University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 11, No. 4, 2026, pages: 85-106
DOI: 10.22124/janb.2026.34936.1319

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effects of dietary nanochitosan-encapsulated vitamin C on growth performance, feed utilization, and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Mehdi Rezaeisiahkoocheh[1], Seyed Abdolmajid Mousavi[2], Houman Rajabi Islami[1], Mehdi Shamsaie Mehregan[1], Nazanin Farhadyar[3]

1- Department of Fisheries, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Tehran

2- Department of Animal Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Varamin-Pishva, Varamin, Iran

3- Department of Chemistry, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Varamin-Pishva, Varamin, Iran

Received 03 November 2025 Revised 14 December 2025 Accepted 17 December 2025 Published online 01 October 2026

KEYWORDS

Nano-chitosan
Vitamin C
Fish nutrition
Growth performance
Rainbow trout

ABSTRACT

Introduction: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a premier cold-water aquaculture species and a valuable source of high-quality protein and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. As trout farming intensifies, feeding strategies must sustain rapid growth and optimal feed efficiency while safeguarding carcass quality against physiological and environmental stressors. Vitamin C (ascorbic acid) is an indispensable micronutrient for teleosts because they lack L-gulonolactone oxidase, the terminal enzyme required for endogenous ascorbic acid biosynthesis. This vitamin plays a critical role in collagen synthesis, skeletal ontogeny, wound healing, and non-specific antioxidant defense; deficiency severely impairs growth and compromises immunocompetence. However, crystalline ascorbic acid exhibits poor stability during feed processing, prolonged storage, and transit through the digestive tract, resulting in diminished bioavailability. Chitosan is a biodegradable, biocompatible, and mucoadhesive biopolymer capable of encapsulating and stabilizing delicate bioactive compounds. Dietary administration of chitosan and its nanoscale derivatives have been shown to enhance growth performance, nutrient utilization, mucosal intestinal integrity, antioxidant status, and systemic immunity in aquatic species. Nanoencapsulation can effectively shield ascorbic acid against oxidative degradation while facilitating controlled gastrointestinal release. Although

positive responses to nanochitosan-encapsulated vitamin C have been documented in warm-water species such as Nile tilapia and Pacific white shrimp, empirical evidence in salmonids remains scarce, as previous rainbow trout studies have primarily focused on conventional ascorbic acid or synergistic vitamin C-E regimens. Therefore, this study evaluated the effects of graded dietary inclusion levels of nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC) on growth performance, feed utilization, and carcass proximate composition. It was hypothesized that NC-VitC supplementation would non-linearly improve growth and feed conversion efficiency, optimizing carcass quality by promoting protein deposition and attenuating lipid accumulation at intermediate inclusion levels.

Materials and Methods: NC-VitC nanoparticles were synthesized via ionic gelation using low-molecular-weight chitosan, sodium tripolyphosphate (TPP), and L-ascorbic acid. A chitosan solution (2 mg/mL; pH 4.8-5.0) was homogenized with vitamin C and cross-linked with TPP at a 5:1 chitosan: TPP mass ratio. The resulting colloidal suspension was isolated via centrifugation, washed, lyophilized, and comprehensively characterized using DLS, FE-SEM, FTIR, XRD, and EDS. A vitamin C-free basal diet meeting the nutritional requirements of rainbow trout was formulated to contain 0, 25, 50, 100, or 200 mg NC-VitC/kg diet. Juvenile rainbow trout (initial body weight: 30.0 ± 1.0 g) were randomly stocked into 15 fiberglass tanks (300 L; 20 fish/tank; three replicate tanks per dietary treatment). Following a 10-day acclimation period, fish were hand-fed to apparent satiation four times daily for 68 days under controlled rearing conditions (water temperature: 14 ± 1 °C; dissolved oxygen: 7.5 ± 0.3 mg/L; pH 7.2-7.6). Biometric indices, feed utilization parameters, survival, and Fulton's condition factor were calculated using the tank as the experimental unit. Carcass moisture, crude protein, crude lipid, and ash were determined following standard AOAC protocols. Data were subjected to One-Way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test ($P<0.05$) and orthogonal polynomial contrasts (quadratic regression).

Results and Discussion: Physicochemical profiling confirmed the successful synthesis and loading of NC-VitC. Characteristic alterations in FTIR spectra across the O-H/N-H stretching regions, the 1700-1500/cm band, and the polysaccharide fingerprint confirmed the chemical entrapment of ascorbic acid. XRD spectra exhibited broad, diffuse haloes lacking sharp crystalline reflections, denoting an amorphous dispersion within the polymer matrix. DLS analysis revealed an intensity-weighted hydrodynamic diameter of 6399.8 ± 671.0 nm, whereas FE-SEM depicted discrete primary spherical nanoparticles ranging from 25.79 to 47.09 nm residing within visible clusters. This variance indicates that DLS measured secondary agglomerates in liquid suspension, an expected artifact stemming from the distinct operational principles of dynamic light scattering versus electron microscopy. EDS spectra displayed dominant carbon, nitrogen, and oxygen peaks, confirming an organic, contaminant-free polysaccharide scaffold. Dietary inclusion of NC-VitC significantly influenced final body weight, total weight gain, daily weight gain, specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER), and

condition factor, with no adverse effects on survival across treatments. Final body weight increased from 69.28 g in the unsupplemented control to 80.97 g in the 200 mg/kg group; overall weight gain escalated from 40.26 to 51.65 g, accompanied by an increase in SGR from 1.28 to 1.49%/day. The basal control diet yielded the highest FCR (1.50) and lowest PER (1.48), whereas the most favorable nutrient utilization indices were achieved at 50 and 200 mg/kg. Quadratic regression revealed non-linear plateau responses, predicting an optimum growth response at 150-170 mg NC-VitC/kg diet. This plateau phenomenon is consistent with micronutrient kinetics and tissue saturation profiles in teleosts, corroborating the biostimulatory effects of functional nano-carriers in aquatic feeds. However, because unencapsulated ascorbic acid and bare chitosan controls were not evaluated alongside, the specific carrier effects cannot be fully decoupled from the encapsulation synergy. Carcass moisture and ash contents were unaffected by dietary treatments. Conversely, whole-body crude protein peaked at 100 mg/kg (19.30%), coinciding with a minimum crude lipid level (8.80%), compared with 17.50% protein and 10.30% lipid in the control cohort. Quadratic models estimated optimal carcass composition within the 110-120 mg/kg inclusion range. Similar shifts in carcass composition have been documented following functional feed supplementation, reflecting enhanced nutrient deposition efficiency rather than verified alterations in hepatic lipogenesis. Overall, intermediate supplementation levels provided the optimal physiological balance between growth acceleration and carcass quality.

Conclusion: Dietary supplementation with nanochitosan-encapsulated vitamin C significantly improved somatic growth and feed utilization in juvenile rainbow trout under intensive culture conditions. Relative to the unsupplemented control, NC-VitC elevated final biomass, weight gain, and SGR, while concurrently lowering FCR and enhancing PER. Survival remained exceptionally high across all groups, demonstrating physiological safety. Second-order polynomial regression indicated an optimal dietary inclusion range of 150-170 mg/kg for maximal growth, whereas optimal carcass proximate composition was achieved at a lower threshold (110-120 mg/kg). Although the primary particles were nanoscale, their secondary aggregation in suspension highlights the necessity for advanced dispersion stabilization protocols in feed processing. While NC-VitC represents a potent functional aquafeed additive, parallel validation against free ascorbic acid and blank nanoparticles is recommended prior to commercial application.

*Corresponding author: seyedabdolmajid.mousavi@iau.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال یازدهم، شماره چهارم، دی ۱۴۰۴، صفحات ۱۰۶-۸۵

DOI: 10.22124/janb.2026.34936.1319

"مقاله پژوهشی"

اثرات ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان در جیره بر عملکرد رشد، کارایی خوراک و ترکیب لاشه قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهدی رضایی سیاهکوچه[۱]، سید عبدالمجید موسوی[۲*]، هومن رجبی اسلامی[۱]، مهدی شمسایی[۱]، نازنین فرهادیار[۳]

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه علوم دامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۳- گروه شیمی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۶ تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۷/۰۹

چکیده

در این مطالعه ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوسان (NC-VitC) به‌عنوان یک افزودنی عملکردی خوراک برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در شرایط متراکم بررسی شد. نانوکیتوسان ویتامین C به روش ژلاسیون یونی تهیه و در پنج تیمار آزمایشی شامل جیره شاهد (صفر) و جیره‌های حاوی ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم نانوکیتوزان ویتامین C به ازای هر کیلوگرم جیره (معادل ۴/۱۷ تا ۳۳/۳۳ میلی‌گرم معادل ویتامین C) وارد شد. ماهیان با وزن اولیه مشابه به مدت ۶۸ روز در مخازن سه‌تکراری با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. عملکرد رشد، کارایی خوراک بقا و ترکیب تقریبی لاشه ارزیابی شد. در مقایسه با شاهد، مکمل‌یاری جیره با نانوکیتوسان ویتامین C با افزایش وزن نهایی، افزایش وزن، افزایش وزن روزانه و نرخ رشد ویژه و نیز کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش نسبت کارایی پروتئین همراه بود (P<۰/۰۵). میزان بقا در همه تیمارها بالا باقی ماند. تحلیل رگرسیون درجه دوم نشان داد که پاسخ‌ها در بالاترین سطح افزودن کاهش حاشیه‌ای دارند و دامنه بهینه تقریبی ۱۵۰ تا ۱۷۰ میلی‌گرم نانوکیتوسان ویتامین C به ازای هر کیلوگرم جیره برای بیشینه‌سازی عملکرد رشد پیش‌بینی شد. رطوبت و خاکستر لاشه تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند، در حالی که پروتئین در سطح میانی افزایش و چربی در همان سطوح کاهش یافت. مطلوب‌ترین پاسخ‌های لاشه در دامنه تقریبی ۱۱۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم نانوکیتوسان ویتامین C به ازای هر کیلوگرم جیره مشاهده شد. در مجموع، تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم نانوکیتوزان ویتامین C با بهبود عملکرد رشد و استفاده از خوراک قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه بود، در حالی که پاسخ ترکیب لاشه در دامنه افزودن متفاوتی ظاهر شد.

کلمات کلیدی

نانوکیتوزان

ویتامین C

تغذیه ماهی

عملکرد رشد

قزل‌آلای رنگین‌کمان

نویسنده مسئول: : seyedabdolmajid.mousavi@iau.ac.ir

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های آب‌سرد در آبزی‌پروری جهانی و منبع مهمی از پروتئین باکیفیت و اسیدهای چرب بلندزنجیر n-3 برای مصرف انسان است (Overturf et al. 2013; Hernandez and Roman, 2016). تشدید مداوم پرورش قزل‌آلا، نیاز به راهبردهای تغذیه‌ای را افزایش داده است که رشد سریع و استفاده کارآمد از خوراک را در کنار حفظ کیفیت مطلوب لاشه، در شرایط تنش محیطی و فیزیولوژیک بالا، تقویت کنند (Hernandez and Roman, 2016; Naylor et al. 2021).

