

## تأثیر سطوح مختلف آستاگزانتین مصنوعی و جلبکی (*Haematococcus pluvialis*) بر ذخیره آستاگزانتین تخم مولدین قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مرتضی علیزاده<sup>۱\*</sup>، راضیه انصاری<sup>۲</sup>، شهرام دادگر<sup>۳</sup>، محمود حافظیه<sup>۳</sup>

\*m\_alizadeh47@yahoo.com

- ۱- مرکز تحقیقات آبزیان آبهای شور، موسسه علوم تحقیقات شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بافق، ایران  
۲- مزرعه قزل ماهی نگین، یاسوج، ایران  
۳- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۴

### چکیده

در این تحقیق، ذخیره آستاگزانتین موجود در تخم مولدین قزل آلائی رنگین کمان از طریق افزودن سطوح مختلف آستاگزانتین با دو منبع مصنوعی و جلبکی (*Haematococcus pluvialis*) به جیره غذایی مولدین مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، آستاگزانتین مصنوعی در سه سطح ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم غذا و آستاگزانتین جلبکی با غلظت ۱/۵٪ آستاگزانتین در وزن خشک، هم سطح با منبع مصنوعی بترتیب به مقدار ۲/۶۷، ۵/۳۳ و ۸ گرم بر کیلوگرم غذا مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب هفت جیره آزمایشی شامل شش تیمار سطوح و منابع مختلف آستاگزانتین (T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub> مربوط به گروه آستاگزانتین جلبکی و T<sub>4</sub>-T<sub>6</sub> مربوط به گروه آستاگزانتین مصنوعی) و یک تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) در نظر گرفته شد. تعداد ۱۴۰ مولد ۳-۴ ساله قزل آلا به مدت ۱۲۰ روز قبل از شروع فصل تخم ریزی، از طریق جیره های آزمایشی از نیمه مرداد تا نیمه آذر ۱۳۸۷ به مدت ۱۲۰ روز تغذیه شدند. تخمهای استحصالی از مولدین از نظر محتوی آستاگزانتین مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. بیشترین مقدار آستاگزانتین (۲۳۱/۸۷ng) مربوط به تیمار ۳ (۱۲۰٪ آستاگزانتین جلبکی) و کمترین مقدار (۶/۹۶ ng) در تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) به دست آمد. مقادیر میانگین تیمارها دارای اختلاف معنی داری بود ضمن آنکه تیمار ۳ با بالاترین مقدار آستاگزانتین در تخم، با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت. تفاوت معنی داری بین تیمارهای ۴، ۵ و ۶ (تیمارهای حاوی آستاگزانتین مصنوعی) با تیمار یک (۴۰٪ آستاگزانتین جلبکی) مشاهده نگردید. تیمارهای ۲ (۸۰٪ آستاگزانتین جلبکی) و ۶ (۱۲۰٪ آستاگزانتین مصنوعی) از لحاظ تاثیر در جذب آستاگزانتین در تخم، عملکرد یکسانی داشتند. در مجموع، تمام تیمارهای حاوی آستاگزانتین جلبکی و مصنوعی با تیمار شاهد اختلاف معنی داری داشتند. ارتباط میان افزایش غلظت آستاگزانتین خوراک و افزایش مقدار آستاگزانتین تخم در تیمارهای حاوی مقادیر مختلف آستاگزانتین جلبکی بصورت خطی مثبت بود در حالیکه در مورد تیمارهای آستاگزانتین مصنوعی این ارتباط روند منظمی نداشت.

**کلمات کلیدی:** قزل آلائی رنگین کمان، آستاگزانتین مصنوعی، جلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*)، ذخیره آستاگزانتین تخم

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

تاکنون نزدیک به ۶۰۰ نوع کاروتنوئید طبیعی شناسایی شده است. مهمترین جنبه کاروتنوئیدها از نقطه نظر پرورش دهندگان ماهی و سازندگان خوراک، کارایی رنگدانه ای شدن بافت است. این ویژگی به واسطه ساختار، رنگ ویژه، قابلیت هضم، تغییر و تبدیلات متابولیکی و میل ترکیبی ویژه آنها نسبت به یک بافت بخصوص، تعیین می شود (علیزاده، ۱۳۸۶).

هرچند انواع مختلفی از گیاهان، باکتری ها و مخمرها به عنوان سازندگان آستاگزانتین شناخته شده اند (Johnson & Schoeder, 1996)، اما گونه *Haematococcus pluvialis* به عنوان غنی ترین منبع آستاگزانتین در طبیعت شناخته شده (Guerin et al., 2003) و بالاترین قابلیت را نسبت به سایر منابع در خصوص ساخت و تجمع آستاگزانتین دارا می باشد (Boussiba et al., 1999)؛ همین دلیل برای تولید تجاری این رنگدانه از جلبک هماتوکوکوس استفاده می شود (Olaizola, 2000). پتانسیل تجاری استفاده از هماتوکوکوس به عنوان منبع آستاگزانتین مورد بررسی قرار گرفته و با توجه به هزینه بالای تولید آستاگزانتین مصنوعی و به صرفه بودن تولید هماتوکوکوس و پیشرفت فناوری کشت و فراوری آن تا رسیدن به غلظت ۳-۱/۵ درصد آستاگزانتین در واحد وزن خشک، این محصول را برای ورود به عرصه رقابت تجاری آماده کرده است، بطوریکه این ریزجلبک پتانسیل کاربرد به عنوان منبع رنگدانه در آبی پروری، پرورش طیور و بازار جهانی مکمل های غذایی دارد (Lorenz & Cysewski, 2000).

