد، G2: ۲۰۰ mg/kg دونالیلا، G3: ۲۰۰ mg/kg آستاگزانتین.

	L*	a*	b*	Hue	Chroma
G1	۵۵/۷۴±۲/۴۷ a	۱/۱۴±۳/۰۸ a	۴۳/۲۱±۲/۳۴ a	۵۰/۲۴±۵/۲۰ a	۴۳/۴۷±۲/۲۵ a
G2	۵۳/۷۹±۲/۳۲ a	۶/۵۵±۴/۰۹ b	۳۹/۴۴±۲/۸۸ b	۴۱/۲۰±۴/۷۸ b	۴۰/۴۱±۲/۶۱ a
G3	۵۳/۳۳±۴/۰۹ a	۱۴/۳۴±۵/۶۵ c	۴۱/۱۵±۴/۱۱ b	۳۴/۸۳±۴/۵۲ c	۴۵/۳۴±۶/۰۶ b

دونالیلا مثل ویتامین C و E نسبت داد. ویتامین E از ترکیبات کلیدی در سیستم آنتی اکسیدانی است که پراکسیدسیون چربی‌ها را کاهش می‌دهد (۲۷،۳۸). ویتامین E رادیکال‌های پراکسید اسیدهای چرب را به هیدرو پروکسیدهای کم خطرتری تبدیل می‌کند لذا پراکسیداسیون چربی‌ها را کاهش می‌دهد(۱). ویتامین C نیز علاوه بر دارا بودن نقش آنتی اکسیداسیون دارای یک اثر سینرژیسم با ویتامین E نیز می‌باشد (۴۰).

رنگ ماهی در صنعت آبزی پروری ارزش بالایی در بازار پسندی، ارزش اقتصادی و طعم ماهی دارد (۳۶). کاروتنوئیدها در پوست در قسمت زانتوفورها تجمع می‌یابند (۱۴). میزان توسعه‌ی رنگ به مقدار و نوع کاروتنوئید به کار برده شده بستگی دارد (۶). میزان شاخص *a در تیمارهای تغذیه شده با کاروتنوئید (G2 و G3) نسبت به تیمار شاهد (G1) افزایش داشت این افزایش گویای متمایل شدن رنگ بدن و باله‌ها به سمت طیف‌های قرمز می‌باشد، همچنین کاهش میزان Hue در این تیمارها نیز این تغییر در رنگ ماهی را نشان می‌دهد، که این تغییر رنگ ناشی از تجمع کاروتنوئیدها در پوست می‌باشد. شاخص *b در تیمار شاهد (G1) نسبت به دو تیمار دیگر افزایش نسبی داشته که نشان می‌دهد رنگ ماهی‌ها در این تیمار نسبت به دو تیمار دیگر زردتر است. میزان کروما نشان می‌دهد که شفافیت رنگ زرد در تیمار شاهد (G1) نسبت به دو تیمار دیگر بیشتر است همچنین در تیمار آستاگزانتین (G3) میزان شفافیت و وضوح رنگ قرمز نسبت به دونالیلا (G2) بیشتر می‌باشد. Yasir و Qin در سال ۲۰۱۰ به بررسی اثر تغذیه با انواع کاروتنوئیدها (آستاگزانتین، بتاکاروتن، کانتازانتین، زاگزانتین) و تأثیر آنها بر رنگ پوست و میزان رنگدانه‌های فلس دلقک ماهیان *Amphiprion ocellaris*، *Amphiprion cuvier* پرداختند و به این نتیجه رسیدند که خوراک آستاگزانتین بیشترین تأثیر را در افزایش رنگ قرمز پوست داشته است. Kop و Durmaz در سال ۲۰۰۸ تغییر رنگ ایجاد شده در پوست ماهی سیکلید تحت تأثیر رنگدانه‌های طبیعی مانند جلبک قرمز تک سلولی *P.cruentum* و آستاگزانتین را مقایسه نمودند و افزایش رنگ قرمز پوست در هر دو حالت را گزارش نمودند. در تحقیق مشابه‌ای که Mashalchi و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند میزان شاخص‌های رنگ در ماهی اسکار تغذیه شده با آستاگزانتین بهبود یافت. همچنین تغذیه ماهی *pagrus* *Pagrus* توسط غذای حاوی بتاکاروتن باعث افزایش میزان شاخص *a شد ولی میزان شاخص *L تغییری نکرد (۲۱). سیم قرمز و سرخو استرالیایی شدیداً تحت تأثیر آستاگزانتین واقع شده و رنگ پوست و عضله آنها به رنگ قرمز می‌گراید (۷،۲۴). اثر جلبک دونالیلا روی رنگ پوست و گوشت ماهی بررسی و نتیجه این آزمایش نشان داد که بتاکاروتن، باعث افزایش رنگدانه در پوست و گوشت ماهی می‌گردد (۴۴).