ویتامین C (اسید اسکوربیک) یک ویتامین ضروری برای ماهیان است، زیرا ماهیان استخوانی فاقد آنزیم ال-گولونولاکتون اکسیداز (L-gulonolactone oxidase) هستند و بنابراین، قادر به سنتز درون‌زاد آن نیستند. تأمین کافی ویتامین C از طریق جیره برای سنتز کلاژن، رشد اسکلتی، ترمیم زخم و دفاع ضد اکسایشی ضروری است. در مقابل، کمبود ویتامین C با اختلال رشد، ناهنجاری‌های اسکلتی، آسیب بافتی و افزایش حساسیت به تنش و بیماری در آزاد ماهیان و دیگر ماهیان پرورشی مرتبط دانسته شده است (Darias et al. 2011; Xu et al. 2016; Rahimnejad et al. 2021). با وجود این، اسید اسکوربیک طبیعی بسیار ناپایدار است و در طی فرآوری خوراک، نگهداری و هضم در معرض تخریب اکسایشی قرار می‌گیرد که ممکن است زیست‌فراهمی آن را به‌طور قابل‌توجهی کاهش دهد. این محدودیت به رواج استفاده از اشکال پایدارشده یا محافظت‌شده ویتامین C در خوراک‌های آبزیان منجر شده است (Carvalho et al. 2021).

کیتوزان، مشتق دهیداستیله‌شده کیتین، به‌عنوان یک زیست‌پلیمر عملکردی در تغذیه آبزیان توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده است. این ترکیب زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و موکوچسب است و می‌تواند نانوذراتی تشکیل دهد که قادر به کپسوله‌سازی ترکیبات زیست‌فعال هستند. گزارش شده است که کیتوزان جیره و نانوذرات مبتنی بر کیتوزان در چندین گونه ماهی موجب بهبود عملکرد رشد، کارایی خوراک، سلامت روده، وضعیت ضد اکسایشی و پاسخ‌های ایمنی می‌شوند (Abdel-Ghany and Salem, 2020; Hossam-Elden et al. 2024; Salam et al. 2021). هنگامی که کیتوزان به‌عنوان حامل ویتامین C استفاده می‌شود، نانوذرات کیتوزان می‌توانند از اسید اسکوربیک در برابر اکسایش محافظت کنند، زمان ماندگاری آن را در روده افزایش دهند و آزادسازی کنترل‌شده را امکان‌پذیر کنند؛ در نتیجه، اثربخشی زیستی آن افزایش می‌یابد. در راستای این مفهوم، استفاده از نانوفرمولاسیون‌های حاوی کیتوزان و ویتامین Cدر تیلاپیای نیل و میگوی سفید غربی با بهبود رشد، استفاده از خوراک و برخی شاخص‌های ایمنی همراه بوده است (Ibrahim et al. 2021; Asaikkutti et al. 2023; Elnagar et al. 2024). همچنین، در مطالعه‌ای که شکل معمولی و نانویی ویتامین C را مستقیماً مقایسه کرد، نانوویتامین C در شرایط آزمایشی مورد بررسی پاسخ‌های مطلوب‌تری ایجاد کرد (Sherif et al. 2024). با وجود این یافته‌های امیدوارکننده، اطلاعات مربوط به کاربرد ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان در آزاد ماهیان، به‌ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان، همچنان محدود است. مطالعات پیشین در قزل‌آلای رنگین‌کمان عمدتاً بر نیاز غذایی به ویتامین C با استفاده از منابع متداول یا بر اثرات ترکیبی ویتامین‌های C و E متمرکز بوده‌اند، نه بر سامانه‌های تحویل نانوکپسوله‌شده (NRC, 2011; Adel and Khara, 2016; Rahimnejad et al. 2021). در نتیجه، اثرات ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان بر عملکرد رشد، کارایی خوراک و ترکیب تقریبی لاشه، همچنین روابط پاسخ-دوز لازم برای تعیین سطوح عملی افزودن به جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان، به‌صورت نظام‌مند بررسی نشده است.

مطالعه حاضر اثرات سطوح مختلف ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان در جیره را بر عملکرد رشد، استفاده از خوراک و ترکیب تقریبی لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورش‌یافته تحت شرایط آزمایشی حاضر بررسی کرد. ماهیان به مدت ۶۸ روز با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح افزایشی ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان تغذیه شدند و شاخص‌های استاندارد عملکرد رشد، کارایی خوراک و ترکیب لاشه ارزیابی شد. فرض بر این بود که مکمل‌یاری جیره‌ای با ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (i) در مقایسه با شاهد عملکرد رشد و ضریب تبدیل غذایی را بهبود می‌دهد؛ (ii) در سطوح میانی افزودن، لاشه‌ای کم‌چرب‌تر و غنی‌تر از پروتئین ایجاد می‌کند؛ و (iii) الگوی پاسخ-دوز غیرخطی ایجاد می‌کند، به‌گونه‌ای که مطلوب‌ترین پاسخ‌ها در سطوح میانی افزودن به جیره حاصل شوند.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات کیتوزان-ویتامین C

نانوذرات ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC NPs) با استفاده از روش ژلاسیون یونی، مبتنی بر برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات سدیم (TPP)، مطابق پروتکل ارائه‌شده توسط Alishahi و همکاران (۲۰۱۱) سنتز شدند. نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با ویتامین C با استفاده از روش ژلاسیون یونی تهیه شدند. به‌طور خلاصه، کیتوزان در اسید استیک ۱٪ (وزنی/حجمی) حل شد و تا به‌دست‌آمدن محلولی شفاف و همگن، هم زده شد. محلول جداگانه‌ای از تری‌پلی‌فسفات سدیم (۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در آب دیونیزه تهیه شد. تشکیل نانوذرات با ترکیب محلول کیتوزان با حجم مساوی از محلول تری‌پلی‌فسفات سدیم آغاز شد و اتصال عرضی یونی خودبه‌خودی بین کیتوزان و تری‌پلی‌فسفات سدیم انجام شد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و تحت هم‌زدن ملایم نگهداری شد. برای بارگذاری ویتامین C، اسید اسکوربیک به پراکنه کیتوزان-تری‌پلی‌فسفات سدیم افزوده شد و مخلوط برای یک ساعت اضافی در دمای محیط به‌آرامی هم زده شد تا تشکیل نانوذرات و کپسوله‌شدن ویتامین تسهیل شود. سپس ذرات با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند. پس از حذف سوپرناتانت، رسوب به روش خشک‌کردن انجمادی خشک، و تا زمان استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مشخصه‌یابی نانوذرات

تحلیل پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

قطر هیدرودینامیکی نانوذرات با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی و دستگاه Zetasizer Nano ZS (شرکت Malvern Instruments، انگلستان) مجهز به لیزر ۶۳۳ نانومتری اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها مطابق پروتکل‌های استاندارد تحلیل نانوذرات انجام شد (Stetefeld et al. 2016). توزیع اندازه به‌صورت قطر هیدرودینامیکی متوسط z گزارش شد. گردآوری و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Malvern Dispersion Technology Software (نسخه ۴) انجام شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

تحلیل گروه‌های عاملی با استفاده از طیف‌سنجی FTIR و دستگاه طیف‌سنج Horiba FT-730 (کیوتو، ژاپن) انجام شد. نمونه‌های جامد با استفاده از روش قرص برومید پتاسیم (KBr)، مطابق توضیحات Stuart (۲۰۰۴)، آماده شدند. طیف‌ها در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر، با تفکیک‌پذیری طیفی ۴ بر سانتی‌متر و ۶۴ اسکن برای هر نمونه ثبت شدند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

ریخت‌شناسی سطح نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی محیطی (TESCAN, Brno, Czech Republic) بررسی شد. مطابق روش‌های استاندارد ریزتحلیل Chang و همکاران (۲۰۲۱)، سوسپانسیون‌های نانوذرات، ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر روی لام‌های شیشه‌ای قرار داده شدند، در دمای اتاق در معرض هوا خشک شدند و برای به‌حداقل رساندن شارژشدگی، با لایه‌ای نازک از طلا پوشش داده شدند. ولتاژ شتاب‌دهنده ۲۰ کیلوولت اعمال شد و توزیع اندازه ذرات از روی ریزنگاره‌ها با استفاده از نرم‌افزار SigmaScan Pro 5 برآورد شد.

طیف‌سنجی پرتو ایکس با تفکیک انرژی (EDS)

ترکیب عنصری نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنجی پرتو ایکس با تفکیک انرژی تعیین شد. تحلیل‌ها روی نمونه‌های پوشش‌داده‌شده با طلا که روی پایه‌های رسانا نصب شده بودند، با رعایت فراسنجه‌های تحلیلی توصیه‌شده برای نمونه‌های نانومقیاس توسط Newbury و Ritchie (۲۰۱۳) انجام شد. طیف‌های عنصری از نواحی نماینده، با استفاده از دستگاه JEOL-6610 LA (USA)، به‌منظور تأیید مشخصات عنصری نانوذرات به‌دست آمدند.

جیره‌های آزمایشی

تمامی مواد اولیه جیره از یک تولیدکننده تجاری خوراک آبزیان (شرکت پرشین فید، لردگان، ایران) تهیه شدند. یک جیره پایه بر اساس توصیه‌های NRC (۲۰۱۱) و با هدف تأمین نیازهای تغذیه‌ای قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان تهیه شد (جدول ۱). دیگر جیره‌های آزمایشی با افزودن چهار سطح افزایشی ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم

از نانوذرات کیتوزان ویتامین C به جیره پایه و با جایگزینی کربوکسی‌متیل‌سلولز به‌عنوان ماده چسباننده آماده شدند. این سطوح افزودن، به‌ترتیب معادل ۴/۱۷، ۸/۳۳، ۱۶/۶۷ و ۳۳/۳۳ میلی‌گرم ویتامین C در هر کیلوگرم جیره و همچنین معادل ۲۰/۸۳، ۴۱/۶۷، ۸۳/۳۳ و ۱۶۶/۶۷ میلی‌گرم کیتوزان در هر کیلوگرم جیره بودند. تمامی جیره‌ها به گونه‌ای فرموله شدند که از نظر میزان پرتئین و چربی یکسان باشند.

برای دستیابی به پراکنش یکنواخت نانوذرات، مقدار متناظر نانوذرات کیتوزان ویتامین C برای هر جیره ابتدا در حجم کمی از آب مقطر معلق شد و سپس هنگام آماده‌سازی خوراک به مخلوط افزوده شد. تمامی مواد خشک پیش از افزودن تدریجی روغن‌های جیره و سوسپانسیون آبی نانوذرات کیتوزان ویتامین C، به‌طور کامل با یکدیگر مخلوط شدند تا خمیری همگن حاصل شود. خمیرهای حاصل با استفاده از چرخ‌گوشت (National، ژاپن) مجهز به قالب ۳ میلی‌متری به‌صورت پلت درآمدند. پلت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در معرض هوا خشک شدند، در کیسه‌های متالایزشده به‌صورت وکیوم بسته‌بندی، و تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱ ترکیب مواد اولیه و آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC).

