University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 4, 2024, pages: 1-13
DOI: 10.22124/janb.2023.25813.1222

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effects of natural carotenoid (carrot and red bell pepper) on growth performance, digestive enzymes and antioxidant enzymes in koi, *Cyprinus rubrofuscus*

Abbas Zamani
Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Hamadan, Iran

Received 20 October 2023 Revised 14 December 2023 Accepted 16 December 2023

KEYWORDS

Bell pepper
Powder
Carrot powder
Carotenoid
Koi
Trypsin

ABSTRACT

Introduction: One of the most important indices in increasing the marketability of ornamental fish is the favorite growth. The main pigment in many fish species is carotenoid, employing to improve their antioxidant capacity and immune system. Nowadays, in many studies, using carotenoid obtained from agricultural sources, especially carotenoids found in plants, has been considered in fish diet and shown a high capacity than the artificial carotenoid in order to improve fish growth. The aim of this study was to use carrot, *Daucus carota* and red bell pepper, *Capsicum frutscene grossum* powders as rich sources of carotenoids in the diet of koi, *Cyprinus rubrofuscus* fry and to investigate their effects on growth performance, digestive and antioxidant enzymes.

Materials and methods: Four experimental dietary treatments including the control (without plant powder; D_1), 2% carrot powder (D_2), 2% red bell pepper powder (D_3), and also 2% containing a mixture of carrot powder (1%) and red bell pepper (1%; D_4) were prepared as isonitrogenous and isocaloric diets in triplicate. The effect of prepared diets was evaluated on growth performance, digestive enzymes (trypsin and amylase) and antioxidant activity including superoxide dismutase (SOD) and catalase in koi (weight: 1.10 ± 0.20 g) for 8 weeks.

Results and discussion: The results obtained from body weight gain, specific growth rate and condition factor showed that there was no significant difference among the experimental diets, although they were higher in D_2, D_3 and D_4 compared to D_1. The lowest food conversion ratio was observed in D_2, however, no significant difference was recorded among the treatments. Also, survival rate in experimental diets was 100%. Protein and lipid efficiency ratios as well as the

activity of trypsin and amylase were lower in D_1 than in D_2, D_3 and D_4, albeit without any significant difference. According to the results, antioxidant enzyme activities including SOD and catalase significantly decreased in D2 compared to D_1 (control) in both before and after stress ($p<0.05$).

Conclusion: Based on the results, at the aforementioned levels of carrot powder and red bell pepper did not exhibit any negative effects on the growth performance, digestive enzymes and antioxidant activity of koi.

Funding: The author has no sources of funding for the present work.

Conflicts of interest: Authors have no conflict of interest to declare for the publication of the present work.

Acknowledgments: The author would like to thank the helpful assistance offered by the laboratory staff in Fisheries Department of Malayer University.

*Corresponding author: a.zamani@malayeru.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال نهم، شماره چهارم، دی ۱۴۰۲، صفحات ۱۳-۱

DOI: 10.22124/janb.2023.25813.1222

"مقاله پژوهشی"

تأثیر رنگدانه‌های طبیعی هویج و فلفل دلمه قرمز جیره بر عملکرد رشد، آنزیم‌های گوارشی و آنزیم های ضد اکسایشی ماهی کپور گلگون (*Cyprinus rubrofuscus*)

عباس زمانی

گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، همدان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵

چکیده

امروزه در بسیاری از مطالعات به استفاده از رنگدانه‌های طبیعی به خصوص کاروتنوئیدهای موجود در گیاهان به جای انواع مصنوعی در جیره غذایی ماهیان توجه شده است، زیرا از ظرفیت به مراتب بالاتری نسبت به رنگدانه‌های مصنوعی برای بهبود رشد برخوردارند. در مطالعه حاضر، تأثیر پودر گیاهان حاوی کاروتنوئید شامل هویج و فلفل دلمه قرمز بر عملکرد رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی (تریپسین و آمیلاز) و ضد اکسایشی (سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) در بچه ماهی کپور گلگون با وزن متوسط ۰/۲ ± ۱/۱ گرم به مدت ۸ هفته بررسی شد. چهار جیره آزمایشی شامل جیره غذایی شاهد فاقد پودر گیاهان (D_1)، ۲٪ پودر هویج (D_2)، ۲٪ پودر فلفل دلمه قرمز (D_3) و ۲٪ حاوی مخلوط پودر هویج (۱٪) و فلفل دلمه قرمز (۱٪؛ D_4) همسان از نظر پروتئین و انرژی در ۳ تکرار تهیه شد. نتایج شاخص‌های افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه و شاخص وضعیت نشان داد که بین جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، هر چند که در جیره‌های D_2، D_3 و D_4 نسبت به جیره D_1 بالاتر بود. پایین‌ترین میزان ضریب تبدیل غذایی در ماهیان تغذیه شده با جیره D_2 مشاهده شد، ولی بین جیره‌های غذایی اختلاف معنی‌داری ثبت نشد. همچنین، میزان بقا در جیره‌های آزمایشی ۱۰۰٪ بود. شاخص کارایی مصرف چربی و پروتئین و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های تریپسین و آمیلاز در جیره D_1 کمتر از D_2، D_3 و D_4 بود، ولی اختلاف معنی‌داری نداشتند. نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نشان داد که در جیره‌های حاوی پودر کاروتنوئید در هر دو مرحله قبل و بعد از استرس کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد (فاقد کاروتنوئید) داشتند ($p<0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده، پودر هویج و فلفل دلمه قرمز تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در بچه ماهی کپور گلگون نداشت، ولی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش معنی‌دار نشان داد.

کلمات کلیدی

پودر هویج

پودر فلفل دلمه قرمز

تریپسین

کاروتنوئید

کپور گلگون

نویسنده مسئول: a.zamani@malayeru.ac.ir

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری در سالیان اخیر از رشد و توسعه بالایی برخوردار بوده است، به طوری که میزان تولید آن در دهه اخیر از ۷۱/۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۰ به ۸۷/۵ میلیون تن (رشد ۲۲٪) در سال ۲۰۲۰ افزیش یافته است (FAO, 2022). اهمیت اقتصادی ماهیان زینتی کمتر از ماهیان خوراکی نیست. بنابراین بررسی و تحقیق جنبه‌های مختلف پرورش آنها امری مهم است. بر اساس گزارش فائو میزان تولید ماهیان زینتی در سال ۲۰۲۰ حدود ۴ میلیون تن بوده است که حدود ۲/۳٪ کل تولید آبزی پروری جهان را شامل می‌شود (FAO, 2022). میزان تولید ماهیان زینتی در ایران نیز رشد مناسبی داشته و در فاصله سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۵ از ۲۳۲ میلیون قطعه به ۲۹۱ میلیون قطعه افزایش یافته است که یک افزایش ۲۵٪ را نشان می‌دهد (Iranian Fisheries Organization, 2021).