آستاگزانتین را می توان به صورت طبیعی و مصنوعی در آبی پروری استفاده کرد، اما نوع مصنوعی آن حاوی ترکیبات کاروتنوئیدی غیر طبیعی است و به اندازه نوع طبیعی کارآمد نمی باشد (Gong & Chen, 1997; Johnson & An, 1991) از منابع آستاگزانتین طبیعی نیز در جیره های آبزیان پرورشی در حال گسترش است. یکی از دلایلی که آستاگزانتین طبیعی کارایی بهتری نسبت به آستاگزانتین

مصنوعی دارد به علت اتصال اسیدهای چربی است که در انتهای ملکول آنها قرار گرفته است. این شکل استری شده آستاگزانتین از جذب بهتری در اعضای مختلف بدن حیوانات برخوردار است (Ranga Rao et al., 2014). در یک بررسی بر روی میگو مشخص شد که آستاگزانتین طبیعی به مراتب کارایی بالاتری نسبت به آستاگزانتین مصنوعی به همراه دارد که به علت شکل استری آستاگزانتین نسبت به آستاگزانتین آزاد می باشد و راحت تر توسط اعضای مختلف ارگانسیم مورد بهره برداری قرار می گیرد (Darachai et al., 1999). بررسی های ORAC در Brunswick آلمان نیز نشان داده است که آستاگزانتین طبیعی از لحاظ خواص آنتی اکسیدانی ۱۴ برابر قوی تر از آستاگزانتین مصنوعی آن می باشد (Capelli et al., 2013). آستاگزانتین حاصل از *H. pluvialis* در تغذیه آزاد ماهیان و میگو به عنوان منبعی از رنگدانه استفاده می شود (Roche, 1987; Higuera-Ciapara et al., 2006).

ماهیها انرژی بسیار زیادی را در چرخه تولید مثلی خود مصرف می کنند و در این میان آزاد ماهیان به عنوان ماهیان رود کوچ در هنگام مهاجرت تخم ریزی بیشترین انرژی را مصرف می کنند. ماهیان آزاد به طور نسبی دارای تعداد تخم کم و دارای دوره رشد و نمو جنینی طولانی تری نسبت به سایر گونه ها می باشند. بنابراین تولید تخم هایی با نرخ لقاح بالاتر برای آزاد ماهیان بسیار مهم می باشد و به همین دلیل به دست آوردن تخم هایی با کیفیت مطلوب در قزل آلی رنگین کمان به منظور حصول تولید مثلی موفق و همچنین موفقیت در دستیابی به کمیت و کیفیت ماهیان نسل بعد به دلیل همآوری کمتر خانواده آزاد ماهیان نسبت به ماهیان دیگر، دارای اهمیت بالایی می باشد (Christiansen & Torrissen, 1997).

در گونه های مختلف ماهیان، تخم های بزرگ تر نیاز به مقادیر بالاتری از رنگدانه های کاروتنوئیدی برای فعالیت های متابولیک طی مراحل جنینی دارند و همبستگی بین زمان نمو جنینی با مقدار غلظت کاروتنوئید در تخم هر گونه وجود دارد (Mikulin, 2003). بنابراین، مدیریت تغذیه مولدین در تکثیر آنها دارای اهمیت بالایی می باشد.

به محیط‌های پرورشی بودند (Salze *et al.*, 2005). بنابراین، منابع غذایی طبیعی به عنوان منابع کاروتنوئیدی در امر پرورش آبزیان تاثیر بسزایی دارند. هرچند تاکنون در خصوص منابع و سطوح بهینه آستاگزانتین تحقیقات کاربردی زیادی صورت گرفته و مصرف آن نیز با هدف بهبود رنگ ظاهری لاشه افزایش یافته است، ولی اطلاعات قابل توجه و دقیقی در مورد استفاده از این رنگدانه جهت ارتقاء سطح آستاگزانتین تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور در دسترس نیست. با توجه به گسترش مصرف آستاگزانتین مصنوعی در مزارع تکثیر و پرورش قزل‌آلای کشور و از سویی، اهمیت جلبک سبز هماتوکوکوس که ضمن غنی بودن از آستاگزانتین طبیعی از ارزش غذایی بالایی نیز برخوردار می‌باشد، بنظر میرسد انجام این تحقیق با هدف مقایسه تاثیر منابع آستاگزانتین اشاره شده بر محتوی آستاگزانتین تخم اهمیت ویژه ای دارد. هدف کلی این تحقیق بررسی امکان افزایش ذخیره آستاگزانتین تخم مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان در مراکز تکثیر از طریق افزودن مقدار موثر و مطلوب آستاگزانتین (با منبع مصنوعی یا جلبکی) بود. نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه استفاده موثر تر از منابع رنگدانه های طبیعی به جای مصنوعی را در صنعت آبی پروری کشور گسترش داده و ضمن بهبود عملکرد تکثیر و پرورش، از عوارض جانبی احتمالی ترکیبات شیمیایی بکاهد.

## مواد و روش‌ها

### آماده سازی مکان و نگهداری مولدین

محل اجرای تحقیق، کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای کوخدان سی‌سخت بود. به منظور اجرای این تحقیق، تعداد هفت حوضچه بتنی به ابعاد  $1 \times 1 \times 4$  متر با شرایط نسبتا یکسان برای استقرار گروههای آزمایشی آماده سازی گردید. طرح آزمایشی شامل شش تیمار تغذیه‌ای ( $T_1-T_6$ ) و یک تیمار شاهد (C) بود. تیمارهای یک تا سه ( $T_1-T_3$ ) بترتیب دریافت‌کننده ۲/۶۷، ۵/۳۳ و ۸ گرم جلبک هماتوکوکوس بر کیلوگرم غذا و تیمارهای چهار تا شش ( $T_4-T_6$ ) بترتیب دریافت‌کننده ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستاگزانتین مصنوعی بودند، بطوریکه با توجه