Table 1 Ingredient composition and proximate analysis of the experimental diets containing graded levels of nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC).

Ingredient composition (g/kg diet)	Control	T_1 (25mg/kg)	T_2 (50mg/kg)	T_3 (100mg/kg)	T_4 (200mg/kg)
Fish meal	420	420	420	420	420
Soybean meal	220	220	220	220	220
Corn gluten meal	100	100	100	100	100
Wheat flour	130	130	130	130	130
Fish oil	80	80	80	80	80
Soybean oil	20	20	20	20	20
Vitamin premix[1]	10	10	10	10	10
Mineral premix[1]	10	10	10	10	10
Dicalcium phosphate	5	5	5	5	5
Binder (CMC[2])	5	5	5	5	5
Proximate composition (%, as-fed basis)					
Crude protein	45	45	45	45	45
Crude lipid	~17	~17	~17	~17	~17
Ash	~9	~9	~9	~9	~9

[1] Vitamin and mineral premixes were formulated to meet or exceed the nutritional requirements of rainbow trout (NRC, 2011). The vitamin premix contained no vitamin C. The NC-VitC nanoformulation contained a nominal vitamin C content of 16.7% (w/w). Therefore, dietary supplementation with 25, 50, 100, and 200 mg NC-VitC/kg diet provided 4.17, 8.33, 16.67, and 33.33 mg vitamin C equivalents/kg diet, respectively, corresponding to 20.83, 41.67, 83.33, and 166.67 mg chitosan equivalents/kg diet. [2] CMC = Carboxymethyl Cellulose

جیره پایه شامل پودر ماهی، کنجاله سویا، گلوتن ذرت، آرد گندم، روغن ماهی، روغن سویا، پرمیکس‌های ویتامینی و معدنی، دی‌کلسیم فسفات و کربوکسی‌متیل‌سلولز (CMC) به‌عنوان چسباننده بود. تمام جیره‌ها به‌صورت هم‌نیتروژن و هم‌چربی فرموله شدند. پرمیکس ویتامینی تهیه شده از کارخانه تولید غذای آبزیان پرشین فید، فاقد ویتامین C بود و هیچ ویتامین C کریستاله به جیره پایه افزوده نشد.

ماهیان و شرایط پرورش

بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان از یک مزرعه تجاری قزل‌آلا نمرود فیروزکوه، تهیه و به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات منتقل شدند. پیش از آغاز آزمایش تغذیه، ماهیان به مدت ۱۰ روز با شرایط آزمایشی سازگار و با جیره پایه فاقد

ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان ویتامین C تغذیه شدند.

در آغاز آزمایش، ماهیان با میانگین وزن اولیه ۱ ± ۳۰ گرم به‌صورت تصادفی در ۱۵ مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری و با تراکم ۲۰ عدد ماهی در هر مخزن توزیع شدند. هر تیمار غذایی در سه مخزن تکرار شد.

در طی دوره تغذیه ۶۸ روزه، ماهیان در شرایط کنترل‌شده نگهداری شدند. دمای آب ۱ ± ۱۴ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۳ ± ۷/۵ میلی گرم در لیتر و pH در دامنه ۷/۲ تا ۷/۶ بود. دمای آب، اکسیژن محلول و pH با استفاده از دستگاه چندفراسنجه‌ای قابل‌حمل (AZ 8603, AZ Instrument Corp., Taiwan) روزانه پایش شدند. هوادهی پیوسته برای همه مخازن فراهم شد.

ماهیان با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با استفاده از نور مصنوعی نگهداری شدند. برای حفظ کیفیت آب، حدود ۳۰٪ آب هر مخزن به‌صورت روزانه تعویض شد. سلامت و رفتار ماهیان در طی آزمایش پایش شد و هیچ نشانه بالینی بیماری یا تلفات غیرطبیعی مشاهده نشد.

طرح آزمایشی و برنامه تغذیه

آزمایش تغذیه در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار غذایی انجام شد که شامل جیره شاهد فاقد ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) و چهار جیره آزمایشی مکمل‌شده با سطوح افزایشی نانوکیتوزان ویتامین C بود. هر تیمار در سه تکرار اجرا، و در مجموع ۱۵ مخزن آزمایشی استفاده شد.

ماهیان در طی دوره آزمایشی ۶۸ روزه، چهار بار در روز و در ساعت‌های ۰۸:۰۰، ۱۲:۰۰، ۱۶:۰۰ و ۲۰:۰۰، با دست و تا حد سیری ظاهری تغذیه شدند. مقدار خوراک ارائه‌شده در هر وعده ثبت شد و خوراک مصرفی با کم‌کردن خوراک باقی‌مانده از کل خوراک ارائه‌شده برآورد شد. برای کاهش آبشویی مواد مغذی و افزایش دقت برآورد خوراک مصرفی، پلت‌ها به‌تدریج و در بخش‌های کوچک ارائه شدند تا بلافاصله مصرف شوند. خوراک باقی‌مانده ۳۰ دقیقه پس از تغذیه با سیفون جمع‌آوری، خشک و وزن شد.

مقدار خوراک با توجه به تغییرات زی‌توده مخزن، که در فواصل دو هفته‌ای با توزین تجمیعی ماهیان هر مخزن تعیین می‌شد، به‌طور دوره‌ای تنظیم شد. شاخص‌های عملکرد رشد و کارایی خوراک، شامل افزایش وزن، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و بقا، در پایان آزمایش با استفاده از معادلات استاندارد محاسبه شدند.

عملکرد رشد و کارایی خوراک

در آغاز و پایان دوره تغذیه ۶۸ روزه، پس از ۲۴ ساعت گرسنگی برای به حداقل رساندن تغییرات ناشی از محتویات دستگاه گوارش، ماهیان هر مخزن برای به دست آمدن وزن میانگین هر مخزن به‌صورت تجمیعی وزن شدند. وزن بدن با استفاده از ترازوی دیجیتال سکوئی (Mahak, MHK-40KG, Iran؛ دقت ۲ گرم) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، درازای کل زیرنمونه‌ای از ماهیان هر مخزن با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و با استفاده از تخته اندازه‌گیری ثبت شد.

خوراک مصرفی در سطح مخزن در طول آزمایش ثبت شد و کل خوراک خشک مصرف‌شده در هر مخزن به‌صورت مصرف تجمعی خوراک طی دوره ۶۸ روزه محاسبه شد. شاخص‌های عملکرد رشد و کارایی خوراک با درنظرگرفتن مخزن به‌عنوان واحد آزمایشی محاسبه شدند. فراسنجه‌های زیر محاسبه شدند:

افزایش وزن (WG، گرم) = (وزن نهایی (Wf) - وزن اولیه (Wi))

درصد افزایش وزن (PWG، ٪) = [(وزن نهایی (Wf) - وزن اولیه (Wi)) / وزن اولیه (Wi)] × ۱۰۰

افزایش وزن روزانه (DWG، گرم در روز) = (وزن نهایی (Wf) - وزن اولیه (Wi)) / مدت زمان پرورش

نرخ رشد ویژه (SGR، درصد در روز) = [لگاریتم طبیعی وزن نهایی - لگاریتم طبیعی وزن اولیه] / مدت زمان پرورش × ۱۰۰

ضریب تبدیل غذایی (FCR) = (مقدار غذای مصرف شده (گرم) (FI) / افزایش وزن (گرم) (WG)

نسبت کارایی پروتئین (PER) = (افزایش وزن (گرم) (WG) / مقدار پروتئین مصرفی (گرم) (PI)

ضریب وضعیت بدنی (CF) = (وزن ماهی (گرم) (W) / طول ماهی (سانتی‌متر) (L^3)) × ۱۰۰

نرخ بقا (SR، ٪) = (تعداد ماهی زنده در پایان آزمایش / تعداد ماهی زنده در ابتدای آزمایش) × ۱۰۰

در این معادلات، Wi و Wf به‌ترتیب میانگین وزن اولیه و نهایی بدن (گرم)، t مدت آزمایش (۶۸ روز)، Protein intake مقدار پروتئین مصرفی (گرم) که از حاصل‌ضرب کل خوراک خشک مصرف‌شده در کسر پروتئین خام جیره به دست آمد، W وزن بدن (گرم) و L درازای کل (سانتیمتر) هستند (NRC, 2011; Jalili et al. 2013; Huang et al. 2021).

ترکیب تقریبی لاشه

در پایان دوره تغذیه، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگهداشته شدند و سپس با استفاده از دوز بیش‌ازحد ماده بیهوشی، به روش انسانی آسان‌کشی شدند. پس از شست‌وشو با آب مقطر و خشک‌کردن سطحی، ماهی‌ها تشریح و احشا خارج شدند. احشا و کبد برداشته شد و بافت باقی‌مانده لاشه برای سنجش ترکیب تقریبی نگهداری شد. نمونه‌های لاشه بر اساس مخزن، به‌عنوان واحد آزمایشی، تجمیع و با استفاده از مخلوط‌کن آزمایشگاهی همگن شدند و مطابق روش‌های استاندارد AOAC (۲۰۲۳) اندازه‌گیری شدند. رطوبت، پروتئین خام (روش کلدال؛ N × 6.25)، چربی خام (استخراج سوکسله با پترولیوم اتر) و خاکستر (۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت) تعیین شد. نتایج برحسب درصد وزن تر گزارش شد.

بیانیه اخلاقی

تمام روش‌های آزمایشی مربوط به ماهیان مطابق دستورالعمل‌های مرتبط با مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و به تأیید کمیته اخلاق در پژوهش‌های حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، ایران، با کد تأیید IR.IAU.SRB.REC.1402.341 رسید.

تجزیه و تحلیل آماری

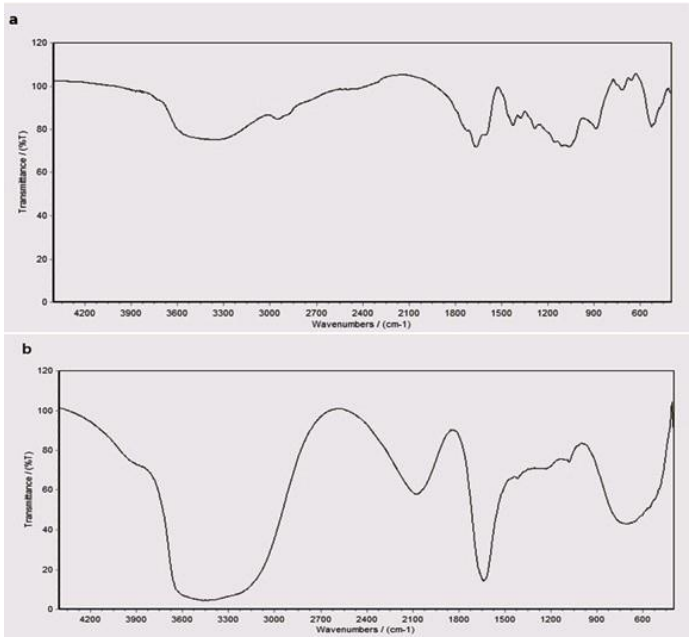
داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شدند و مخزن به‌عنوان واحد آزمایشی در نظر گرفته شد (n=3 برای هر تیمار غذایی). پیش از تحلیل، نرمال‌بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. در صورت لزوم، داده‌های درصدی با تبدیل جذر سینوسی و دیگر متغیرها با تبدیل لگاریتمی برای برآورده‌کردن مفروضات تحلیل واریانس تبدیل شدند. با وجود این، میانگین‌های تبدیل‌نشده برای وضوح ارائه شده‌اند. اثر تیمارهای غذایی با آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بررسی و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵)، مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی (HSD) انجام شد. برای توصیف روابط پاسخ-دوز میان سطوح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C و شاخص‌های عملکرد رشد و استفاده از خوراک، تحلیل رگرسیون درجه دوم به کار رفت. تمام تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۶؛ IBM Corp., Armonk, NY, USA) انجام شد.