از مهم‌ترین شاخص‌ها در افزایش بازارپسندی این ماهیان وجود رنگ مطلوب و رشد مناسب است. رنگ ماهیان عمدتاً به دلیل حضور کروماتوفورها (یاخته‌های حاوی رنگدانه) است که معمولاً بر روی پوست وجود دارند. چهار گروه رنگدانه اصلی مسئول ایجاد رنگ در بافت و پوست جانوران شامل ملانین، پورین، پریدیوم و کاروتنوئید هستند. رنگدانه اصلی در بسیاری از ماهیان، کاروتنوئید محلول در چربی است. کاروتنوئیدها در یوباکتری‌ها، آرکی باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها (مانند جانوران و گیاهان) دیده می‌شوند و تاکنون بیش از ۷۵۰ نوع کاروتنوئید در طبیعت کشف شده است (Nakano, 2020). دو نوع اصلی کاروتنوئیدها شامل کاروتن (فقط هیدروکربن‌هایی که فاقد اکسیژن هستند) و زانتوفیل (حاوی اکسیژن) هستند. کاروتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی حاوی پیوندهای دوگانه هستند که فعالیت ضد اکسایشی قوی از خود نشان می‌دهند. بسیاری از کاروتنوئیدها، به خصوص آستازانتین (ASX)، برای بهبود خاصیت ضد اکسایشی و دستگاه ایمنی استفاده می‌شوند، و منجر به ایجاد مقاومت در برابر بیماری، عملکرد رشد، بقا و بهبود کیفیت تخم در ماهیان پرورشی بدون هیچ گونه سمیت یاخته‌ای یا جانبی می‌شوند (Martine et al. 2008; Bano et al. 2020; Nakano and Wiegertjes, 2020; Rana et al. 2023).

بیشتر جانوران مانند ماهیان نمی‌توانند کاروتنوئیدها را تولید کنند، در حالی که موجودات فتوسنتز کننده مانند گیاهان و برخی از باکتری‌ها توانایی تولید این رنگدانه‌ها را دارند (Maoka, 2020; Nakano and Wiegertjes, 2020). منابع حاوی کاروتنوئید، صناعی و یا طبیعی هستند. معمولاً استفاده از رنگدانه‌های صناعی مانند آستازانتین و کانتازانتین در جیره غذایی ماهیان چندان مقرون به صرفه نیست، لذا در بسیاری از مطالعات به استفاده از رنگدانه‌های حاصل از منابع کشاورزی به خصوص کاروتنوئیدهای موجود در گیاهان توجه شده است.

رنگدانه‌های طبیعی در سبزیجاتی مانند گوجه فرنگی، فلفل قرمز، ذرت، هویج، ریشه چغندر و انواع قارچ‌های خوراکی و غیره وجود دارند. طبق تحقیقات انجام شده، رنگدانه‌های گیاهی علاوه بر قیمت مناسب، ظرفیت به مراتب بهتری نسبت به رنگدانه‌های مصنوعی برای بهبود رشد ماهی مورد نظر دارند (Yanar et al. 2007). تأثیر استفاده از منابع گیاهی حاوی کاروتنوئید بر رشد و بازماندگی ماهیان در مطالعات مختلف بررسی شده است. مطالعه Rana و همکاران (۲۰۲۳) نشان داد که استفاده از پودر گل همیشه بهار در جیره غذایی ماهی دم شمشیری (*Xiphophorus helleri*) در مقایسه با پودر گل رز چینی و هویج بر عملکرد رشد تأثیر مثبت داشته است. از دیگر مطالعات می‌توان به بررسی اثر گیاه جعفری بر رشد ماهی کپور گلگون (*Cyprinus rubrofuscus*)، دانه آناتو در ماهی کپور معمولی (*C. carpio*)، هویج و لبو در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پودر هویج در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، فلفل دلمه قرمز و نارنجی بر ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و پودر گل رز و پودر گل جعفری در ماهی گورامی (*Trichogaster fasciata*) اشاره کرد (Bora, 2010; Mooraki et al. 2013; Adhami et al. 2017; Beygi Kaleshtari et al. 2019; KasAlipour et al. 2020; Bano et al. 2020).

همچنین در مطالعات برخی محققان تأثیر استفاده از کاروتنوئیدها در جیره غذایی ماهیان بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ضد اکسایشی بررسی شده و نتایج نشان داده است که استفاده از این رنگدانه‌ها ممکن است در بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ضد اکسایشی مؤثر باشد (Cheng et al. 2018; Zhu et al. 2022). مطالعه Abd El-Gawad و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که استفاده از کانتازانتین و لیکوپن در جیره غذایی ماهی سوف زرد (*Perca flavescens*) باعث افزایش فعالیت آنزیم ترپیسین و کاهش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی (SOD و کاتالاز) در مقایسه با گروه شاهد شد. لذا، استفاده از منابع

حاوی کاروتنوئید در جیره غذایی ماهیان ممکن است در بهبود فعالیت فیزیولوژیک و در نتیجه، رشد آنها مؤثر باشد. ماهی کپور گلگون واریته رنگی ماهی کپور معمولی، و یکی از مهم‌ترین ماهیان زینتی خانواده کپور ماهیان است که در سطح جهان و همچنین، ایران محبوبیت بالایی دارد. هدف از این پژوهش استفاده از پودر هویج (*Daucus carota*) و فلفل دلمه قرمز (*Capsicum frutscene grossum*) به عنوان منابع غنی از کاروتنوئید در جیره غذایی بچه ماهی کپور گلگون و بررسی اثرات آن بر عملکرد رشد، آنزیم‌های گوارشی و ضد اکسایشی آن است.