در این ارتباط امروزه مقدار رنگین شدن تخم یکی از معیارهای تشخیص کیفیت تخم در بیشتر مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی محسوب می‌شود. لذا، تخم‌های گرفته شده از مولدین را به دو دسته تخم‌های کم رنگ (pale eggs) و تخم‌های رنگین شده (pigmented eggs) تقسیم بندی می‌کنند (Craik, 1985). علت رنگین شدن تخم آزادماهیان جذب کاروتنوئیدهایی می‌باشد که از طریق جیره غذایی آنها در طبیعت و محیط پرورشی به مصرف تغذیه ماهی می‌رسد. کاروتنوئید موجود در غذا پس از جذب در روده وارد خون شده و در عضله، کبد و پوست تجمع می‌یابد و طی تشکیل تخم یا رشد گنادی از عضله و کبد به سمت تخمدان‌های در حال رشد انتقال و در تخم‌ها تجمع می‌یابند (Steven, 1948; Loginova, 1967; Bromage *et al.*, 1992). قرمز تخم آزادماهیان در طبیعت به دلیل وجود کاروتنوئید آستاگزانتین در بدن آنهاست، در حالیکه در ماهیان پرورشی بسته به نوع کاروتنوئیدی که در جیره غذایی آنها مصرف می‌شود، رنگ تخم متفاوت است. پرورش‌دهندگان ماهی رنگ تخم را به عنوان یک مشخصه ارزشمند در بیان کیفیت تخم محسوب می‌کنند (Torrissen, 1984 and Craik & Harvey, 1986). تخم‌هایی که رنگین شدگی بالایی دارند، از درصد لقاح بالا و نرخ مرگ و میر پایینی از زمان لقاح تا تغذیه فعال برخوردارند (Hartman *et al.*, 1947; Yarzhombek, 1964).

طی بررسی‌های انجام شده، آستاگزانتین باعث بهبود عملکرد تولید مثل در میگوی مونودن در استخرهای پرورشی می‌گردد

(Chien *et al.*, 2003). میگوهایی که از جیره‌هایی با سطوح بالایی از آستاگزانتین تغذیه شده‌اند، تخمک و اسپرم بیشتری تولید کرده‌اند (Pangantihon-Kuhlmann *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2001)

در بررسی‌هایی که بر روی کیفیت تخم از لحاظ تجمع کاروتنوئیدها و رنگ آمیزی ذخایر طبیعی ماهی کاد پرورشی انجام شد، مشخص گردید که تخم‌های حاصل از ذخایر طبیعی حاوی سطوح بالاتری از آستاگزانتین نسبت

(صبح و بعد از ظهر) انجام شد. میزان غذا از ابتدای دوره تا قبل از شروع فصل تکثیر، ۰/۶-۰/۷ درصد وزن بدن و در طول فصل تکثیر حدود ۰/۴-۰/۳ وزن بدن در نظر گرفته شد. به دلیل انحلال بهتر کاروتنوئیدها در روغن، از روغن سویا به عنوان حلال جلبک هماتوکوکوس و آستاگزانتین مصنوعی استفاده شد. برای این منظور به ازای هر کیلوگرم خوراک، بیست میلی لیتر روغن سویا در نظر گرفته شد و پس از افزودن مقدار در نظر گرفته شده جلبک و آستاگزانتین، به آرامی روی غذا اسپری گردید. در زمان اسپری کردن روغن، خوراک مرتب به هم زده شده تا امکان آغشته شدن تمام پلت ها امکان پذیر گردید. طی اجرای پروژه از بین فراسنجه های فیزیکی و شیمیایی آب، سه فاکتور اکسیژن محلول، دما و pH اندازه گیری و ثبت شدند.

به عیار ۱/۵ درصدی آستاگزانتین جلبک هماتوکوکوس، هر شش تیمار به نسبت مساوی آستاگزانتین دریافت کردند. تیمار شاهد از غذای بدون رنگدانه استفاده کرد (جدول ۱). تعداد ۱۴۰ عدد ماهیان قزل آلی مولد با وزن ۲۵۰۰-۳۵۰۰ گرم به صورت تصادفی از گله مولدین سه تا چهار ساله کارگاه محل اجرای طرح از نیمه مرداد تا نیمه آذر به مدت ۱۲۰ روز تهیه و به ازای هر حوضچه ۲۰ عدد، به صورت تصادفی در حوضچه ها تقسیم بندی شدند. یک استخر مجاور نیز به منظور انجام عملیات تکثیر آماده سازی شد و بوسیله ایرانیت و برزنت به صورت سرپوشیده در آمد. جلبک هماتوکوکوس مورد نیاز از شرکت Naturose و آستاگزانتین مصنوعی مورد نیاز نیز از داخل خریداری شد. برای تغذیه مولدین از خوراک BFT شرکت فرادانه استفاده شد. غذاهای به مولدین ۲ مرتبه در روز

جدول ۱: ترکیب جیره های غذایی مورد آزمون در طول دوره پرورش

تیمار	منبع آستاگزانتین	مقدار آستاگزانتین در کیلو گرم غذا
T <sub>1</sub>	جلبک هماتوکوکوس	۲/۶۷ گرم (معادل ۴۰ میلی گرم آستاگزانتین)
T <sub>2</sub>	"	۵/۳۳ گرم (معادل ۸۰ میلی گرم آستاگزانتین)
T <sub>3</sub>	"	۸ گرم (معادل ۱۲۰ میلی گرم آستاگزانتین)
T <sub>4</sub>	آستاگزانتین مصنوعی	۴۰ میلی گرم
T <sub>5</sub>	"	۸۰ میلی گرم
T <sub>6</sub>	"	۱۲۰ میلی گرم
(C)	بدون آستاگزانتین	-

SP 930d و نرم افزار Uto Coro ساخت کشور کره جنوبی استفاده شد.