طبق این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که جلبک دونالیلا سالیناکه بومی دریاچه ارومیه می‌باشد و تولید بایومس آن نسبتاً ساده و امکان پذیر است، دارای اثرات قابل رقابت از نظر افزایش بتاکاروتن پوست، کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها و ایجاد رنگ متمایل به قرمز با آستاگزانتین داشته و با توجه به قیمت بسیار بالای آستاگزانتین، در صورت تولید صنعتی دونالیلا در سطح بالا امکان جایگزینی آستالگزانتین با پودر این جلبک وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و از محل پژوهانه‌ی نگارندگان به انجام رسید.

References

1. Ajuyah, A.O., Ahn, D.U., Hardi, R.T., Sim, J.S. (1993) Dietary antioxidants and storage affect chemical characteristics of omega-3 fatty acids enriched broiler chicken meats. J Food Sci. 58: 43-46.
2. Baker, R.T.M., Pfeiffer, A.M., Schöner, F.J., Smith-Lemmon, L. (2002) Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared *Atlantic salmon*, (Salmo salar). Anim Feed Sci Technol. 99: 97-106.
3. Ben-Amotz, A. (1987) Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition on *Dunaliella bardawil* (Volvocales, chlorophyta). J Plant Physiol. 131: 479-487.
4. Ben-Amotz, A., Avron, M. (1983) On the factors

which determine massive β-carotene accumulaio in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. plant physiol. 72: 593-597.

5. Ben-Amotz, A., Shaish, A. (1992) Biosynthesis β-carotene. In: Dunaliella Physiology, Biochemistry and Biotechnology. Avron, M., Ben-Amotz, A. (eds.). CRC Press, Boca Raton. Florida, USA. p. 205-216.
6. Boonyaratpalin, M., Unprasert, N. (1989) Effect of pigments from different sources on colour changes and growth of red *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 79: 375-380.
7. Booth, M., Warner-Smith, R., Allan, G., Glencross, B. (2004) Effect of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (BlochN and Schneider, (1801). Aquac Res. 35: 458-464.
8. CIE, commission international de I Eclairage. (1976) Colorimetry, publication no 15. Bureau central de LaCIE, Vienna, Austria. 14pp.
9. Cowan, A.K., Rose, P.P., Horne, L.G. (1992) *Dunaliella salina* -A model system for the studying the response of plant cells to stress .J Exp Bot. 43: 1535-1547.
10. Diler, I., Dilek, K. (2002) Significance of pigmentation and use in aquaculture. J Fish Aquat Sci. 2: 97-99.
11. Doolan, B.J., Allan, G.L., Booth, M.A., Jones, P.L. (2008) Effects of cage netting colour and density on the skin pigmentation and stress response of *Australian snapper* (*Pagrus auratus*). Aquac Res. 39: 1360-1368
12. Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. (1997) The carotenoid as antioxidants a Review. J Photochem Photobiol. 5: 189-200.
13. Giordano, M., Pezzoni, V., Hell, R. (2000) Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alge *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 124: 857-864.
14. Goodwin, T.W. (1984) The Biochemistery of Carotenoids, Animals, (2nd eds.) Chapman & Hall, London, UK.
15. Gourveia, L., Rema, P., Pereira, O.B., Empis, J.C. (2003) Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquac Nutr. 9: 123-129.
16. Guillen, M.D., Cabo, N. (1997) Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. J Sci Food Agric. 75: 1-11.
17. Hejazi, M.A., Barzegari, A., Gharajeh, N.H., Hejazi, M.S. (2010) Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga Dunaliella, Saline. Salin Syst. 6: 1-12.
18. Hosseini Tafreshi, A., Shariati, M. (2009) Dunaliella biotechnology: methods and applications. J Appl Microbiol. 107: 14-35.
19. Ingle de la Mora, G., Arredondo-Figueroa, J.L., Ponce-Palafox, J.T., delos Angeles Barriga-Sosa, I., Vernon-Carter, J.E. (2006) Comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation. Aquaculture. 258: 487-495.
20. Kalinowski, C.T., Robaina L.E., Fernandez-palacios H., Schuchardt, D., Izquierdo, M.S. (2005) Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. Aquaculture. 244: 223-231.
21. Kalinowski, C.T., Izquierdo, M.S., Schuchardt, D., Robaina, L.E. (2007) Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. Aquaculture. 272: 451-457.
22. Kop, A., Durmaz, Y. (2008) The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). Aquaculture. 16: 117-122.
23. Lorenz, T.R. (1998) A Review of Astaxanthin as a Carotenoid and Vitamin Source for Sea Bream, vol 052. (1st ed.) Naturerose Technical Bulletin, Cyanotechnology, Hawaii, USA.
24. Lowe-McConnell, R.H. (1969) The cichlid fishes of Guyana, South America, with notes on their ecology and breeding behavior. Zool J Linn Soc. 48: 255-302.
25. Mashalchi, M., Alishahi, M., javahery, M., Hejazi,