مواد و روش‌ها

پرورش ماهیان

در این تحقیق، تعداد ۳۶۰ عدد بچه ماهی کپور گلگون با وزن متوسط ۰/۲ ± ۱/۱ گرم و درازای متوسط ۰/۵ ± ۴/۱ سانتی‌متر از کارگاه تکثیر محلی تهیه و به محل آزمایش منتقل شدند. پس از سازگاری اولیه ماهیان با شرایط دمایی محل آزمایش و تغذیه با جیره غذایی کپور معمولی به مدت ۲ هفته، در ۱۲ عدد آکواریوم (با ابعاد ۴۰ × ۵۰ × ۸۰؛ هر یک با ظرفیت آبگیری۱۶۰ لیتر حاوی ۳۰ عدد بچه‌ماهی) در قالب ۴ تیمار و ۳ تکرار به طور کاملاً تصادفی ذخیره‌سازی شدند. آب مورد استفاده برای پرورش ماهیان در طی دوره از نظر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی شامل دما (۲۵ °C)، اکسیژن محلول (۷/۰ میلی گرم در لیتر)، پی اچ (۷/۵) و شوری (کمتر از ۱ g/L) ارزیابی شد و رژیم نوری نیز به صورت طبیعی (۱۴ ساعت روشنایی/ ۱۰ ساعت تاریکی) بود. برای حفظ کیفیت آب از فیلتر شنی و برای حفظ دما و اکسیژن آکواریوم‌ها به ترتیب از بخاری و هواده استفاده شد. تغذیه ماهیان با جیره‌های آزمایشی تهیه شده، روزانه ۲ بار (ساعت ۹ و ۱۸) و به مدت ۸ هفته بر اساس ۵٪ وزن بدن انجام شد (Yesilayer et al. 2011; Mooraki et al. 2013). در این مدت، مدفوع و غذای به جای مانده در محیط پرورشی ۳۰ دقیقه بعد از اتمام غذادهی روزانه سیفون، و روزانه با توجه به کیفیت آب ۳۰٪ حجم کل آب تعویض شد.

تهیه پودر گیاه

گیاهان مورد نظر در این تحقیق شامل هویج و فلفل دلمه قرمز، بعد از تهیه از بازار به خوبی شسته، بعد از آبکشی اولیه به قطعات کوچک بریده، و سپس در آون در دمای °C ۵۰ خشک شدند. بعد از خشک شدن با کمک دستگاه آسیاب به خوبی پودر، و تا زمان استفاده در ظروف درب‌دار تیره رنگ در دمای °C ۴ نگهداری شدند (Adhami et al. 2017).

تهیه جیره‌های آزمایشی

جیره غذایی برای بررسی اثرات جایگزینی پودر هویج و فلفل دلمه قرمز در ۴ تیمار شامل جیره شاهد D_1 (فاقد پودر گیاه)، جیره D2 (حاوی ۲٪ پودر هویج)، جیره D_3 (حاوی ۲٪ پودر فلفل دلمه قرمز) و جیره D_4 (حاوی ۱٪ پودر هویج و ۱٪ پودر فلفل دلمه قرمز) مطالعه شد. برای جیره‌نویسی از نرم افزار WUFFDA استفاده شد و فرمول غذایی مطابق با نیازهای غذایی بچه‌ماهی کپور معمولی انجام شد، به طوری که از نظر میزان پروتئین، چربی و انرژی همسان باشند (NRC, 2011). برای تهیه جیره‌های آزمایشی ابتدا اقلام غذایی بر اساس جدول ۱ از بازار تهیه، و بعد از الک و آسیاب کردن به صورت کاملاً پودری آماده شدند. سپس، اقلام غذایی بر اساس مقادیر مورد نیاز توسط ترازو توزین و با یکدیگر مخلوط شدند و به آنها آب اضافه شد. خمیر حاصله توسط چرخ گوشت با اندازه چشمه ۲ میلی‌متر پلت شده و برای خشک کردن به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا در دمای اتاق قرارگرفت و پلت‌های خشک شده در کیسه‌های پلاستیکی و در دمای یخچال (۲۰- °C) نگهداری شدند.

کارایی رشد

در انتهای دوره آزمایش ماهیان برای تعیین کارایی رشد، ابتدا به‌مدت ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع غذا شده و بعد از بیهوشی با عصاره گل میخک با استفاده از سوزن قطع نخاع شدند (Zamani and Khajavi, 2019). سپس شاخص‌های افزایش وزن بدن (WG)[1]، نرخ رشد ویژه (SGR)[2]، شاخص وضعیت (CF)[3]، ضریب تبدیل غذایی (FCR)[4]، نرخ بقا (SR)[5]، کارایی مصرف پروتئین (PER)[6] و کارایی مصرف چرب (LER)[7] با استفاده از

1- Weight Gain
2- Specific Growth Rate
3- Condition Factor
4- Feed Conversion Ratio
5- Survival Rate
6- Protein Efficiency Ratio
7- Lipid Efficiency Ratio

روابط زیر محاسبه شد که در آنها W0 وزن اولیه (گرم)، Wt وزن نهایی (گرم)، t تعداد روزهای پرورش، BW وزن نهایی بدن (گرم)، TL درازای کل (سانتی متر)، Nb (تعداد ماهیان در شروع دوره آزمایش) و Nt (تعداد ماهیان در انتهای دوره آزمایش) است (Hamza et al. 2008).

- افزایش وزن بدن
- نرخ رشد ویژه
- شاخص وضعیت
- ضریب تبدیل غذایی
- نرخ بقا
- کارایی مصرف پروتئین
- کارایی مصرف چربی

$$WG = Wt - W0$$
$$SGR = [(LnWt - LnW0) / t] \times 100$$
$$CF = [(BW / TL^3)] \times 100$$
$$FCR = \text{Feed intake} / WG$$
$$SR = (Nt / Nb) \times 100$$
$$PER = WG / \text{total amount of protein ingested}$$
$$LER = WG / \text{total amount of lipid ingested}$$

تعیین ترکیب شیمیایی جیره غذایی

برای تعیین ترکیب شیمیایی از روش AOAC استفاده شد (AOAC, 2005). میزان رطوبت بر اساس اختلاف وزن حاصل از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۰۵ °C به‌دست آمد. میزان پروتئین خام از روش کلدال، میزان چربی خام با استفاده از روش سوکسله و میزان خاکستر نیز با سوزاندن نمونه خشک شده در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ °C و برای مدت ۵ ساعت اندازه‌گیری شد.

تست استرس

برای بررسی میزان مقاومت بچه‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی، نسبت به محدودیت اکسیژن، در پایان دوره پرورش تعداد بچه‌ماهیان هر تکرار به ۱۰ عدد کاهش یافت. سپس، بچه‌ماهیان با استفاده از ساچوک از آب خارج، و پس از ۳۰ ثانیه به مخزن بازگردانده شدند و برای ارزیابی میزان آنزیم‌های ضد اکسایشی، ۳ ساعت پس از اعمال استرس نمونه‌برداری انجام شد (Kumari and Sahoo, 2005).

تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم

برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (تریپسین و آمیلاز)، بعد از کالبد شکافی ماهیان، جداسازی روده در حضور یخ انجام شد. سپس نمونه‌ها توزین، و با بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس- HCl، pH = ۸/۰ (حاوی ۱۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ۰/۵ مولار NaCl) با نسبت ۱ به ۱۰ مخلوط شدند (Zamani et al. 2023). برای تعیین فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی (SOD و کاتالاز)، ابتدا بافت عضله جدا شد و سپس به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر فسفات سدیم (۰/۱ مولار، pH ۷) مخلوط شد (dos Santos Carvalho et al. 2012). هر دو مخلوط حاصله با استفاده از هموژنایزر (مدل Hand Held WT130) در حضور یخ به مدت ۱ دقیقه در ۱۱۰۰۰ rpm همگن‌سازی شدند. سپس، سوسپانسیون‌های حاصله برای ۳۰ دقیقه در دمای ۴ °C در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم انتخاب شد. فعالیت آنزیم تریپسین با استفاده از سوبسترای BAPNA[1] سنجش، و جذب پارانیتروآنیلید رهاسازی شده در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد (Erlanger et al. 1961). سنجش آنزیم آمیلاز با استفاده از نشاسته به عنوان سوبسترا و دی نیتروسالیسیلیک اسید به عنوان معرف انجام شد و جذب مالتوز رهاسازی شده در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bernfeld, 1951). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Aebi (۱۹۷۴) و از طریق کاهش غلظت میزان H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. فعالیت آنزیم SOD بر اساس روش Winterbourn و همکاران (۱۹۷۵)، با استفاده از NBT[2] در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجش شد. در تمام سنجش‌ها برای نمونه شاهد از آب مقطر به‌جای نمونه آنزیمی استفاده شد و قرائت نوری نمونه‌ها با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. برای تعیین فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد مطالعه، میزان پروتئین محلول در روده و عضله با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و با استفاده از

1-Nα-Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide hydrochloride

2- Nitro Blue Teuazlium chloride

آلبومین سرم گاوی (۱ mg/mL) به عنوان استاندارد سنجش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه بر اساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی طراحی، و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با کمک آزمون Kolmogorov-Smirnov ارزیابی، و آزمون همگنی واریانس نیز توسط تست Levene انجام شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین شاخص‌های رشد و آنزیم های پروتئازی در جیره‌های آزمایشی با ۳ تکرار از آزمون واریانس یک‌طرفه استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند.

جدول ۱ اجزا و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی جهت تغذیه بچه ماهی کپور گلگون (*C. rubrofuscus*)

Table 1 Ingredients and proximate composition of experimental diets for feeding of koi (*C. rubrofuscus*) fry

	D_1	D_2	D_3	D_4
Fish meal	100	100	100	100
Soybean meal[1]	390	390	390	390
Corn gluten	80	80	80	80
Wheat flour	350	350	350	350
Soybean oil	20	20	20	20
Fish oil	35	35	35	35
Mineral premix[2]	2.5	2.5	2.5	2.5
Vitamin premix[3]	5	5	5	5
Antioxidant	0.2	0.2	0.2	0.2
Methionine	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamin C	2	2	2	2
Toxin binder	5	5	5	5
Choline chloride	2	2	2	2
Carrot powder	0	2	0	1
Red bell pepper powder	0	0	2	1
Carrier	6.8	4.8	4.8	4.8
Proximate analysis of the experimental diets (%)				
Moisture	6.60	6.50	6.55	6.50
Crude protein	35.68	35.66	35.47	35.41
Crude fat	7.57	7.45	7.61	7.55
Ash	5.80	5.91	5.87	5.73
Carbohydrate	44.35	44.48	44.50	44.71
Gross energy (kcal/g)[4]	4.55	4.54	4.55	4.56

۱- آکوپرو (تولید شده در شرکت یسنا مهر): سویای فرآوری شده. میزان پروتئین ۵۱٪، انرژی قابل متابولیسم ۲۸۷۰ kcal/kg، رطوبت ۱۲٪، خاکستر ۷٪، چربی ۲/۸٪، فیبر خام ۴٪، نشاسته ۵٪ و قند ۹٪ است.

۲- مکمل معدنی (میلی‌گرم/کیلوگرم): حاوی کبالت (۳۴۵ میلی‌گرم)، سلنیوم (۱۷۲ میلی‌گرم)، آهن (۲۲۰۰۰ میلی‌گرم)، منگنز (۱۸۰۰۰ میلی‌گرم)، ید (۲۰۸۰ میلی‌گرم)، روی (۳۵۲۰۰ میلی‌گرم)، مس (۲۴۰۰ میلی‌گرم) است.

۳- مکمل ویتامینی (میلی‌گرم/کیلوگرم): ویتامین A (۶۷۸۰ میلی‌گرم)، ویتامین D (۸۴۸ میلی‌گرم)، ویتامین E (۱۶۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین K (۱۲۰۰میلی‌گرم)، ویتامین C (۷۰۰۰۰ میلی‌گرم)، تیامین (۴۰۰۰ میلی‌گرم)، ریبوفلاوین (۴۰۰۰ میلی‌گرم)، پیریدوکسین (۳۶۰۰ میلی‌گرم)، سیانوکوبالامین (۱۶ میلی‌گرم)، اینوزیتول (۱۶۰۰۰۰ میلی‌گرم)، پانتوتنیک اسید (۱۸۰۰۰ میلی‌گرم)، فولیک اسید (۳۲۰۰ میلی‌گرم)، بیوتین (۴۰۰ میلی‌گرم) و نیاسین (۳۰۰۰۰ میلی‌گرم).

۴- پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت بر حسب درصد ماده خشک است و محاسبه کربوهیدرات بر حسب رابطه (پروتئین + چربی + خاکستر+ رطوبت)- ۱۰۰ و محاسبه انرژی ناخالص بر حسب کیلوکالری بر گرم جیره از رابطه حاصل ضرب مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۵/۶۵ kcal)، چربی(۹/۴۵ kcal) و کربوهیدرات (۴/۱۱ kcal) تعیین شد (NRC, 2011).

نتایج

نتایج مربوط به شاخص‌های رشد بچه ماهیان کپور گلگون تغذیه شده با پودر هویج و فلفل دلمه قرمز در جدول ۲ نشان داده شده است. مقادیر شاخص‌های رشد بررسی شده شامل وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت، ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی چربی و نسبت کارایی پروتئین نشان داد که بین جیره‌های غذایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین، در مورد نرخ بقا هیچ گونه تلفاتی در طی دوره پرورش مشاهده نشد.