#### اندازه گیری غلظت آستاگزانتین در نمونه های تخم

در یک لوله آزمایش ۳ میلی لیتر استون ریخته و به آن یک عدد تخم ماهی اضافه و توسط یک همزن شیشه ای همگن شد. سپس به آن ۱ میلی لیتر هگزان افزوده و ۲ دقیقه همزده شد پس از آن به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. ۳ میلی لیتر از لایه رویی به لوله دیگری منتقل گردید و به رسوب باقیمانده ۲ میلی لیتر استون افزوده شد و ۲ دقیقه همزده شد و ۵ دقیقه

#### مرحله تکثیر

از اواسط مهرماه، ماهی ها هر ۱۰ روز مورد معاینه قرار گرفتند و به مرور آنهایی که دارای تخم های رسیده بودند، تکثیر گردیدند. پس از تخم کشی از هر مولد، نمونه ای از تخم به مقدار حدود ۱۰ گرم برای انجام آزمایش بررسی ذخیره آستاگزانتین با دستگاه HPLC برداشت گردید و پس از قرار دادن در ظروف مخصوص به فریزر منتقل شد. بعد از اتمام عملیات تکثیر تمام مولدین تعدادی از نمونه ها به آزمایشگاه بیوفارماسی پارس تهران انتقال یافت. در این بررسی از دستگاه HPLC مدل Yonglin مجهز به پمپ

شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد تعیین گردید. جهت مقایسه اختلاف میانگین فراسنجه های بدست آمده از آزمون دانکن (Duncan, 1955) استفاده شد. جهت تعیین میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد از آمار توصیفی استفاده شد.

### نتایج

نتایج مربوط به مقدار آستاگزانتین تخم به تفکیک هر یک از تیمارها در جدول ۲ مشخص شده است. بیشترین مقدار آستاگزانتین (۲۳۱/۸۷ng) مربوط به تیمار ۳ (۱۲۰٪ آستاگزانتین جلبکی) و کمترین مقدار (۶/۹۶ ng) در تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) بدست آمد. مقادیر میانگین تیمارها باهم اختلاف معنی داری دارند. تیمار ۳ با بالاترین درصد آستاگزانتین جلبکی در جیره باعث تولید بیشترین مقدار آستاگزانتین در تخم شده است. مقدار میانگین تیمار ۳ با همه تیمارها اختلاف معنی داری داشت. تفاوت معنی داری بین تیمارهای ۴، ۵ و ۶ (تیمارهای حاوی آستاگزانتین مصنوعی) با تیمار یک (۴۰٪ آستاگزانتین جلبکی) وجود ندارد. تیمارهای ۲ (۸۰٪ آستاگزانتین جلبکی) و ۶ (۱۲۰٪ آستاگزانتین مصنوعی) از لحاظ تاثیر در جذب آستاگزانتین در تخم، تفاوت معنی داری با هم ندارند و تاثیر هر دو تیمار یکسان است. تیمارهای یک و دو نیز با هم اختلاف معنی داری ندارند. در کل، تیمارهای حاوی آستاگزانتین با تیمار شاهد اختلاف معنی داری دارند و نشان می دهد ضروری است آستاگزانتین به عنوان یک ماده تغذیه ای از یک منبعی بصورت مصنوعی یا طبیعی تامین شود. ارتباط میان افزایش غلظت آستاگزانتین و افزایش مقدار آستاگزانتین تخم در تیمارهای حاوی مقادیر مختلف آستاگزانتین جلبکی بصورت خطی مثبت می باشد (نمودار ۱). در مورد تیمارهای آستاگزانتین مصنوعی این ارتباط از روند منظمی پیروی نمی کند.

سانتریفوژ گردید. ۱ میلی لیتر از فاز رویی به فاز آلی قبلی افزوده شد. تحت گاز ازت خشک شد و در ۲۵۰ میکرولیتر متانول حل شد. ۲۰ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه HPLC با شرایط زیر تزریق گردید (گارنر و همکاران ۲۰۱۰).

فاز متحرک: متانول

سرعت جریان: ۱ ml/min

دمای آنالیز: دمای محیط

طول موج دکتور: ۴۷۴ nm

ستون: ستون ۱۸، ۱۵۰×۳/۹ mm, μm

### آماده سازی استانداردها برای اندازه گیری میزان آستاگزانتین

۵۰ میلی گرم استاندارد آستاگزانتین توزین گردید و در یک بالون حجمی ۵۰ میلی لیتری در ۱۰ میلی لیتر استون حل شده و به حجم رسانده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از این محلول به یک بالون حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل و با استون به حجم رسانده شد. جذب این محلول در طول موج ۴۷۴nm در مقابل نمونه کنترل استون به تنهایی خوانده شد و غلظت واقعی این محلول معادل ۲۴ μg/ml بدست آمد (جذب محلول استاندارد ۱۰۰۰ μg/ml آستاگزانتین در استون در طول موج ۴۷۴nm می بایست معادل ۲۱۰ باشد). در ۵ لوله مختلف غلظتهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۲۰۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر از محلول پایه اولیه (۲۴ μg/ml) تهیه گردید. سپس به هر لوله یک عدد تخم ماهی افزوده و پس از همگن سازی هر لوله توسط روش اشاره شده برای استخراج نمونه مورد استخراج قرار گرفت. نمونه های استخراجی استانداردهای مذکور مانند نمونه به دستگاه HPLC تزریق و نتایج حاصله از آنها برای رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت (Patrik, 2010).