نتایج

مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانوذرات کیتوزان-ویتامین C

طیف‌سنجی FTIR کیتوزان و نانوذرات کیتوزان-ویتامین C

طیف‌های FTIR نانوذرات کیتوزان خالی (CHITOVCB) و نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با ویتامین C (CHITOVCF) در شکل ۱ نشان داده شده‌اند. هر دو فرمولاسیون در ناحیه ۳۲۰۰ تا ۳۵۰۰ بر سانتی‌متر یک باند جذبی پهن داشتند. تفاوت‌هایی در شکل و شدت این باند بین دو فرمولاسیون مشاهده شد که می‌توان به هم‌پوشانی ارتعاش‌های کششی O-H و N-H، که در سامانه‌های مبتنی بر کیتوزان معمول هستند، نسبت داد.



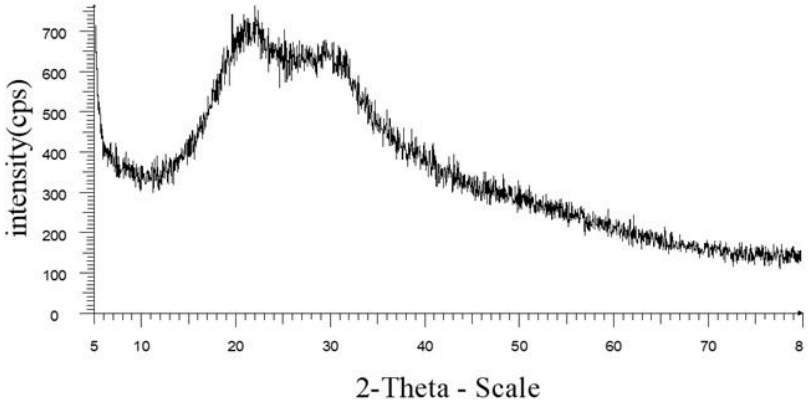
شکل ۱ طیف‌های FTIR نانوذرات کیتوزان با و بدون ویتامین C. طیف‌های مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) نانوذرات کیتوزان خالی (CHITOVCB) و نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با ویتامین C (CHITOVCF) طیف‌ها باندهای مشخصه کیتوزان و تغییرات وابسته به فرمولاسیون را در ناحیه کششی پیوندهای O-H/N-H و دیگر نواحی مربوط به گروه‌های عاملی نشان می‌دهند که مؤید برهم‌کنش‌های مولکولی بین کیتوزان و ویتامین C در فرمولاسیون بارگذاری‌شده است.

Figure 1 FTIR spectra of chitosan nanoparticles with and without vitamin C. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of blank chitosan nanoparticles (CHITOVCB) and vitamin C-loaded chitosan nanoparticles (CHITOVCF). The spectra show characteristic chitosan bands and formulation-dependent changes in the O-H/N-H stretching region and other functional-group regions, supporting molecular interactions between chitosan and vitamin C in the loaded formulation.

تفاوت‌هایی در ناحیه ۱۵۰۰ تا ۱۷۰۰ بر سانتی‌متر نیز مشاهده شد؛ این ناحیه عموماً با ارتعاش‌های مرتبط با آمید و آب پیوندی ارتباط دارد. علاوه بر این، ناحیه اثرانگشتی (۱۰۰۰ تا ۱۲۵۰ بر سانتی‌متر)، که عمدتاً به ارتعاش‌های کششی C-O و C-O-C در ستون فقرات پلی‌ساکاریدی نسبت داده می‌شود، بین CHITOVCB و CHITOVCF تغییرات قابل‌توجهی نشان داد. در مجموع، این تغییرات طیفی نشان می‌دهند که بارگذاری ویتامین C محیط شیمیایی گروه‌های عاملی را درون ماتریس نانوذرات کیتوزان تغییر داده است (شکل ۱).

الگوی پراش پرتو ایکس فرمولاسیون (کیتوزان ویتامین C) CS–VitC

الگوی XRD فرمولاسیون CS-VitC در شکل ۲ نشان داده شده است. دیفراکتوگرام یک هاله پهن داشت و فاقد قله‌های پراش تیز و مشخصی بود که معمولاً با فازهای بلوری‌شده شدید همراه هستند. در دامنه اسکن‌شده θ۲، بازتاب‌های شدید یا کاملاً تعریف‌شده‌ای مشاهده نشد که نشان‌دهنده درجه پایین نظم ساختاری دوربرد و ماهیت عمدتاً آمورف نمونه تحلیل‌شده است (شکل ۲).

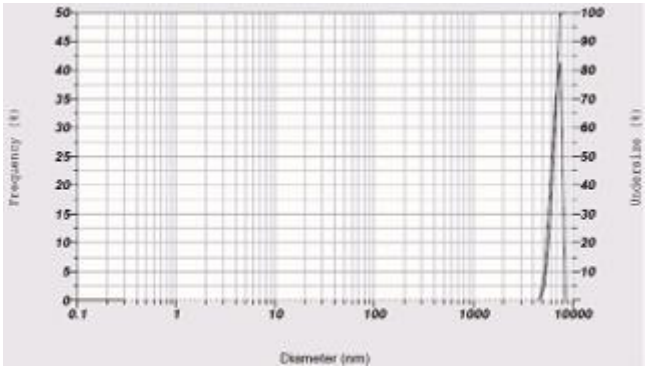


شکل ۲ الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با ویتامین C. الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) مربوط به CHITOVCF (CS-VitC). این الگو عمدتاً دارای ویژگی‌های پهن و گسترده بوده و کاهش بازتاب‌های بلوری تیز را نشان می‌دهد؛ که بیانگر ساختاری عمدتاً آمورف (بی‌شکل) یا دارای نظم بلوری ضعیف است و با پراکنده‌شدن/کپسوله‌شدن ویتامین C درون ماتریس کیتوزان سازگاری دارد.

Figure 2 X-ray diffraction (XRD) pattern of vitamin C–loaded chitosan nanoparticles. XRD diffractogram of CHITOVCF (CS-VitC). The profile is dominated by broad features with reduced sharp crystalline reflections, indicating a predominantly amorphous/poorly ordered structure consistent with dispersion/encapsulation of vitamin C within the chitosan matrix.

توزیع اندازه هیدرودینامیکی در سوسپانسیون (DLS)

نتایج پراکندگی نور دینامیکی (DLS) در شکل ۳ ارائه شده است. قطر هیدرودینامیکی با وزن‌دهی شدت در محدوده میکرومتری قرار داشت و میانگین آن تقریباً ۶۷۱/۰ ± ۶۳۹۹/۸ نانومتر و نمای آن حدود ۶۷۳۶/۹ نانومتر بود. این نتایج نشان می‌دهند که اجسام پراکنده‌شده اندازه‌گیری‌شده در سوسپانسیون عمدتاً مجموعه‌های ذره‌ای یا تجمعات در مقیاس میکرومتری بودند، نه نانوذرات اولیه‌ای که به‌طور منفرد پراکنده باشند. بنابراین، داده‌های DLS اندازه هیدرودینامیکی مجموعه‌های معلق را در شرایط اعمال‌شده اندازه‌گیری نشان می‌دهند (شکل ۳).

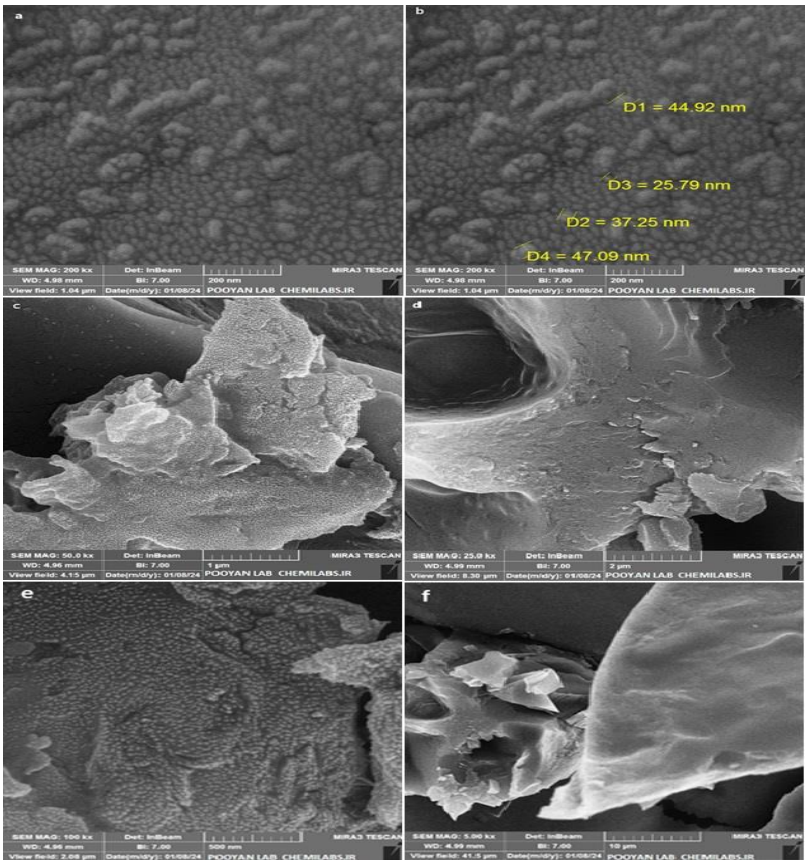


شکل ۳ توزیع اندازه‌گیری‌شده با DLS برای سوسپانسیون نانوذرات. نتایج پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای سوسپانسیون نانوذرات که توزیع اندازه هیدرودینامیکی وزن‌دهی‌شده بر اساس شدت نور و همچنین آمار خلاصه، همان‌طور که توسط دستگاه گزارش شده است، را نشان می‌دهد. قطر هیدرودینامیکی در محدوده میکرومتری، بیانگر اندازه تجمعات/به‌هم‌چسبیدگی در سوسپانسیون تحت شرایط اندازه‌گیری است و نشان‌دهنده اندازه ذرات اولیه نیست.