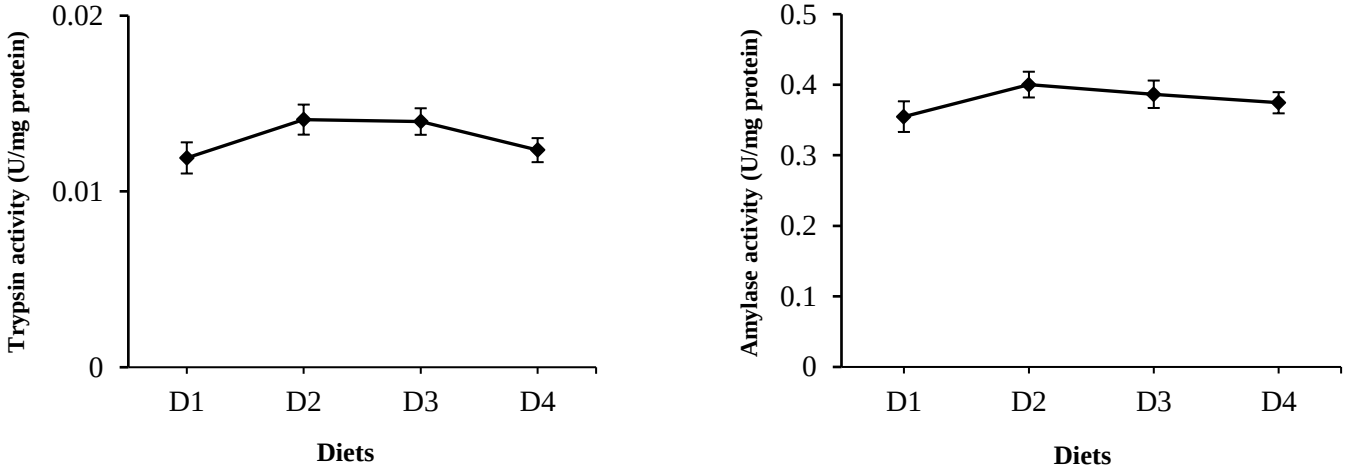
نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی در روده بچه ماهی کپورگلگون تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی در شکل۱ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم تریپسین و آمیلاز نشان داد که بین جیره‌های غذایی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، هرچند که در تیمار D_2 سطح فعالیت این آنزیم‌ها بالاتر بود.

نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی SOD و کاتالاز در عضله ماهیان تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی به ترتیب در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم SOD و کاتالاز در تیمارهای D_2، D_3 و D_4 نسبت به D_1 در هر دو مرحله پیش از استرس و پس از استرس کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$)، درحالی که بین تیمارهای D_2، D_3 و D_4 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. فعالیت آنزیم SOD و کاتالاز در تیمار D_1 در مرحله پس از استرس افزایش معنی‌داری نسبت به مرحله پیش از استرس داشت ($p<۰/۰۵$)، در حالی‌که در جیره‌های D_2، D_3 و D_4 افزایش معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲ شاخص‌های رشد بچه ماهی کپور گلگون (*C. rubrofuscus*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

Table 2 Growth performance of koi (*C. rubrofuscus*) fry fed with experimental diets

Parameters	Experimental diets			
	D1	D2	D3	D4
Initial BW (g)	1.10 ± 0.20	1.10 ± 0.20	1.10 ± 0.20	1.10 ± 0.20
Final BW (g)	3.63 ± 0.41	3.91 ± 0.37	3.85 ± 0.28	3.71 ± 0.26
WG (g)	2.53 ± 0.34	2.81 ± 0.37	2.75 ± 0.48	2.61 ± 0.29
SGR (%/day)	2.13 ± 0.63	2.26 ± 0.51	2.23 ± 0.51	2.17 ± 0.41
CF	0.90 ± 0.07	1.05 ± 0.17	1.01 ± 0.14	0.94 ± 0.08
FCR	1.90 ± 0.37	1.82 ± 0.43	1.85 ± 0.31	1.90 ± 0.66
SR	100	100	100	100
LER	0.33 ± 0.07	0.38 ± 0.05	0.36 ± 0.06	0.35 ± 0.05
PER	0.071 ± 0.005	0.079 ± 0.006	0.078 ± 0.003	0.074 ± 0.004



شکل ۱ فعالیت آنزیم‌های تریپسین و آمیلاز از روده بچه ماهی کپور گلگون (*C. rubrofuscus*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایش

Figure 1 Trypsin and amylase activity from intestine of koi (*C. rubrofuscus*) fry fed with experimental diets. Absence of lower case indicates no significant difference in enzyme activity (Ave ± SD, n=3, p>0.05).

جدول ۳ فعالیت آنزیم SOD در بافت عضله بچه ماهی کپور گلگون (*C. rubrofuscus*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

Table 3 SOD activity from tissue of koi (*C. rubrofuscus*) fry fed with experimental diets

Experimental diets	Before stress	After stress
D1	0.18 ± 0.01^{Aa}	0.24 ± 0.02^{Ba}
D2	0.12 ± 0.04^{Ab}	0.15 ± 0.03^{Ab}
D3	0.12 ± 0.03^{Ab}	0.16 ± 0.03^{Ab}
D4	0.13 ± 0.04^{Ab}	0.16 ± 0.05^{Ab}

Non-common lowercase letters in each column and non-common uppercase letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

جدول ۴ فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت عضله بچه ماهی کپور گلگون (*C. rubrofuscus*) تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی

Table 4 Catalase activity from tissue of Koi (*C. rubrofuscus*) fry fed with experimental diets

Experimental diets	Before stress	After stress
D1	0.12 ± 0.01^{Aa}	0.14 ± 0.04^{Ba}
D2	0.09 ± 0.01^{Ab}	0.10 ± 0.01^{Ab}
D3	0.09 ± 0.02^{Ab}	0.10 ± 0.01^{Ab}
D4	0.10 ± 0.01^{Ab}	0.11 ± 0.02^{Ab}

Non-common lowercase letters in each column and non-common uppercase letters in each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