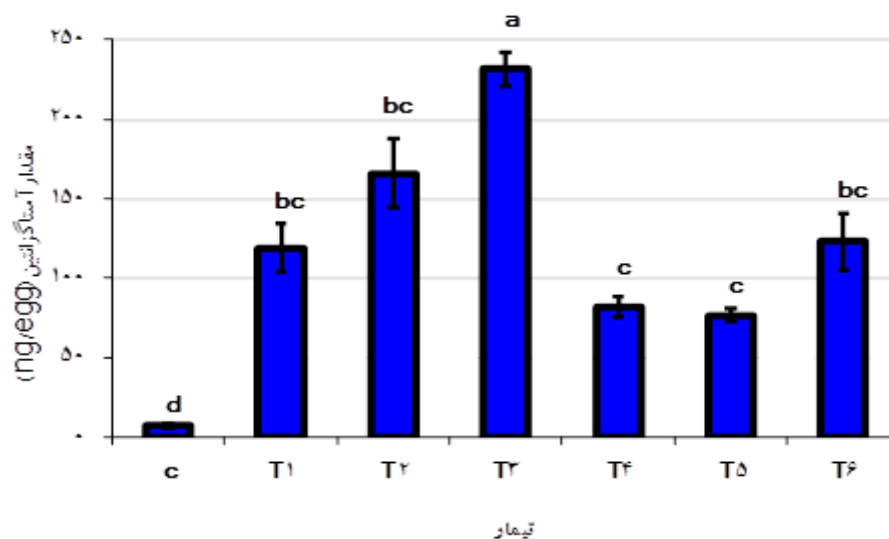
### تجزیه و تحلیل داده ها

جهت مطالعه و تجزیه و تحلیل داده های حاصل از انجام آزمایش ها از روشهای آماری توسط نرم افزار (Version SPSS 17) و به روش ANOVA- One way استفاده

جدول ۲: تأثیر روابط متقابل سطوح مختلف آستاگزانتین با دومنبع مصنوعی و جلبکی جیره‌های آزمایشی بر مقدار آستاگزانتین تخم قزل آلا (میانگین±انحراف معیار)

شماره تیمار	مقدار آستاگزانتین تخم (نانوگرم در تخم)
تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین)	$1/34 \pm 6/92$ <sup>d</sup>
تیمار یک (%۴۰ آستاگزانتین جلبکی)	$15/05 \pm 118/97$ <sup>bc</sup>
تیمار ۲ (%۸۰ آستاگزانتین جلبکی)	$21/69 \pm 165/87$ <sup>b</sup>
تیمار ۳ (%۱۲۰ آستاگزانتین جلبکی)	$10/62 \pm 231/87$ <sup>a</sup>
تیمار ۴ (%۴۰ آستاگزانتین مصنوعی)	$6/24 \pm 82/03$ <sup>c</sup>
تیمار ۵ (%۸۰ آستاگزانتین مصنوعی)	$4/00 \pm 67/77$ <sup>c</sup>
تیمار ۶ (%۱۲۰ آستاگزانتین مصنوعی)	$17/53 \pm 122/87$ <sup>bc</sup>

اعدادی که حروف یکسان بر روی آنها درج شده اختلاف معنی‌دار ندارند ( $P>0.05$ ).



نمودار ۱: مقدار آستاگزانتین تخم در تیمارهای مختلف (میانگین±انحراف معیار)

مراحل مختلفی از قبیل بلوغ اووسیت‌ها، لقاح تخمک‌ها، تنفس تخم و رشد جنین، مشخص شده است ( Craik 1985; Torrissen 1990; Pavlov *et al.*, 2004)، هرچند این موضوع نیاز به بررسی بیشتری دارد. آستاگزانتین یکی از مهمترین منابع کاروتنوئیدی است که در آبی پروری اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده و مصرف آن رو به گسترش است. این در حالی است که نتایج مطالعات

## بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی، بهبود رنگ تولیدات آبی پروری از طریق استفاده از کاروتنوئیدها یکی از مهمترین معیارهای تعیین کننده کیفیت آنها از نظر فروش محسوب می‌شود. علاوه بر نقش اثبات شده کاروتنوئیدها در بهبود رنگ آبیان پرورشی، این ترکیبات در پدیده تولید مثل نیز شرکت می‌کنند. شرکت کاروتنوئیدها در تولید مثل ماهی در

تخم اثر مثبتی بر قابلیت لقاحی تخمک داشته بطوریکه میتوان نقش یک هورمون باروری برای آن در نظر گرفت (بازیار و همکاران، ۱۳۸۴). کاهش دفعات تخم ریزی، افزایش میانگین تعداد تخم سیال در هر بار تخم ریزی، افزایش درصد لقاح و افزایش راندمان تولید لارو به عنوان مزایای استفاده از آستاگزانتین گزارش شده است (Sawanboonchun *et al.*, 2008).

پژوهش های انجام شده بیانگر این است که درصد لقاح بالاتری را در تخم های با رنگ پذیری بالا نسبت به تخم های با رنگ پذیری پایین می توان انتظار داشت ( Craike, Mikulin & Soin, 1975 ; 1985).

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی و مطالعاتی که قبلا انجام شده (Watanabe & Vassallo-Auis, 2003; Capelli & Cysewski, 2007; Aquis *et al.*, 2001) آستاگزانتین طبیعی نسبت به آستاگزانتین مصنوعی (که در حال حاضر به میزان گسترده ای در آبی پروری استفاده می شود) از اثر گذاری بیشتری در بهبود عملکرد تکثیر مولدین برخوردار است و استفاده از آن در جیره غذایی مولدین پرورشی میتواند از نظر اقتصادی سودمند باشد.

امروزه مقدار رنگین شدن تخم یکی از معیارهای تشخیص کیفیت تخم در بیشتر مزارع تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی به حساب می آید. پرورش دهندگان ماهی رنگ تخم را به عنوان یک مشخصه ارزشمند در بیان کیفیت تخم محسوب می کنند (Torrissen, 1984; Craik and Harvey 1986).

همچنین مشخص شده است که در تخم هایی که رنگین شدگی بالایی وجود دارد، درصد لقاح بالا و پایین ترین نرخ مرگ و میر از زمان لقاح تا تغذیه فعال در آنها وجود دارد (Yarzhombek, 1964; Hartman *et al.*, 1947).