Figure 3 Dynamic light scattering (DLS) size distribution of the nanoparticle suspension. DLS results for the nanoparticle dispersion showing the intensity-weighted hydrodynamic size distribution (and summary statistics, as reported by the instrument). The micrometer-range hydrodynamic diameter reflects aggregate/agglomerate size in suspension under the measurement conditions rather than the primary particle size.

ذرات اولیه در مقیاس نانو و ویژگی‌های تجمع (FE-SEM)

تصاویر FE-SEM (شکل ۴) نشان دادند که سامانه CS-VitC از ذرات اولیه در مقیاس نانو با ویژگی‌های تجمع آشکار تشکیل شده است. اگرچه واحدهای اولیه در مقیاس نانومتر قرار داشتند، کاملاً منفرد نبودند و به‌صورت مجموعه‌های خوشه‌ای مشاهده شدند. این یافته اندازه هیدرودینامیکی بزرگ‌تر به‌دست‌آمده از DLS را توضیح می‌دهد، زیرا این روش ذرات موجود در سوسپانسیون را اندازه‌گیری کرده و به تشکیل تجمعات حساس است. ازاین‌رو، نتایج FE-SEM و DLS باید مکمل یکدیگر و نه متناقض با هم در نظر گرفته شوند.

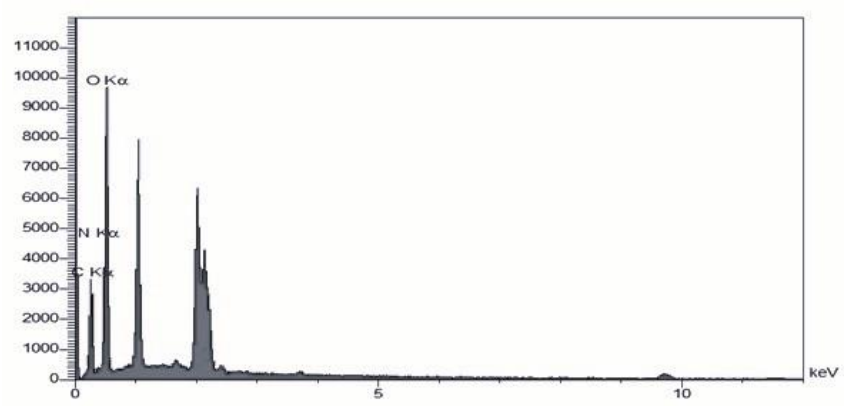


شکل ۴ تصاویر FE-SEM نانوذرات کیتوزان-ویتامین C. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی(FE-SEM) از CHITOVCF در بزرگنمایی‌های مختلف (a–f) که ویژگی‌های دانه‌ای در مقیاس نانو را نشان می‌دهند که درون تجمعات خشک‌شده بزرگ‌تر آرایش یافته‌اند. پنل bاندازه‌گیری‌های نماینده‌ای از اندازه ذرات در محدوده چند ده نانومتر را نشان می‌دهد. نوارهای مقیاس در هر پنل ارائه شده‌اند.

Figure 4 FE-SEM micrographs of chitosan-vitamin C nanoparticles. Field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM) images of CHITOVCF at different magnifications (a–f) showing granular nanoscale features arranged within larger dried assemblies. Panel (b) illustrates representative particle-size measurements in the tens-of-nanometers range. Scale bars are provided in each panel.

ترکیب عنصری (EDS)

تحلیل EDS برای بررسی ترکیب عنصری نانوذرات CS-VitC تهیه‌شده انجام شد (شکل ۵). طیف به‌دست‌آمده سیگنال‌های اصلی مربوط به کربن، نیتروژن و اکسیژن را نشان داد که با ترکیب مورد انتظار فرمولاسیون مبتنی بر کیتوزان حاوی ویتامین C مطابقت داشت. همچنین، قله آشکاری مربوط به عناصر معدنی مشاهده نشد که نشان‌دهنده نبود ناخالصی‌های معدنی قابل‌توجه در نمونه تحلیل‌شده است.



شکل ۵ طیف EDS نانوذرات کیتوزان بارگذاری‌شده با ویتامین C. طیف‌سنجی پرتو ایکس با پراکندگی انرژی (EDS) مربوط به CHITOVCF که سیگنال‌های غالب عناصر C، N و O را نشان می‌دهد. این نتایج با ماهیت آلیِ سامانه مبتنی بر کیتوزان سازگار بوده و عدم وجود آلاینده‌های معدنی عمده در ناحیه مورد بررسی را تأیید می‌کند.

Figure 5 EDS spectrum of vitamin C-loaded chitosan nanoparticles. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectrum of CHITOVCF showing dominant signals of C, N, and O, consistent with an organic chitosan-based system and supporting the absence of major inorganic contaminants in the analyzed region.

عملکرد رشد و کارایی خوراک

عملکرد رشد، کارایی خوراک، بقا و ضریب وضعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) به مدت ۶۸ روز در جدول ۲ ارائه شده است. وزن نهایی، افزایش وزن، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی پروتئین و ضریب وضعیت تحت تأثیر معنی‌دار تیمار غذایی قرار گرفتند ($P<0.05$)، در حالی که بقا به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر قرار نگرفت.

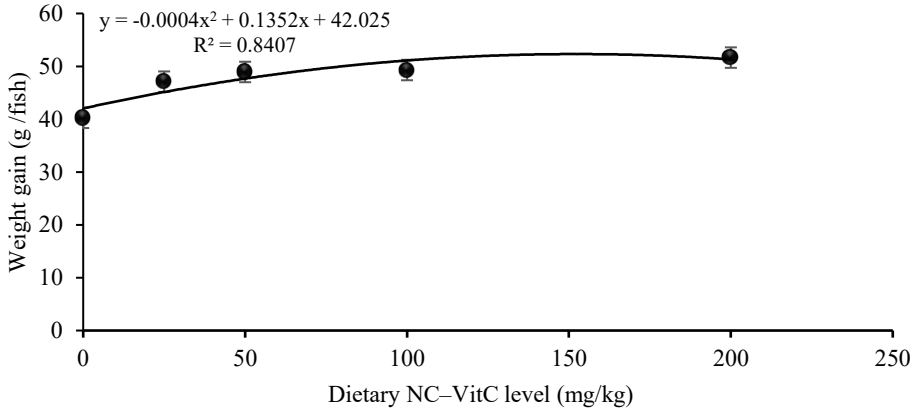
جدول ۲ عملکرد رشد، کارایی خوراک، بقا و ضریب وضعیت قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه‌شده با جیره‌های مکمل‌شده با ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC؛ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک) به مدت ۶۸ روز

Table 2 Growth performance, feed utilization, survival and condition factor of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC; mg/kg diet) for 68 days

Parameter	C (Control)	T1 (25)	T2 (50)	T3 (100)	T4 (200)
Wi (g)	29.02 ± 0.16	29.47 ± 0.90	29.70 ± 0.54	29.98 ± 0.45	29.32 ± 0.89
Wf (g)	69.28 ± 1.34^{b}	76.57 ± 2.79^{a}	78.63 ± 0.59^{a}	79.28 ± 1.63^{a}	80.97 ± 1.01^{a}
WG (g)	40.26 ± 1.18^{c}	47.10 ± 1.99^{b}	48.93 ±0.26^{a}	49.30 ±1.33^{a}	51.65 ± 0.13^{a}
PWG (%)	138.73 ± 3.27^{c}	159.79 ±3.76^{b}	164.76± 3.16^{b}	164.39 ± 3.59^{b}	176.24 ± 5.00^{a}
DWG (g/day)	0.59 ± 0.02^{c}	0.69 ± 0.03^{b}	0.72 ± 0.00^{a}	0.72 ± 0.02^{a}	0.76 ± 0.00^{a}
SGR (%/day)	1.28 ± 0.02^{c}	1.40 ± 0.02^{b}	1.43 ± 0.02^{b}	1.43 ± 0.02^{b}	1.49 ± 0.03^{a}
FCR	1.50 ± 0.00^{a}	1.07 ± 0.06^{b}	0.94 ± 0.03^{c}	1.11 ± 0.05^{b}	0.96 ± 0.02^{c}
PER	1.48 ± 0.00^{c}	1.99 ± 0.08^{b}	2.13 ± 0.09^{b}	2.16 ± 0.13^{ab}	2.31 ± 0.05^{a}
SR (%)	88.33 ± 2.36^{a}	96.67 ± 2.89^{a}	96.67 ± 2.89^{a}	95.00 ± 5.00^{a}	95.00 ± 5.00^{a}
CF	1.30 ± 0.11^{a}	1.19 ± 0.03^{a}	1.49 ± 0.31^{a}	1.10 ± 0.06^{a}	0.99 ± 0.06^{b}

NC-VitC contained 16.7% (w/w) vitamin C; thus 25, 50, 100 and 200 mg NC–VitC/kg diet provided 4.17, 8.33, 16.67 and 33.33 mg vitamin C equivalents/kg, respectively. Values are presented as mean ± SEM (n = 3 tanks per treatment). Different superscript letters within the same row indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ (Tukey's test). Wi = Initial Weight, Wf = Final Weight, WG = Weight Gain, PWG = Percentage Weight Gain, DWG = Daily Weight Gain, SGR = Specific Growth Rate, FCR = Feed Conversion Ratio, PER = Protein Efficiency Ratio, SR = Survival Rate, CF = Condition Factor

ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد ضعیف‌ترین عملکرد رشد را نشان دادند و وزن نهایی، افزایش وزن، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه و نرخ رشد ویژه آن‌ها به‌طور معنی‌دار کمتر از ماهیان دریافت‌کننده نانوکیتوزان ویتامین C بود. وزن نهایی از ۶۹/۲۸ گرم در گروه شاهد به ۸۰/۹۷ گرم در ماهیان دریافت‌کننده دوز ۲۰۰ افزایش یافت. افزایش وزن از ۴۰/۲۶ به ۵۱/۶۵ گرم، افزایش وزن روزانه از ۰/۵۹ به ۰/۷۶گرم در روز و نرخ رشد ویژه از ۱/۲۸٪ به ۱/۴۹٪ در روز رسید. اگرچه عملکرد رشد در همه گروه‌های مکمل‌شده بهبود یافت، تفاوت بین سطوح بالاتر مکمل‌یاری در همه موارد معنی‌دار نبود.