بحث

کاروتنوئیدها از رایج‌ترین رنگدانه‌هایی هستند که در طیف وسیعی از عملکردهای فیزیولوژیک نقش دارند و به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های زیستی مهم، می‌توانند دستگاه ایمنی جانوران را تقویت کنند و نقش واسط در سوخت و ساز داشته باشند (Segner et al. 1989; Svensson and Wong, 2011). استفاده از این رنگدانه‌ها مانند آستازانتین سوخت و ساز چربی را تسریع کرده و با صرفه‌جویی در مصرف پروتئین، رشد جانور را از طریق افزایش جذب مواد مغذی بهبود می‌بخشد (Kalinowski et al. 2011). با وجود این، اثرات منابع غذایی مختلف کاروتنوئید بر رشد و بقای جانوران آبزی نتایج متفاوتی داشته است (Amar et al. 2001; Niu et al. 2009). در مطالعه حاضر، استفاده از پودر گیاه هویج و فلفل دلمه قرمز به عنوان منابع کاروتنوئید تأثیر مثبتی بر شاخص‌های رشد بچه ماهی کپور گلگون داشت. در برخی مطالعات مشخص شده است که استفاده از رنگدانه‌هایی مانند آستازانتین تأثیری بر رشد ماهی مانند میش ماهی زرد (*Larimichthys crocea*)، بادکنک ماهی (*Takifugu obscurus*) و شانک معمولی (*Pagrus pagrus*) نداشته است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. برخی مطالعات نیز نشان داده‌اند که استفاده از مقدار مناسب این رنگدانه‌ها مانند آستازانتین در جیره غذایی تأثیر مثبتی بر رشد ماهیان داشته است (Jagruthi et al. 2014; Li et al. 2014; Song et al. 2017; Lim et al. 2019; Chen et al. 2020). همچنین، استفاده از این رنگدانه‌ها در غلظت‌های بسیار بالا نیز اثر منفی روی رشد ماهیان داشته است. نتایج مطالعه Xie و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که آستازانتین در جیره غذایی گیش ماهی طلایی (*Trachinotus ovatus*) ضریب هضم ظاهری و بیان فاکتورهای رشد شبه انسولین (IGFs) را افزایش می‌دهد. Rana و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه خود نشان دادند که ماهی دم شمشیری (*X. helleri*) تغذیه شده با جیره غذایی حاوی پودر گل همیشه بهار نسبت به گروه شاهد از عملکرد رشد بهتری به خصوص ضریب تبدیل غذایی پایین برخوردار بودند. Kop و Durmaz (۲۰۰۸) گزارش کردند که اثر بخشی کاروتنوئیدها از نظر انباشتگی در بافت و عملکرد فیزیولوژیک، وابسته به گونه ماهی است و مسیرهای مختلفی برای سوخت و ساز کاروتنوئیدها در گونه‌های مختلف وجود دارد که هنوز به وضوح مشخص نیست. از دیگر عواملی که ممکن است منجر به نتایج فوق در مطالعات مختلف شده باشد، اندازه ماهی و رفتار تغذیه‌ای آبزیان است.

در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم‌های گوارشی تریپسین و آمیلاز در جیره‌های حاوی کاروتنوئید نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان نداد. تریپسین آنزیم آندوپروتئینازی است که می‌تواند پروتئین را به پپتیدها و اسیدهای آمینه

تبدیل کند تا جذب آنها سریع‌تر انجام شوند. آمیلاز نیز نوعی آنزیم کربوهیدرازی است که می‌تواند نشاسته را به مالتوز هیدرولیز کرده و سپس مالتوز تحت آنزیم مالتاز به گلوکز شکسته شود تا در روده جذب شود. فعالیت آنزیم‌های گوارشی به طور مستقیم یا غیرمستقیم ظرفیت تغذیه را تعیین می‌کنند و بر رشد ماهی تأثیر می‌گذارند. مطالعه Hassaan و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که استفاده از بتاکاروتن و فیکوسیانین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های تریپسین و آمیلاز در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) می‌شود. آنها گزارش کردند که استفاده از رنگدانه‌ها در جیره غذایی در سطوح مناسب بر رشد میکروب‌های مفید روده تأثیر گذاشته و از طریق ترشح آنزیم‌های گوارشی باعث بهبود عملکرد رشد می‌شود. مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که استفاده از رنگدانه آستازانتین به طور معنی‌دار باعث افزایش آنزیم‌های گوارشی مانند تریپسین و آمیلاز در ماهی هامور (*Plectropomus leopardus*) می شود، ولی افزایش مقدار رنگدانه در سطوح بالاتر باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه کاهش رشد می‌شود. در مطالعه حاضر نیز بین میزان آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه و شاخص‌های رشد ارتباط مستقیم وجود داشت، به طوری که در بچه ماهیان تغذیه شده با پودر کاروتنوئید میزان آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های رشد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان نداد.

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز نشان داد که در تیمارهای D_2، D_3 و D_4 نسبت به D_1 در هر دو مرحله پیش از و پس از استرس کاهش معنی‌دار داشتند و در جیره D_1 در مرحله پس از استرس افزایش معنی‌داری نسبت به مرحله پیش از استرس مشاهده شد، در حالی که در جیره‌های D_2، D_3 و D_4 افزایش معنی‌دار مشاهده نشد. رادیکال‌های آزاد ترکیباتی هستند که در طی فرایند سوخت و ساز هوازی طبیعی در بدن جانوران تولید می‌شوند، جایی که واکنش‌های مربوط به استرس ممکن است غلظت این رادیکال‌ها را افزایش داده و در نتیجه آسیب بدنی را به همراه داشته باشد. اثرات منفی این رادیکال‌ها توسط دفاع ضد اکسایشی خنثی می‌شود. در مهره‌داران عالی مانند ماهیان، دو نوع دفاع ضد اکسایشی وجود دارد: دفاع غیرآنزیمی (ویتامین‌ها و مولکول‌هایی مانند گلوتاتیون) و دستگاه آنزیمی شامل SOD و کاتالاز (Liu et al. 2010; Halliwell and Gutteridge, 2015). آنزیم‌های ضد اکسایشی SOD و کاتالاز، نقش مهمی در جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ایفا می‌کنند. SOD آنزیمی سیتوزولیک بوده و اولین آنزیمی است که به‌طور خاص واکنش‌های مربوط به رادیکال‌های سوپراکسید را کاتالیز می‌کند و با رادیکال‌های اکسیژن واکنش می‌دهد که منجر به تولید H_2O_2 می‌شود و برای یاخته سمی است (Xie et al. 2017). در مقابل، آنزیم کاتالاز تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز (تسریع) می‌کند. کاروتنوئیدها به عنوان ضد اکسایش‌های زیستی مهم از طریق حذف رادیکال‌های آزاد، دستگاه دفاعی و ایمنی جانوران را تقویت می‌کنند که این توانایی به ظرفیت ضد اکسایشی آنها بستگی دارد (Nakano, 2020). اگرچه فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی با میزان کاروتنوئید غذا رابطه عکس دارد، ولی اطلاعات درباره اثرات مفید بالقوه آن در وضعیت اکسیداتیو ماهی و مکانیسم‌های تحت کنترل آن اندک است. بنابراین، سطوح SOD و کاتالاز وضعیت ضد اکسایشی ماهی را منعکس می‌کند و سطوح بالای این آنزیم‌ها همواره نشان دهنده میزان بالای رادیکال‌های آزاد است که باید مهار شوند (Ross et al. 2001). در مطالعه Lygren و همکاران (۱۹۹۹) مشخص شد که سطوح بالای ضداکسایش‌های محلول در چربی مانند آستازانتین در جیره غذایی ماهیان دو تابستانه آزاد اطلس، نیاز به آنزیم‌های ضد اکسایشی مانند SOD و کاتالاز را برای مهار به ترتیب رادیکال اکسیژن و H_2O_2 کاهش می‌دهد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که عصاره‌های تهیه شده از منابع طبیعی اثر مهارکننده بالایی روی رادیکال‌های آزاد دارند و توالی‌های اکسایش را در سطوح مختلف تجزیه می‌کنند (Rahman et al. 2016). در مطالعه Niu و همکاران (۲۰۱۲) استفاده از کاروتنوئیدها شامل آستازانتین و کانتازانتین در جیره غذایی میگو ببری سیاه (*Penaeus monodon*) نشان داد که میزان آنزیم SOD بعد از شوک کوتاه مدت اکسیژنی نسبت به گروه شاهد که غذای فاقد رنگدانه را دریافت کردند، در سطوح پایین‌تری قرار داشت. نتایج مطالعه Li و همکاران (۲۰۱۸) در استفاده از جلبک تک یاخته ای سبز آب شیرین (*Haematococcus pluvialis*) حاوی رنگدانه طبیعی آستازانتین در جیره غذایی ماهی پاروت (*Cichlasoma citrinellum* × *Cichlasoma synspilum*) نشان داد که ماهیان تغذیه شده با این رنگدانه، نسبت به گروه شاهد از سطح آنزیم SOD پایین‌تری برخوردار بودند.

به طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پودر هویج و فلفل دلمه قرمز در جیره غذایی بچه ماهی کپور گلگون در سطح ۲٪ تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و

فعالیت آنزیم‌های گوارشی ندارد، ولی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی کاروتنوئید نسبت به جیره فاقد کاروتنوئید در هر دو مرحله پیش از استرس و پس از استرس کاهش معنی‌داری وجود داشت. لذا پیشنهاد می‌شود که سطوح بالاتر پودر این گیاهان در تغذیه بچه ماهی کپور گلگون بررسی شود تا سطوح مطلوب‌تری از این گیاهان در جیره غذایی شناسایی شود.

منابع

Abd El-Gawad, E.A., Wang, H.P., Yao, H. 2019. Diet supplemented with synthetic carotenoids: Effects on growth performance and biochemical and immunological parameters of yellow perch (*Perca flavescens*). Frontiers in physiology 10: 1056. doi: 10.3389/fphys.2019.01056.

Adhami, B., Jafari, S., Janikhalili, K. 2017. Effect of natural (carrot and beetroot) and artificial pigments (astaxanthin) on growth, blood indices, and colour changes in skin, tissue and blood in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Science and Technology 5: 1-11.

Aebi, H. 1974. Catalase. In: *Bergmayer*, H.U. Methods of Enzymatic Analysis. New York, Academic Press, 1248 p.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. 2001. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 32: 162-173. doi: 10.1046/j.1355-557x.2001.00051.x

AOAC. 2005. Official Method 950.89. Horwitz, W., Latimer, G. (Eds). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.

Bano, F., Kashyap, A., Serajuddin, M. 2020. Effects of different dietary supplementation of plant carotenoids on growth, coloration and behavior of giant gourami, *Trichogaster fasciata* (Bloch and Schneider, 1801). Iranian Journal of Fisheries Sciences 19: 2770-2789. doi: 10.22092/ijfs.2020. 122739.

Bernfeld, P. 1951. Amylases α and β. In: *Methods in Enzymology*. Colowick, P., Kaplan, N.O. (Eds.). Vol. 1. New York, Academic Press, 149-157.

Beygi Kaleshtari, A., Hosseini, S.V., Farhangi, M., Rafiee, G. 2019. Replacement of carrot powder with synthetic astaxanthin in the rainbow trout diet: effect on the growth performance and blood parameters. Aquatic Animals Nutrition 5: 59-70. doi: 10.22124/janb.2019.13473.1059

Bora, M.M., 2010. Adsorption of pigment from annatto seed utilizing fish scale as biosorbent. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 2: 75-83.

Chen, X.M., Gao, C.S., Du, X.Y., Yao, J.M., He, F.F., Niu, X.T., Wang, G.Q., Zhang, D.M. 2020. Effects of dietary astaxanthin on the growth, innate immunity and antioxidant defense system of *Paramisgurnus dabryanus*. Aquaculture Nutrition 26: 1453-1462. doi: 10.1111/anu. 13093.

Cheng, C.H., Guo, Z.X., Ye, C.X., Wang, A.L. 2018. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. Fish Physiology and Biochemistry 44: 209-218. doi: 10.1007/s10695-017-0425-5.

dos Santos Carvalho, C., Bernusso, V.A., de Araújo, H.S.S., Espíndola, E.L.G., Fernandes, M.N. 2012. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. Chemosphere 89: 60-69. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.013.

Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics 95: 271-278.

FAO. 2022. Fishery and Aquaculture Statistics. Global Aquaculture Production 1950–2020 (Fish Stat J). FAO Fisheries and Aquaculture Department [Online]; FAO: Rome, Italy: Available online:

Goodwin, T.W. 1984. The Biochemistry of Carotenoids, 2nd ed. Chapman & Hall, London, 64-96.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, USA.

Hamza, N., Mhetli, M., Khemis, I.B., Cahu, C., Kestemont, P. 2008. Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Aquaculture 275: 274-82. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.014.

Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Soaudy, M.R., Sabae, S.A., Mahmoud, A.M., El-Haroun, E.R. 2021. Comparative study on the effect of dietary β-carotene and phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia,

Oreochromis niloticus. Fish and Shellfish Immunology 108: 63-72. doi: 10.1016/j.fsi.2020.11.012.

Iranian Fisheries Organization. 2021. Annual report. Ghorbanzade, R.A., Nazari, S. (Eds.). Available online: http:// www.khzshilat.ir/Content/media/image/2022/12/2372_orig.pdf.

Jagruthi, C., Yogeshwari, G., Anbazahan, S.M., Mari, L.S.S., Arockiaraj, J., Mariappan, P., Sudhakar, G.R.L., Balasundaram, C., Harikrishnan, R. 2014. Effect of dietary astaxanthin against *Aeromonas hydrophila* infection in common carp, *Cyprinus carpio*. Fish and Shellfish Immunology 41: 674-680. doi: 10.1016/j.fsi.2014.10.010.

Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Izquierdo, M.S. 2011. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, lipid composition and post-mortem skin coloration of red porgy *Pagrus pagrus*. Aquaculture International 19: 811-823. doi: 10.1007/s10499-010-9401-0.

KasAlipour, M., Khara, H., Sadeghpour, A. 2020. Effects of astaxanthin, red pepper and orange pepper on growth, coloration, hematological and immunology factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*). Applied Biology 32: 38-57. doi: 10.22051/jab.2019.17324.1185

Kop, A., Durmaz, Y. 2008. The effect of synthetic and natural pigments on the color of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). Aquaculture international 16: 117-122. doi: 10.1007/s10499-007-9130-1.

Kumari, J., Sahoo, P.K. 2005. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. Molecular and Cellular Biochemistry 280: 25-33. doi: 10.1007/s11010-005-8011-z.