بیشترین مقدار آستاگزانتین تخم (۲۳۱/۸۷ ng) مربوط به تیمار ۳ (۱۲۰٪ آستاگزانتین جلبکی) و کمترین مقدار (۶/۹۶ ng) در تیمار شاهد (بدون آستاگزانتین) به دست آمد. ارتباط میان افزایش غلظت آستاگزانتین و افزایش مقدار آستاگزانتین تخم در تیمارهای حاوی مقادیر مختلف آستاگزانتین جلبکی بصورت خطی مثبت بود

انجام شده در سالهای اخیر، بیانگر برتری عملکردی آستاگزانتین طبیعی نسبت به مصنوعی می باشد (Guerin *et al.*, 2003; Kidd, 2011; Ranga Rao *et al.*, 2014). بسیاری از مراکز آبی پروری در جهان به سمت استفاده از آستاگزانتین طبیعی به جای مصنوعی پیش می روند هر چند این اقدام هزینه بیشتری را برایشان به همراه دارد. آبی پروری یک صنعت بشدت رقابتی است، بنابراین تنها در صورتی هزینه های اضافی برای اجزای غذایی جیره ها ملحوظ می گردد که دلیل روشنی از لحاظ اقتصادی به همراه داشته باشد و منجر به کسب سود گردد.

همراه با رشد ماهیان آزاد، غلظت رنگدانه های آستاگزانتین و کانتاگزانتین در عضله افزایش می یابد (Torrissen *et al.*, 1981) ولی طی رشد تخمدانها، کاروتنوئیدها از عضله و کبد به سمت تخمدان های در حال رشد حرکت کرده و سپس در تخمک ها تجمع می یابند. محتوای کاروتنوئیدی تخم و نیز رنگ ناشی از آن بستگی کامل به میزان ذخیره کاروتنوئید در تخمک در حین زرده گیری از طریق غذای مصرفی است (Kitahara, 1983 ; Torrissen & Torrissen, 1984). تخم های بزرگ تر از گونه های مختلف ماهیها، نیاز به مقادیر بیشتری از رنگدانه های کاروتنوئیدی برای فعالیت های متابولیک طی مراحل جنینی دارند و بین زمان نمو جنینی با مقدار غلظت کاروتنوئید در تخم هر گونه همبستگی وجود دارد (Mikulin, 2003). افزودن آستاگزانتین به عنوان مکمل به جیره غذایی، به میزان قابل توجهی باعث بهبود کیفیت تخم در striped jack (Vassallo-Agius *et al.*, 2001) و ماهی قزل آلی رنگین کمان (Ahmadi *et al.*, 2006)، همچنین بهبود عملکرد تولیدمثل در ماهی طلایی (Tizkar *et al.*, 2013) شده است. حتی در برخی گزارش ها اظهار شده که آستاگزانتین یک ویتامین ضروری یا یک هورمون لقاح و یک افزاینده رشد است (Sigurgisladdottir *et al.*, 1994). در مورد تاثیر آستاگزانتین جیره غذایی بر ذخیره آستاگزانتین تخمک و قابلیت لقاح در مولدین قزل آلی رنگین کمان، مشخص شده که آستاگزانتین موجود در

(نمودار ۴-۹). در مورد تیمارهای آستاگزانتین مصنوعی این ارتباط روند منظمی نداشت. به طور کلی، تیمار ۳ با بالاترین درصد آستاگزانتین جلبکی در جیره باعث تولید بیشترین مقدار آستاگزانتین در تخم شده است و نشان دهنده تاثیر بیشتر آستاگزانتین طبیعی نسبت به سننتیک بر کیفیت تخم از نظر تجمع رنگدانه آستاگزانتین می باشد. هرچند در برخی مطالعات تفاوت معنی داری در کیفیت تخم ماهیانی که آستاگزانتین مصرف کرده یا نکرده بودند، مشاهده نشده است (Christiansen & Torrisen, 1997).

در یک بررسی توسط Salze و همکاران (2005) بر روی کیفیت تخم انواع وحشی و پرورشی ماهی کاد، مشخص شد که تخم های حاصل از انواع طبیعی حاوی سطوح بالاتری از آستاگزانتین بودند و استفاده از اقلام غذایی طبیعی به عنوان منابع کاروتنوئیدی در امر پرورش آبزیان تقویت شد.

سلامتی و شادابی تمامی مولدین انتخاب شده در طول انجام آزمایش می تواند یکی دیگر از اثرات مصرف کاروتنوئید آستاگزانتین در هر دو شکل مصنوعی و طبیعی باشد، بطوریکه به نظر میرسد مقاومت ماهیها را نسبت به برخی شرایط نامساعد محیطی از جمله وجود احتمالی عوامل بیماری زا و همچنین تغییرات برخی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب افزایش داده است. مطالعات اخیر نشان داده است که حضور آستاگزانتین در جیره غذایی باعث افزایش مقاومت میگوهای پرورشی در برابر استرس کمبود اکسیژن (Chien et al., 1999)، استرس شوری و حرارت (Chien et al., 2003)، استرس آمونیاک و پاتولوژیک (Pan et al., 2003) می شود. بنابراین، آستاگزانتین علاوه بر خاصیت رنگدگی به بافت و سلولهای جنسی، عملکرد بیولوژیک موثری در آبزیان دارد که این عملکرد، افزایش بازماندگی و مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی را به همراه دارد. هرچند جزئیات عملکرد بیولوژیک آستاگزانتین در بدن آبزیان کاملاً شناخته شده نیست، ولی اثرات مثبت مصرف آن را می توان در بهبود عملکرد تکثیر و پرورش آبزیان پرورشی بخوبی مشاهده کرد. عدم بروز بیماری و رخداد تلفات و همچنین شادابی و

خوشرنگی مولدین مورد مطالعه از جمله مشاهدات ظاهری در طول انجام این تحقیق بود. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد آستاگزانتین باعث افزایش ذخیره آستاگزانتین در تخم مولدین قزل آلی رنگین کمان می شود. نتایج همچنین بیانگر این واقعیت است که آستاگزانتین جلبکی نسبت به آستاگزانتین مصنوعی از برتری فوق العاده ای برخوردار بوده و محتوی آستاگزانتین را در سطح بالاتری بهبود می بخشد. این تحقیق می تواند زمینه استفاده موثرتر از منابع رنگدانه های طبیعی را به جای مصنوعی در صنعت آبی پروری کشور گسترش داده و ضمن بهبود عملکرد تکثیر و پرورش، از عوارض جانبی احتمالی ترکیبات شیمیایی بکاهد.