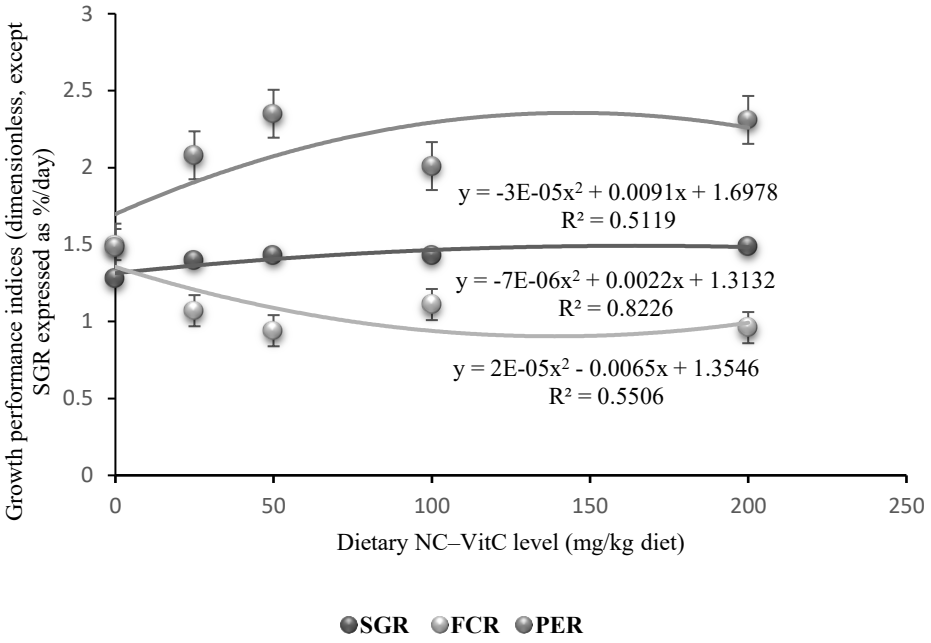


شکل ۶ رگرسیون درجه دوم بین سطح ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان در جیره و افزایش وزن (گرم/ماهی) قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از دوره تغذیه

Figure 6 Quadratic regression between dietary nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC) level and weight gain (g/fish) of rainbow trout after the feeding trial

کارایی خوراک نیز با مکمل‌یاری جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C بهبود یافت. گروه شاهد بیشترین ضریب تبدیل غذایی و کمترین نسبت کارایی پروتئین را داشت، در حالی که در تیمارهای مکمل‌شده، ضریب تبدیل غذایی کمتر و نسبت کارایی پروتئین بیشتر بود. مطلوب‌ترین پاسخ‌های کارایی خوراک در تیمار ۲ و تیمار ۴ ثبت شد که نشان‌دهنده کارایی بهتر خوراک و پروتئین در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نانوکیتوزان ویتامین C است.

میزان بقا در همه تیمارها بالا باقی ماند و بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت. ضریب وضعیت تحت تأثیر معنی‌دار تیمار غذایی قرار گرفت، اگرچه تغییرات بین گروه‌های مکمل‌شده در مقایسه با شاخص‌های رشد، یکنواختی کمتری داشت.



شکل ۷ تحلیل رگرسیون درجه دوم شاخص‌های عملکرد رشد و کارایی خوراک، شامل نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و نسبت کارایی پروتئین (PER)، در پاسخ به سطوح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C در قزل‌آلای رنگین‌کمان

Figure 7 Quadratic regression analysis of growth performance and feed utilization indices, including specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), and protein efficiency ratio (PER), in response to dietary nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC) levels in rainbow trout. All regression models were statistically significant (P<0.05). Data points represent treatment means

تحلیل رگرسیون درجه دوم نشان داد که بین سطح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C و شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده رشد و استفاده از خوراک رابطه‌ای منحنی‌وار وجود دارد (شکل‌های ۶ و ۷). افزایش وزن با افزایش سطح نانوکیتوزان ویتامین C افزایش یافت و در سطوح بالاتر به سمت سکون میل کرد. الگوهای مشابهی برای نرخ رشد ویژه و نسبت کارایی پروتئین مشاهده شد، در حالی که ضریب تبدیل غذایی روند معکوس نشان داد. در مجموع، نتایج نشان می‌دهند که مکمل‌یاری جیره با نانوکیتوزان ویتامین C در شرایط این مطالعه، عملکرد رشد و استفاده از خوراک قزل‌آلای رنگین‌کمان را بهبود داده است.

ترکیب تقریبی لاشه

ترکیب تقریبی لاشه بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف نانوکیتوزان ویتامین C به مدت ۶۸ روز در جدول ۳ ارائه شده است. تیمار غذایی بر رطوبت یا خاکستر لاشه اثر معنی‌دار نداشت ($P>۰/۰۵$)، اما مقدار پروتئین خام و چربی خام لاشه به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر سطح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C قرار گرفت ($P<۰/۰۵$).

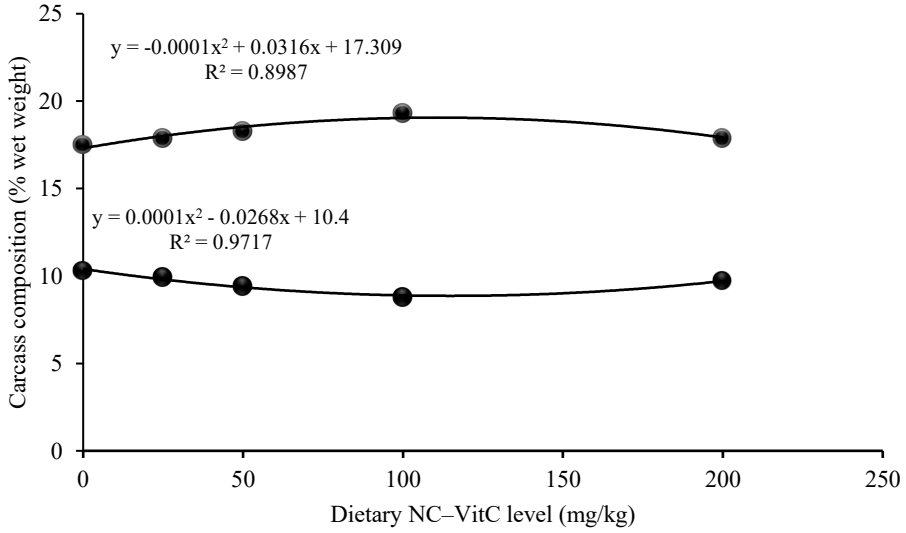
بیشترین مقدار پروتئین خام لاشه در ماهیان تغذیه‌شده با ۱۰۰ میلی گرم نانوکیتوزان ویتامین C بر کیلوگرم جیره مشاهده شد و این مقدار به‌طور معنی‌دار بیش از شاهد و دیگر گروه‌های مکمل‌شده بود. در مقابل، چربی خام لاشه در تیمار ۳ کمترین و در گروه شاهد بیشترین مقدار بود. ماهیان تغذیه‌شده با دوز ۵۰ و ۱۰۰ چربی خام کمتری نسبت به شاهد داشتند، در حالی که بین شاهد و ماهیان دریافت‌کننده دوز ۲۵ یا ۲۰۰ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. تحلیل رگرسیون درجه دوم برای توصیف روابط بین سطح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C و پروتئین خام و چربی خام لاشه استفاده شد (شکل ۸). مدل‌های برازش‌شده در سطوح میانی نانوکیتوزان ویتامین C، به‌ترتیب بیشینه پاسخ برای پروتئین لاشه و کمینه پاسخ برای چربی لاشه را نشان دادند.

جدول ۳ ترکیب تقریبی لاشه (درصد وزن تر) بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه‌شده با جیره‌های مکمل‌شده با ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC–VitC؛ میلی گرم بر کیلوگرم خوراک) به مدت ۶۸ روز

Table 3 Carcass proximate composition (% wet weight) of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC–VitC; mg/kg diet) for 68 days

Parameter (%wet weight)	C (Control)	T1 (25)	T2 (50)	T3 (100)	T4 (200)
Crude protein	17.50 ± 0.30^{b}	17.87 ± 0.25^{b}	18.27 ± 0.25^{b}	19.30 ± 0.36^{a}	17.87 ± 0.51^{b}
Crude lipid	10.30 ± 0.20^{c}	9.93 ± 0.25^{bc}	9.40 ± 0.20^{b}	8.80 ± 0.20^{a}	9.73 ± 0.25^{bc}
Moisture	72.03 ± 0.45^{a}	71.80 ± 0.30^{a}	71.33 ± 0.15^{a}	71.47 ± 0.45^{a}	71.33 ± 0.15^{a}
Ash	1.45 ± 0.05^{a}	1.46 ± 0.06^{a}	1.48 ± 0.03^{a}	1.45 ± 0.04^{a}	1.52 ± 0.03^{a}

Values are mean ± SEM (n = 3 tanks per treatment; tank considered the experimental unit). Different superscript letters within the same row indicate significant differences among treatments ($P<0.05$; Tukey's test). We converted ash values to wet-weight percentages using the corresponding moisture content. NC-VitC contained 16.7% (w/w) vitamin C; therefore, dietary inclusion levels of 25, 50, 100, and 200 mg NC-VitC/kg diet provided 4.17, 8.33, 16.67, and 33.33 mg vitamin C equivalents/kg diet, respectively.



شکل ۸ رگرسیون درجه دوم بین سطح جیره‌ای ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان و ترکیب تقریبی لاشه، شامل مقدار پروتئین خام و چربی خام (درصد وزن تر)، در قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایان دوره تغذیه. هر دو مدل رگرسیون از نظر آماری معنی‌دار بودند (P<۰/۰۵). نقاط داده نشان دهنده میانگین‌های تیمار هستند.

Figure 8 Quadratic regression between dietary nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC) level and carcass proximate composition, including crude protein and crude lipid contents (% wet weight), of rainbow trout at the end of the feeding trial. Both regression models were statistically significant (P<0.05). Data points represent treatment means.

تحلیل رگرسیون درجه دوم وجود رابطه‌ای منحنی‌وار بین سطح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C و ترکیب لاشه را نشان داد (شکل ۸). پروتئین خام لاشه در سطح میانی مکمل‌یاری به بیشینه رسید، در حالی که چربی خام لاشه در همین محدوده به کمینه رسید. در مجموع، نتایج نشان می‌دهند که مکمل‌یاری متوسط با نانوکیتوزان ویتامین C از طریق افزایش رسوب پروتئین و کاهش تجمع چربی، ترکیب لاشه را به‌طور مطلوب تغییر داد.

بحث

مطالعه حاضر اثرات تغذیه‌ای ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) را بر عملکرد رشد، استفاده از

خوراک و ترکیب لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان در طی دوره تغذیه بررسی کرد. در مجموع، مکمل‌یاری جیره با نانوکیتوزان ویتامین C با بهبود عملکرد رشد و استفاده از خوراک و نیز تغییر مطلوب ترکیب لاشه، به‌ویژه در سطوح میانی افزودن، همراه بود. پاسخ‌های مشاهده‌شده عمدتاً غیرخطی بودند؛ ازاین‌رو افزایش سطح نانوکیتوزان ویتامین C به بهبود متناسب همه متغیرها منجر نشد. این نتایج نشان می‌دهند که نانوکیتوزان ویتامین C ممکن است علاوه بر تأمین ویتامین C، بر استفاده و رسوب مواد مغذی نیز اثر گذاشته باشد. با وجود این، از آنجا که اندازه‌گیری‌های مستقیم مکانیزمی در این مطالعه انجام نشد، مسیرهای زیربنایی همچنان نامشخص هستند.