Li, F., Huang, S., Lu, X., Wang, J., Lin, M., An, Y., Wu, S., Cai, M. 2018. Effects of dietary supplementation with algal astaxanthin on growth, pigmentation, and antioxidant capacity of the blood parrot (*Cichlasoma citrinellum* × *Cichlasoma synspilum*). Journal of Oceanology and Limnology 36: 1851-1859. doi: 10.1007/s00343-019-7172-7.

Li, M., Wu, W., Zhou, P., Xie, F., Zhou, Q., Mai, K. 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* on growth performance, antioxidant status and immune response of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture 434: 227-232. doi: 10.1016/ j.aquaculture.2014.08.022.

Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., Kamarudin, M.S. 2019. Dietary administration of astaxanthin improves feed utilization, growth performance and survival of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). Aquaculture Nutrition 25: 1410-1421. doi: 10.1111/anu.12961.

Liu, J., Zhang, X., Sun, Y., Lin, W. 2010. Antioxidative capacity and enzyme activity in *Haematococcus pluvialis* cells exposed to superoxide free radicals. Chinese Journal of Oceanology and Limnology 28: 1-9. doi: 10.1007/s00343-010-9244-6.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Lygren, B., Hamre, K., Waagbø, R. 1999. Effects of dietary pro-and antioxidants on some protective mechanisms and health parameters in Atlantic salmon. Journal of Aquatic Animal Health 11: 211-221. doi: 10.1577/1548-8667(1999)011<0211:EODPAA>2.0.CO;2

Maoka, T. 2020. Carotenoids as natural functional pigments. Journal of Natural Medicines 74: 1-16. doi: 10.1007/s11418-019-01364-x.

Martin, J.F., Gudiña, E., Barredo, J.L. 2008. Conversion of β-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? Microbial Cell Factories 7: 1-10. doi: 10.1186/1475-2859-7-3.

Mooraki, N., Dadgar, S.H., Naderi, M.S. 2013. Effect of *Petroselinum sativum* on growth performance and survival of koi carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture Development 8: 63-72.

Nakano, T. 2020. Stress in Fish and Application of Carotenoid for Aquafeed as an Antistress Supplement. Encyclopedia of Marine Biotechnology, 2999-3019. doi: 10.1002/9781119 143802.ch134.

Nakano, T., Wiegertjes, G. 2020. Properties of carotenoids in fish fitness: a review. Marine Drugs 18: 568. doi: 10.3390/md18110568.

Niu, J., Li, C.H., Liu, Y.J., Tian, L.X., Chen, X., Huang, Z., Lin, H.Z. 2012. Dietary values of astaxanthin and canthaxanthin in *Penaeus monodon* in the presence and absence of cholesterol supplementation: effect on growth, nutrient digestibility and tissue carotenoid composition. British Journal of

Nutrition 108: 80-91. doi: 10.1017/S0007114511005423

Niu, J., Tian, L.X., Liu, Y.J., Yang, H.J., Ye, C.X., Gao, W., Mai, K.S. 2009. Effect of dietary astaxanthin on growth, survival and stress tolerance of post-larval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 40: 795-802. doi: 10.1111/j.1749-7345. 2009.00300.x

NRC (National Research Council). 2011. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington DC, USA.

Rahman, M.M., Khosravi, S., Chang, K.H., Lee, S.M. 2016. Effects of dietary inclusion of astaxanthin on growth, muscle pigmentation and antioxidant capacity of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Preventive Nutrition and Food Science 21: 281. doi: 10.3746/pnf.2016.21.3.281

Rana, S., Al Bari, A., Shimul, S.A., Al Mazed, M., Al Nahid, S.A. 2023. Enhancement of body coloration of sword-tail fish (*Xiphophorus helleri*): Plant-derived bio-resources could be converted into a potential dietary carotenoid supplement. Heliyon, 9: e15208. doi: 10.1016/j. heliyon.2023.e15208.

Ross, S.W., Dalton, D.A., Kramer, S., Christensen, B.L. 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. Comparative Biochemistry and Physiology 130C: 289-303. doi: 10.1016/S1532-0456(01)00243-5.

Segner, H., Arend, P., Von Poeppinghausen, K., Schmidt, H. 1989. The effect of feeding astaxanthin to *Oreochromis niloticus* and *Colisa labiosa* on the histology of the liver. Aquaculture 79: 381-390. doi: 10.1016/0044-8486(89)90480-8.

Song, X., Wang, L., Li, X., Chen, Z., Liang, G., Leng, X. 2017. Dietary astaxanthin improved the body pigmentation and antioxidant function, but not the growth of discus fish (*Symphysodon* spp.). Aquaculture Research 48: 1359-1367. doi: 10.1111/are.13200.

Svensson, P.A., Wong, B.B.M. 2011. Carotenoid-based signals in behavioral ecology: a review. Behaviour 148: 131-189. doi:10.1163/000579510X548673.

Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M., Carrell, R.W. 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 85: 337-341. doi: 10.5555/uri:pii:0022214375904394.

Xie, J.J., Chen, X., Niu, J., Wang, J., Wang, Y., Liu, Q.Q. 2017. Effects of astaxanthin on antioxidant capacity of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) in vivo and in vitro. Fisheries and Aquatic Sciences 20: 1-8. doi: 10.1186/s41240-017-0052-1.

Yanar, Y., Büyükçapar, H., Yanar, M., Göcer, M. 2007. Effect of carotenoids from red pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. Food Chemistry 100: 326-330. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.056.

Yesilayer, N., Oz, M., Karsli, Z., Aral, O., Karaçuha, A., Oz, U. 2011. Growth performance and feed utilization of koi carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) fed partial or total replacement of fish meal with hazelnut meal and soybean meal. Journal of Animal and Veterinary Advances 10: 1956-1961. doi:10.3923/javaa.2011.1956.1961.

Zamani, A., Khajavi, M. 2019. Assessment of growth performance and proteolytic enzymes activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry fed by different levels of single cell protein. Iranian Scientific Fisheries Journal 28:103-115. doi: 10.22092/ISFJ.2019.119786.

Zamani, A., Khajavi, M., Abedian Kenari, A., Haghbin Nazarpak, M., Solouk, A., Esmaeili, M., Gisbert, E. 2023. Physicochemical and biochemical properties of trypsin-like enzyme from two sturgeon species. Animals 13: 853 doi: 10.3390/ani13050853.

Zhu, X., Hao, R., Zhang, J., Tian, C., Hong, Y., Zhu, C., Li, G. 2022. Dietary astaxanthin improves the antioxidant capacity, immunity and disease resistance of coral trout (*Plectropomus leopardus*). Fish and Shellfish Immunology 122: 38-47. doi: 10.1016/j.fsi.2022.01.037