#### منابع

- بازیار، ا.، احمدی، م. و مجازی امیری، ب. ، ۱۳۸۴. بررسی تاثیر آستاگزانتین جیره غذایی بر ذخیره آستاگزانتین تخمک و قابلیت لقاح در مولدین قزل آلی رنگین کمان. مجله منابع طبیعی ایران. جلد ۵۸. شماره ۱ صفحات ۱۲۳-۱۱۳.
- علیزاده ، م. ، ۱۳۸۶. کاروتنوئیدها و کاربرد آنها در پرورش آبزیان (قسمت دوم) ، مجله آبی پرور ، انتشارات سازمان شیلات ایران. شماره ۲۳. صفحات ۲۱-۲۴.
- Ahmadi, M. R., Bazyar, A.A., Safi, S., Ytrestøyl, T. and Bjerkeng, B., 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Applied Ichthyol, Vol. 22, pp. 388-394.
- Aquis, R., Watanabe, T., Satoh, S., Kiron, V., Imaizumi, H., Yamazaki, T. and Kawano, K., 2001. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for brood stock yellow-tail. *Seriola quinqueradiata* (Temminck and Schlegel), Aquaculture Research, 32(1):263-272.

- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.-P., Zarka, A. and Chen, F., 1999.** Changes in pigments profile in the greenalga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses, *Biotechnol. Lett.*, 21,601–604.
- Bromage, N., Randall, C., Thrush, M., Davis, B., Springate, J., Duston, J. and Barker, G., 1992.** Brood stock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 100:141-166.
- Bromage, N. R., 1995.** Brood stock management and seed quality – general considerations, In: Bromage, N.R., Roberts, R.J., (Eds.) *brood stock Management and Egg and Larval Quality*, Blackwell, London, pp 1-24.
- Capelli, B. and Cysewski, B., 2007.** *Natural Astaxanthin: King of the Carotenoids*, Cyanotech Corporation Publication. Holualoa, Hawaii. 148 p.
- Capelli, D., Bagchi, A. and Cysewski, G., 2013.** Synthetic Astaxanthin Is Significantly Inferior to Algal-Based Astaxanthin as an Antioxidant and May Not Be Suitable as a Human Nutritional Supplement, *Nutrafoods*, 12 (4) 145–152
- Christiansen, R. and Torrissen, O.J., 1997.** Effect of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*), *Aquacultu*, 153, 51-62.
- Chien, Y.H., Chien, I.M., Pan, C.H., Kurmaly, K., 1999.** Oxygen depletion stress on mortality and lethal course of juvenile tiger prawn *Penaeus monodon* fed high level of dietary astaxanthin. *J Fish Soc Taiwan*, 26: 85–93
- Chien, Y. H., Pan, C. H. and Hunter, B., 2003.** The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin, *Aquaculture*, Vol. 216, No. 1-4, pp. 177-191.
- Craik, J.C.A., 1985.** Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes, *Aquaculture*, 47,61–88.
- Craik, J.C.A. and Harvey, S.M., 1986. The carotenoids of eggs wild and farmed Atlantic salmon, and their changes during development to the start of feeding. *Journal of Fish Biology*, 29:549-565.
- Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 1999.** “Effect of Astaxanthin on Stress Resistance of *Penaeus monodon* Larvae.” Proceedings of the 37<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference, Bangkok, Thailand, Text & Journal Publication Co, pp. 240-245
- Gong, X.D. and Chen, F., 1998.** Influence of medium components on Astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Proc. Biochem*, 33,385–391.
- Guerin .M., Huntley .M. E. and Olaizola. M., 2003.** *Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition*, *TRENDS in Biotechnology*, 21, 210-216.
- Harker, M., Tsavalos, A.J. and Yong, A.J., 1996.** Autotrophic growth and carotenoid production of in 30 liter air-lift

- photobioreactor, *Journal of Ferment. Bioeng.*, 82 (2), 113–118.
- Hartman, M., Medem, F.G., Kuhn, R. and Bielig, H.j., 1947.** Untersuchngen Uber die Berfruchtungs Stoffe der Regenbogeforellle. *Z. Naturforsch.*, 2,330-343.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. and Goycoolea, F.M., 2006.** Astaxanthin: A review of its chemistry and applications, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46, 185–196.
- Johnson, E.A. and An, G.H., 1991.** Astaxanthin from microbial sources, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 11, 297–326.
- Johnson, EA. and Schoeder, WA., 1996.** Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. In: Takeda GR, Teranishi, R., Williams, PJ., editors. *Biotechnology for improved foods and flavors*. Washington DC: American Chemical Society. pp. 39–50.
- Kidd, P., 2011.** Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential, *Altern. Med. Rev.*, 16, 355–364.
- Kitahara, T., 1983.** Behavior of Carotenoids in the Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) During Development. *Bull. Jap. Soc. Sci.Fish.*, 50(3),531-536.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S., 1991.** Astaxanthin production by green algal, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media. *Journal of Ferment. Bioeng.*, 71 (5), 335–339.
- Loginova, T.A., 1967.** Carotenoid of Rainbow Trout in the Development of Gonads and the eggs, In: *The Metabolism and Biochemistry of fishes*. Vysshaya Shkova Press, Moscow. pp.336-340( in Russian)
- Lorenz, R. T., Cysewski, G. R., 2000.** Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18, 160–167.
- Mikulin, A.Y. and Soin, S.G., 1975.** The Functional Significance of Carotenoids in the Embryonic Development of Toleost, *Journal of Ichthyol.*, 15(5),749-759
- Mikulin, A, E., 2003.** The influence of Carotenoids Contained in the Eggs Upon the Offspring Quality at Artificial Fish Breeding, *Proceeding Book, International Symposium ,Cold Water Aquaculture, September -13, 2003, Russia.*
- Olaizola, M., 2000.** Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000 L. outdoor photobioreactors. *Journal of Appl Phycol.*, 12:499–506.
- Pan, C. H., Chien, Y. H. and Cheng, J. H., 2003.** Effects of light regime, algae in the water, and dietary astaxanthin on pigmentation, growth, and survival of black tiger prawn *Penaeus monodon* post-larvae, *Zoological Studies*, Vol. 40, No. 4, pp. 371-382.
- Pangantihon-Kuhlmann, M.P., Millamena, O. and Chern, Y., 1998.** Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus*