مکمل‌یاری جیره با نانوکیتوزان ویتامین C با بهبود عملکرد رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان همراه بود. این امر با افزایش وزن نهایی، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه، همراه با بهبود استفاده از خوراک که با کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش نسبت کارایی پروتئین مشخص شد، در مقایسه با شاهد آشکار شد. این پاسخ‌ها در همه گروه‌های دریافت‌کننده نانوکیتوزان ویتامین C مشاهده شدند و بیشترین بهبود عددی شاخص‌های رشد در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره به دست آمد. اگرچه اختلاف میان سطوح بالاتر افزودن برای همه شاخص‌ها معنی‌دار نبود. این الگو با نقش شناخته‌شده ویتامین C در پشتیبانی از رشد و عملکرد ماهیان پرورشی، از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان و دیگر آزادماهیان، سازگار است (Xu et al. 2022; Rahman et al. 2023).

الگوی پاسخ غیرخطی بود؛ به‌گونه‌ای که افزایش وزن و نرخ رشد ویژه از شاهد تا سطوح میانی مکمل‌یاری افزایش یافت و پاسخ شاخص‌های رشد به‌طور کلی افزایشی بود؛ به‌طوری‌که که افزایش وزن و نرخ رشد ویژه از گروه شاهد تا سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره افزایش یافت، اما کاهش اختلاف میان تیمارهای دریافت‌کننده سطوح بالاتر، نشان‌دهنده گرایش پاسخ رشد به حالت سکون بود. چنین پاسخ‌های غیرخطی برای ریزمغذی‌های ضروری، از جمله ویتامین C، متداول هستند؛ عملکرد از شرایط کمبود به سمت کفایت بهبود می‌یابد، در حالی که مکمل‌یاری فراتر از این دامنه معمولاً پاسخ بیشتری ایجاد نمی‌کند (Fracalossi et al. 1998; Wang et al. 2003). نیاز گزارش‌شده به ویتامین C در ماهیان پرورشی بر اساس گونه، مرحله رشد و معیار پاسخ متفاوت است (Xu et al. 2022; Rahman et al. 2023)، اما الگوی کلی مشاهده‌شده در این مطالعه با مطالعات پیشین تغذیه ویتامین C سازگاری کلی دارد.

بهبود استفاده از خوراک در گروه‌های نانوکیتوزان ویتامین C، که با کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش نسبت کارایی پروتئین منعکس شد، همراه با بهبود پاسخ‌های رشد رخ داد و نشان‌دهنده استفاده مطلوب‌تر از نهاده‌های جیره‌ای در شرایط آزمایشی حاضر بود. ارتباط مشابه میان مکمل‌یاری ویتامین C، کارایی خوراک و رشد در آزادماهیان و دیگر ماهیان پرورشی گزارش شده است (Dawood et al. 2018). با وجود این، از آنجا که خوراک مصرفی، قابلیت هضم و نقاط پایانی متابولیک به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نشدند، این نتایج باید به‌عنوان پیامدهای مرتبط با عملکرد تفسیر شوند، نه شواهدی از سازوکارهای فیزیولوژیک مشخص.

علاوه بر تأمین ویتامین C، خود ماتریس فرمولاسیون نیز ممکن است بر پاسخ‌های مشاهده‌شده اثر گذاشته باشد. گزارش شده است که کیتوزان می‌تواند جمعیت میکروبی روده، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ریخت‌شناسی روده را تحت تأثیر قرار دهد و در چندین گونه ماهی با بهبود رشد و کارایی خوراک همراه باشد (Abdel-Ghany and Salem, 2020; Salam et al. 2021). مرورهای مربوط به استفاده از کیتوزان در خوراک آبزیان نیز اثرات مثبت آن را بر رشد و استفاده از مواد مغذی، به‌ویژه در سطوح متوسط افزودن، توصیف کرده‌اند (Dawood et al. 2018; Abdel-Ghany and Salem, 2020). همچنین، نانوفرمولاسیون‌های ویتامین C مبتنی بر کیتوزان اثرات مفیدی بر رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک تیلاپیا نشان داده‌اند (Ibrahim et al. 2021; Elnagar et al. 2024; Sherif et al. 2024). با وجود این، از آنجا که مطالعه حاضر شامل تیمار جداگانه ویتامین C غیرکپسوله یا کیتوزان تنها نبود، سهم نسبی کپسوله‌سازی و اثر حامل را نمی‌توان مستقیماً تفکیک کرد.

اگرچه نرخ بقا در تیمارهای دریافت‌کننده نانوکیتوزانویتامین C از ۸۸/۳۳٪ در شاهد به ۹۶/۶۷٪ در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم افزایش یافت اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود.

نتایج نشان داد مکمل‌سازی جیره با ویتامین C کپسوله‌شده در نانوکیتوزان، ضریب تبدیل غذایی را در تمام تیمارها نسبت به شاهد (۱/۵) به‌طور معنی‌دار کاهش داد و کمترین

مقادیر در تیمارهای T_2 و T_4 به‌ترتیب ۰/۹۴ و ۰/۹۶ مشاهده شد. این کاهش هم‌زمان با افزایش وزن، نرخ رشد ویژه و PER بود و بیانگر استفاده مؤثرتر ماهی از خوراک و پروتئین جیره است. احتمالاً نانوکیتوزان با محافظت از ویتامین C در برابر اکسایش و آب‌شویی، فراهمی زیستی آن را افزایش داده است. ضریب تبدیل غذایی کمتر از یک در مطالعه حاضر با نتایج Rider و همکاران (۲۰۲۳) هم‌خوانی دارد. این پژوهشگران در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با جیره‌های مکمل‌شده با کلسفدیول، مقادیر FCRبین ۰/۷۲ تا ۰/۷۴ را گزارش کردند. با وجود این، پاسخ غیرخطی تیمارها نشان می‌دهد که براساس FCR، سطح T_2 کارآمدترین دوز بود، درحالی‌که T_4 بیشترین رشد و PER را ایجاد کرد.

افزایش وزن روزانه ماهیان در مطالعه حاضر بین ۰/۵۹ تا ۰/۷۶ گرم در روز بود و مکمل‌سازی با نانوکیتوزان ویتامین C موجب افزایش معنی‌دار این شاخص نسبت به شاهد شد. کمتر از یک گرم بودن افزایش وزن روزانه با توجه به اندازه اولیه ماهیان غیرعادی نیست؛ به‌طوری‌که Falahatkar و همکاران (۲۰۱۶) در قزل‌آلاهایی با وزن اولیه حدود ۲۶ گرم، افزایش وزن ۳۷/۶ تا ۴۲/۱ گرم را طی ۵۶ روز گزارش کردند که معادل رشد روزانه حدود ۰/۶۷ تا ۰/۷۵ گرم است. همچنین Kim و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که قزل‌آلاهایی با وزن اولیه حدود ۳۲ گرم طی ۱۲ هفته به وزن نهایی ۴۴/۸۵ تا ۷۹/۱۸ گرم رسیدند که معادل افزایش وزن روزانه حدود ۰/۱۵ تا ۰/۵۶ گرم بود. نزدیکی این مقادیر به نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد نرخ رشد مشاهده‌شده با دامنه وزنی بچه‌ماهیان و دوره پرورش تناسب دارد. همچنین، افزایش رشد روزانه از ۰/۵۹ گرم در شاهد به ۰/۷۶ گرم در تیمار T_4 می‌تواند بیانگر بهبود استفاده از مواد مغذی جیره در اثر مصرف ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان باشد.

تغییرات ترکیب لاشه در مطالعه حاضر با پاسخ‌های رشد و استفاده از خوراک هم‌راستا بود. در سطوح میانی نانوکیتوزان حامل ویتامین C، پروتئین خام لاشه افزایش و چربی خام کاهش یافت، درحالی‌که رطوبت و خاکستر تغییر معنی‌داری نداشتند. عدم تداوم این پاسخ در بالاترین سطح افزودن، احتمال وجود دامنه بهینه مصرف را مطرح می‌کند. در مطالعات انجام‌شده روی باس دهان‌بزرگ، کپور علف‌خوار و وال‌آی پولاک نیز افزودن مقادیر مناسب ویتامین C موجب تغییر ترکیب تقریبی بدن یا افزایش پروتئین خام شد (Yusuf et al. 2021; Nasar et al. 2021; Lee et al. 2024). همچنین، افزودن کیتوزان به جیره قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب کاهش چربی کل بدن، عضله و کبد شد، هر چند که تأثیر معنی‌داری بر پروتئین خام نداشت (Jiang et al. 2012). بنابراین، افزایش پروتئین و کاهش چربی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر احتمالاً حاصل اثر توأم ویتامین C و کیتوزان و بهبود فراهمی زیستی و استفاده از مواد مغذی در سامانه نانوحامل است.

فرمولاسیون‌های کیتوزان و مبتنی بر کیتوزان، از جمله سامانه‌های نانوذره‌ای، نیز با تغییرات رشد، استفاده از خوراک و ترکیب بدن در گونه‌های آبزی‌پروری مرتبط دانسته شده‌اند (Abdel-Ghany and Salem, 2020; Salam et al. 2021). اگرچه برخی مطالعات این مشاهدات را به استفاده از مواد مغذی و شاخص‌های فیزیولوژیک گسترش داده‌اند، این نقاط پایانی خارج از دامنه مطالعه حاضر بودند (Abdel-Tawwab et al. 2019; Hossam-Elden et al. 2024). بنابراین، پاسخ‌های ترکیب لاشه مشاهده‌شده در این مطالعه بهتر است به‌عنوان ارتباط‌های توصیفی با تیمار غذایی تفسیر شوند، نه شواهد مستقیمی از تغییر در تقسیم‌بندی متابولیک یا مسیرهای بیوشیمیایی مشخص.