M.A. (2010) Comparison between the effects of Astaxanthin and *Dunaliella salina* on coloration and immune respons of Astronorus ocellatus. Mar Biol. 2: 75-83.

26. Meluzzi, A., Sirri, F., Manfreda, G., Tallarico, N., Franchini, A. (2000) Effect of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. Poult Sci. 79: 539-545.
27. Merigoux, S., Ponton, D., De Merona, B. (1998) Fish richness and species-habitat relationships in two coastal streams of French Guiana, South American. Environ Biol Fish. 51: 25-39
28. Miki, W. (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. Pure Appl Chem. 63: 141-146.
29. Nakagawa, K., Fujimoto, K., Miyazawa, T. (1996) β-Carotene as a high potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice. Biochim Biophys Acta. 1299: 110-116.
30. Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., Takeuchi, M. (1999) Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 1426: 119-125.
31. Packer, L. (1994) Vitamin E is Nature's master Anti-oxidant. Sci Am, Science and Medicine. 1: 54-63.
32. Packer, L., Coleman, C. (1999) The Antioxidant Miracle. (1st ed.) John Wiley and Sons Inc. New York, USA.
33. Qureshi, M.A., Ali, R.A. (1996) Spirulina platensis exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. Immunopharmacol Immunotoxicol. 18: 457-463.
34. Salehy, A.A., Ghasemy, A., Tehrany rad, A. (2007) Effect of polymerizations on the color of composites. J Dent Sch GYEAR. 25: 249-243.
35. Shahidi, F., Metusalach, A., Brown, J.A., (1998) Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. Crit Rev Food Sci Nutr. 38: 1-67.
36. Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M., Borowitzka, L. (2005) Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 248: 207-216.
37. Surai, P.F. (2000) Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. Br Poult Sci. 41: 235-243.
38. Suzuki, J., Katoh, N. (1990) A simple and cheap method for measuring serum vitamin a in cattle using only a spectrophotometer. Vet Sci. 52: 1281-1283.
39. Takahisa, D., Graham, W., Burton and Keith, U. (1985) Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. the of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholi[id liposomes. Biochimica et. biophysica actu. 835: 298-303.
40. Tim, J., Bowden, T.J., Thompson, A.L., Nikoskelainen, S. (2007) Seasonal variation and immune response: A fish perspective. Fish Shellfish Immunol. 22: 695-706.
41. Torrissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K.D. (1989) Pigmentation of salmonids carotenoid depositin and metabolism. Rev Aquat Sci. 1: 209-225.
42. Toyomizu, M., Hanaoka, K., Yamaguchi, K. (1981) Effect of release of free fatty acids by enzymatic hydrolysis of phospholipids on lipid oxidation of fish muscle during storage at -05°C. Bull Jpn Soc Sci Fish. 47: 605-610.
43. Wang Y.J, Huchien, Y., Hugpan, C. (2006) Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation and antioxidant capacity of characins, (*Hyphessobry callistus*). Aquaculture 261: 641-648.
44. Yam, K.A., Papadakis, S.E. (2004) A Simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. J Food Eng. 61: 137-142.