- monodon* broodstock, Aquat. Living Resour., 11, 403–409.
- Pavlov, D., Kjørsvik, E., Refsti, T. and Andersen, Ø., 2004.** Brood stock and egg production, in Culture of cold-water marine fish, Moksness, E., Kjørsvik, E., Olsen, Y., edn, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 129-203.
- Ranga Rao, A., Siew Moi, P., Sarada. R. and Ravishankar Gokare, A., 2014.** Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications. *Mar. Drugs*, 12, 128-152
- Ribeiro, E.A., Genofre, G. C. and McNamara, J.C., 2001.** Identification and quantification of carotenoid pigments during the embryonic development of the fresh water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda), *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, 34, 105–116.
- Roche, F., 1987.** Astaxanthin: Human food safety summary. In *Astaxanthin As a Pigmenter in Salmon Feed, Color Additive Petition 7C02 1 1, United States Food and Drug Administration*; Hoffman-La Roche Ltd.: Basel, Switzerland. p. 43.
- Springate, J. R. C. and Bromage, N. R., 1985.** Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*), *Aquaculture*, Vol. 47, No. 2-3, pp. 163-172.
- Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W. J. and Robertson, D.A., 2005.** Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua L.*): Egg performance and lipids in eggs from farmed and wild brood stock, *Aquacult. Res.* 36, 1488-1499.
- Sawanboonchun, J., Roy, W.J., Robertson, D. A. and Gordon, B.J., 2008.** The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod brood stock (*Gadus morhua, L.*), *Aquaculture*, Vol. 283, Issues 1 - 4, pp. 97 – 101
- Sawanboonchun, J., 2009.** Atlantic Cod (*Gadus morhua L.*) Brood stock Nutrition: The Role Of Arachidonic Acid And Astaxanthin As Determinants Of Egg Quality, Ph.D. Thesis, Institute of Aquaculture, University of Sterling, Scotland. 212p.
- Sigurgisladottir, S., Torrissen, O., Lie, Ø., Thomassen, M. and Hafsteinsson, H., 1997.** Salmon quality: methods to determine the quality parameters, *Rev. Fish. Sci.*, 5, 223–252.
- Steven, D.M., 1948.** Studies on Animal Carotenoids. I. Carotenoids of Brown Trout, *Journal of Exp. Biology*, 25:369-387.
- Torrissen, O., 1984.** Pigmentation of Salmonids. Effect of Carotenoids in Eggs and Start Feeding Diet on Survival and Growth Rate, *Aquaculture*, 43, 185-193.
- Torrissen, K.R. and Torrissen .O.J., 1985.** Protease Activities and Carotenoid Level During the Sexual Maturation of Atlantic Salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, 50:113-122.
- Torrissen, O. J., 1990.** Biological activities of carotenoids in fishes, in The current status of fish nutrition in aquaculture, Takeda, M.

- and Watanabe, T., ed., Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, pp. 387-399.
- Vassallo-Agius, R., Imaizumi, H., Watanabe, T., Yamazaki, T., Satoh, S. and Kiron, V., 2001.** The influence of astaxanthin -supplemented dry pellets on spawning of striped jack, Fisheries Sci., 67: 260-270.
- Watanabe, T. and Vassallo-Auis, R., 2003.** Brood stock nutrition research on marine finfish in Japan,"Aquaculture, 227(1-4):35-61.
- Yarzhombek, A.A., 1964.** Carotenoid and Trout Farming, Sb.Tekhnicheskoy Informatsii VNIRO., No.6, pp. 20-25 (in Russian).

## Effect of synthetic and algal astaxanthin levels on egg astaxanthin content of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Alizadeh M.<sup>\*1</sup>; Raziéh Ansari R.<sup>2</sup>; Dadgar Sh.<sup>3</sup>; Hafezieh M.<sup>3</sup>

\*m\_alizadeh47@yahoo.com

1-Inland saline water fish research center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bafgh, Iran

2- Negin trout farm, Yasuj, Iran

3- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

### Abstract

This research was done in a trout farm in Kohkiluyeh and Boyer- Ahmad province. The main object of this study was comparing of two sources of astaxanthin (synthetic or algae) in feed on astaxanthin content of egg in rainbow trout. It was considered seven groups consisting six treatments (T1-T6) in two different astaxanthin sources and a control (C) (without astaxanthin). So, algal astaxanthin (*haematococcus pluvialis*) in the three levels of 2.67, 3.55 and 8gr/kg food (T1,T2, T3); and synthetic astaxanthin in three levels of 40, 80 and 120mg/kg food in diet (T4, T5, T6) examined on 140 trout broods (3-4 years) for 4 months, before the spawning season. Astaxanthin content of obtained eggs from all treatments in spawning season was measured by HPLC apparatus. The highest and the lowest amount of egg astaxanthin were observed in T3 and C respectively. In each astaxanthin group, a significant difference was obtained between averages in treatments ( $P < 0.05$ ), as T3 was the highest between them. No significant difference was observed between synthetic astaxanthin treatments (T4, T5 and T6) and T1 (the lowest level of algal astaxanthin). Treatments T2 and T6 also had the same function in term of saving astaxanthin in eggs. It also concluded that natural astaxanthin (*Haematococcus pluvialis*) for the reason that contains supplementary nutritious, is extraordinary preferable than synthetic astaxanthin to improve astaxanthin content of egg in rainbow trout.

**Keywords:** rainbow trout, egg astaxanthin content, algal astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*

\*Corresponding author