تحلیل‌های فیزیکوشیمیایی از تشکیل موفق سامانه نانوساختار نانوکیتوزان ویتامین C پشتیبانی کردند. تصاویر FE-SEM نشان دادند که ذرات اولیه در محدوده نانومتری، تقریباً ۲۵/۷۹ تا ۴۷/۰۹ نانومتر، در طی فرایند فرمولاسیون تشکیل شدند که بیانگر ایجاد ساختارهای نانومقیاس بود. در مقابل، اندازه‌گیری‌های DLS قطرهای هیدرودینامیکی بسیار بزرگ‌تری را نشان دادند که بیانگر حضور تجمعات یا آگلومره‌های ذره‌ای در سوسپانسیون آبی، و نه اندازه ذرات اولیه بود. این اختلاف با تفاوت‌های روش‌شناختی شناخته‌شده میان میکروسکوپ الکترونی، که ساختارهای اولیه خشک‌شده را مشاهده می‌کند، و DLS، که رفتار هیدرودینامیکی ذرات پراکنده و احتمالاً تجمع‌یافته را در محیط مایع اندازه‌گیری می‌کند، سازگار است (Murdock et al. 2008; Bhattacharjee, 2016).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) به جیره، رشد و کارایی خوراک قزل‌آلای رنگین‌کمان را در شرایط آزمایشی حاضر بهبود بخشید، بقا در همه تیمارها بالا باقی ماند و تفاوت معنی‌داری نداشت. با وجود این، ضریب وضعیت در بالاترین سطح افزودن نانوکیتوزان ویتامین C به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. براساس رگرسیون درجه دوم، دامنه بهینه برای رشد حدود ۱۵۰ تا ۱۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره بود و در بالاترین سطح، پاسخ کاهش یافت. رطوبت و خاکستر لاشه تغییر نکردند، اما سطوح میانی موجب افزایش پروتئین و کاهش چربی خام شدند که دامنه بهینه آن حدود ۱۱۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. بنابراین، پاسخ‌های رشد و ترکیب لاشه غیرخطی بوده و دامنه‌های بهینه متفاوتی داشتند. مقایسه مستقیم این فرمولاسیون با ویتامین C غیرکپسوله و کیتوزان و ارزیابی اقتصادی آن در مطالعات آینده توصیه می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در رابطه با انجام پژوهش و انتشار این مقاله تعارض منافع وجود ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از امکانات آزمایشگاهی و پشتیبانی فنی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا و واحد علوم و تحقیقات، همچنین از مزرعه ماهی نمرود و شرکت خوراک آبزیان پرشین فید برای همکاری و تأمین مواد اولیه خوراک سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Abdel-Ghany, H.M., Salem, M.E.S. 2020. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish. A review. Reviews in Aquaculture 12: 438-452. DOI: 10.1111/raq.12326.

Adel, A., Khara, H. 2016. The effects of different dietary vitamin C and iron levels on the growth, hematological and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Iranian Journal of Fisheries Sciences 15: 886-897.

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M. R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A., Elsabee, M.Z. 2011. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Carbohydrate Polymers 86: 142-146. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.028.

AOAC. 2023. Official Methods of Analysis of AOAC International. Oxford University Press.

Asaikkutti, A., Vimala, K., Jha, N., Bhavan, P.S., Arul, V. 2023. Effect of dietary supplementation of vitamin C-loaded chitosan nanoparticles on growth, immune-physiological parameters, and resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio harveyi* challenge. Animal Feed Science and Technology 305: 115764. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2023.115764

Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Journal of Controlled Release 235: 337-351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

Carvalho, P.L.P.F., Almeida, P.H.V., Xavier, W.D.S., Vicente, I.S.T., Guimarães, M.G., Rodrigues, E.J.D., Ito, P.I., Pezzato, L.E., Barros, M.M. 2021. Vitamin C supplementation improves growth performance and caudal fin regeneration in zebrafish, *Danio rerio*. Aquaculture Nutrition 27: 115-123. DOI: 10.1111/anu.13407.

Chang, P.K., Tsai, M.F., Huang, C.Y., Lee, C.L., Lin, C., Shieh, C.J., Kuo, C.H. 2021. Chitosan-based anti-oxidation delivery nano-platform: Applications in the encapsulation of DHA-enriched fish oil. Marine Drugs 19: 470. DOI: 10.3390/md19080470.

Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Le Gall, M.M., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. 2011. Imbalanced dietary

ascorbic acid alters molecular pathways involved in skeletogenesis of developing European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Comparative Biochemistry and Physiology 159A: 46-55. DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.01.013.

Dawood, M.A.O., Koshio, S., Esteban, M.Á. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture. A review. Reviews in Aquaculture 10: 950-974. DOI: 10.1111/raq.12209.

Elnagar, M.A., Khalil, R.H., Talaat, T.S., Sherif, A.H. 2024. A blend of chitosan-vitamin C and vitamin E nanoparticles robust the immunosuppressed status in Nile tilapia treated with salt. BMC Veterinary Research 20: 331. DOI: 10.1186/s12917-024-04180-y.

Faccenda, F., Ciani, E., Rossi, L., Vale-Pereira, G., Secci, G., Dias, J., Conceição, L.E.C. 2026. Practical aquafeeds incorporating insect and algae meals achieve quality and growth standards comparable to traditional feeds in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animals 16: 1000. DOI: 10.3390/ani16071000.

Falahatkar, B., Lotfi, A., Safarpour Amlashi, A., Allaf Noveirian, H., Efatpanah, I. 2016. Growth performance, carcass composition, hematological and biochemical indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* juveniles fed diet containing different levels of vitamin premix. Iranian Journal of Ichthyology 3: 53-64. DOI: 10.7508/iji.2016.01.006.

Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Nichols, D.K., Oftedal, O.T. 1998. Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. The Journal of Nutrition 128: 1745-1751. DOI: 10.1093/jn/128.10.1745.

Hernandez, A.J., Roman, D. 2016. Phosphorus and nitrogen utilization efficiency in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed diets with lupin *Lupinus* albus or soybean (*Glycine max*) meals as partial replacements to fish meal. Czech Journal of Animal Science 61: 67-74. DOI: 10.17221/8729-CJA.

Hossam-Elden, N., Abu-Elala, N.M., AbuBakr, H.O., Luo, Z., Aljuaydi, S.H., Khattab, M., Ali, S.E., Marzouk, M.S., Teiba, I.I. 2024. Dietary chitosan nanoparticles enhance growth, antioxidant defenses, immunity, and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fishes 9: 388. DOI: 10.3390/fishes9100388.

Huang, M., Yang, X., Zhou, Y., Ge, J., Davis, D.A., Dong, Y., Gao, Q., Dong, S. 2021. Growth, serum biochemical parameters, salinity tolerance and antioxidant enzyme activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in response to dietary taurine levels. Marine Life Science and Technology 3: 449-462.

Ibrahim, R.E., Amer, S.A., Farroh, K.Y., Al-Gabri, N.A., Ahmed, A. I., El-Araby, D.A., Ahmed, S.A.A. 2021. The effects of chitosan-vitamin C nanocomposite supplementation on the growth performance, antioxidant status, immune response, and disease resistance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. Aquaculture 534: 736269. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736269.

Jalili, R., Tukmechi, A., Agh, N., Noori, F., Ghasemi, A. 2013. Replacement of dietary fish meal with plant sources in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect on growth performance, immune responses, blood indices and disease resistance. Iranian Journal of Fisheries Sciences 12: 577-591.

Jiang, J.K., Wang, J.Y., Zhang, L.M., Liu, X.D., Feng, D.Z., Jiang, K.J., Zhang, D.R. 2012. Effects of dietary chitosan on growth performance, body composition and non-specific immunity of juvenile *Oncorhynchus mykiss*. Oceanologia et Limnologia Sinica 43: 729-734.

Kim, J.H., Hwang, I.J., Park, J.W., Cho, J.H. 2023. Effects of stocking density on the growth, body composition, stress, antioxidant status, and immune

responses of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56: 79-88. DOI: 10.5657/KFAS.2023.0079

Lee, K.W., Yoo, H.K., Kim, S.S., Han, G.S., Jung, M.M., Kim, H.S. 2024. Effect of dietary vitamin C supplementation on growth performance and biochemical parameters in grower walleye pollock, *Gadus chalcogrammus*. Animals 14: article 1026. DOI: 10.3390/ani14071026.

Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J. J., Hussain, S.M. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution before in vitro exposure using dynamic light scattering technique. Toxicological Sciences 101: 239-253.

Nasar, M.F., Shah, S.Z.H., Aftab, K., Fatima, M., Bilal, M., Hussain, M. 2021. Dietary vitamin C requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and its effects on growth attributes, organ indices, whole-body composition and biochemical parameters. Aquaculture Nutrition 27: 1903-1911. DOI: 10.1111/anu.13327.

National Research Council (NRC). 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, DC. The National Academies Press.

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann, A.H., Bush, S.R., Cao, L., Klinger, D.H., Little, D.C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., Troell, M. 2021. A 20-year retrospective review of global aquaculture. Nature 591: 551-563. DOI: 0.1038/s41586-021-03308-6.

Newbury, D.E., Ritchie, N.W.M. 2013. Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative? Scanning 35: 141-168. DOI: 10.1002/sca.21041.

Overturf, K., Welker, T., Barrows, F., Towner, R., Schneider, R., LaPatra, S. 2013. Variation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to biosynthesize eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid when reared on plant oil replacement feeds. Journal of the World Aquaculture Society 44: 326-337.

Rahimnejad, S., Dabrowski, K., Izquierdo, M., Hematyar, N., Imentai, A., Steinbach, C., Policar, T. 2021. Effects of vitamin C and E supplementation on growth, fatty acid composition, innate immunity, and antioxidant capacity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed oxidized fish oil. Frontiers in Marine Science 8: 760587. DOI: 10.3389/fmars.2021.760587

Rahman, M.H., Alam, M.A., Flura, Sultana, S., Islam, M.R. 2023. Effects of dietary vitamin C on the growth performance, antioxidant activity and disease resistance of fish: A review. European Journal of Theoretical and Applied Sciences 1: 751-768. DOI: 10.59324/ejtas.2023.1(5).62

Salam, M.A., Rahman, M.A., Paul, S.I., Islam, F., Barman, A. K., Rahman, Z., Shaha, D.C., Rahman, M.M., Islam, T. 2021. Dietary chitosan promotes the growth, biochemical composition, gut microbiota, hematological parameters and internal organ morphology of juvenile *Barbonymus gonionotus*. PLoS One 16: e0260192. DOI: 1371/journal.pone.0260192.

Sherif, A.H., Khalil, R.H., Talaat, T.S., Baromh, M.Z., Elnagar, M.A. 2024. Dietary nanocomposite of vitamin C and vitamin E enhanced the performance of Nile tilapia. Scientific Reports 14: 15648. DOI: 10.1038/s41598-024-65507-1.

Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R. 2016. Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. Biophysical Reviews 8: 409-427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6.

Stuart, B.H. 2004. Infrared Spectroscopy. Fundamentals and Applications. John Wiley and Sons.

Wang, X., Kim, K.W., Bai, S.C., Huh, M.D., Cho, B.Y. 2003. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*).

Aquaculture 215: 203-211. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00042-X.

Xu, H. J., Jiang, W. D., Feng, L., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S. Y., Tang, L., Tang, W. N., Zhang, Y. A., Zhou, X. Q. 2016. Dietary vitamin C deficiency depresses the growth, head kidney and spleen immunity and structural integrity by regulating NF-κB, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Fish and Shellfish Immunology 52: 111-138. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.02.033.

Xu, C.M., Yu, H.R., Li, L.Y., Li, M., Qiu, X.Y., Fan, X.-Q., Fan, Y.-L. and Shan, L.-L. 2022. Effects of dietary vitamin C on the growth performance, biochemical parameters, and antioxidant activity of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) postsmolts, Aquaculture Nutrition 2022, Article 6866578. DOI: 10.1155/2022/6866578.

Yusuf, A., Huang, X., Chen, N., Apraku, A., Wang, W., Cornel, A., Rahman, M.M., Li, S., Lin, Z., Shen, T. 2021. Growth and metabolic responses of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) to dietary vitamin C supplementation levels, Aquaculture 534: 736243. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736243.