Comparison of the effect of Astaxanthin and *Dunaliella salina* algae on skin carotenoid, lipid peroxidation and coloration of *Heros severus*

Alishahi, M.[1*], Karamifar, M.[2], Mesbah, M.[1], Zarei. M.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran*

[2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran*

[3]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran*

(Received 26 August 2013 , Accepted 20 November 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Microalgae *Dunaliella salina* is a national source of carotenoids which can be used in aquaculture, meanwhile synthetic Astaxanthin is very expensive for use in aquaculture and several attempts have been made to find alternatives for Astaxanthin. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is to investigate the effect of oral administration of Astaxanthin and *D.salina* on skin carotenoid level, skin and fins coloration as well as lipid peroxidation of muscles in *H.severus*. **METHODS:** One hundred and thirty five *H.severus* weighing 27±0.5g were randomly divided to three groups in triplicate: Groups 1 (G1) was fed with basal diet, group 2 (G2) and group 3 (G3) were fed with basal diet supplemented with 200 mg kg-1 *D.salina* or Astaxanthin respectively. After 6 weeks, digital photo were taken from 15 fishes of each group and skin and muscles samples were taken after euthanasia. Skin beta carotene rate, lipid peroxidation of muscle (based on Malondialdehyde activity) as well as skin and fins coloration pattern (a*, b*, Hue, L* and Chroma) were compared among groups. **RESULTS:** Skin beta-carotene rate significantly increased in G2 and G3 compare to G1 but, Lipid peroxidation rate were decreased in G2 and G3 compare to control ($p<0.05$). Although some improvement in color quality were observed in trunk area, there was no significant difference in color indicators among the groups ($p>0.05$). In the fin areas a* value significantly increased in G2 and G3 compare to control also Hue and b* value significantly decreased in G2 and G3 compare to control ($p<0.05$). Chroma significantly increased in G3 compared with other ($p<0.05$). No significant difference were observed in L* between the groups ($p>0.05$). **CONCLUSIONS:** Although the effect of Astaxanthin on skin carotenoid level and skin and fins coloration was better compared with *D. salina*. However, because of reasonable price, wide availability and the production of *Dunaliella salina*, it can be used as an alternative for Astaxanthin.

Key words: Astaxanthin, beta carotene, *Dunaliella salina*, *Heros serverus*

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Beta carotene rate in experimental treatments (Mean±SD). G1: Control groups. G2: Treatment fed with food containing 200 mg/kg *Dunaliella salina*. G3: Treatment fed with food containing 200 mg/kg Astaxanthin. Significant differences ($p<0.05$) are marked by different letters.

Graph 2. Lipid peroxidation rate in experimental treatments (Mean±SD). G1: Control groups. G2: Treatment fed with food containing 200 mg/kg *Dunaliella salina*. G3: Treatment fed with food containing 200 mg/kg Astaxanthin. Significant differences ($p<0.05$) are marked by different letters.

Figure 1. Comparison of coloration of three experimental groups. G1:Control, G2: sfish fed with food supplemented with 200mg/kg *Dunaliella salina*, G3: fish fed with food supplemented with 200mg/kg Astazantin.

Table 1. Colure indexes of trunk (Mean±SD). G1: Control groups. G2: Treatment fed with food containing 200 mg/kg *Dunaliella salina*. G3: Treatment fed with food containing 200 mg/kg Astaxanthin. Significant differences ($p<0.05$) are marked by different letters.

Table 2. Colure indexes of fins (Mean±SD). G1: Control groups. G2: Treatment fed with food containing 200 mg/kg *Dunaliella salina*. G3: Treatment fed with food containing 200 mg/kg Astaxanthin. Significant differences ($p<0.05$) are marked by different letters.

***Corresponding author's email: alishahimoj@gmail.com, Tel: 0611-3738385, Fax: 0611-3360807**