



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 Rezaeisiahkoocheh¹, Seyed Abdolmajid Mousavi^{2*}, Houman Rajabi Islami¹, Mehdi Shamsaie Mehregan¹, Nazanin Farhadyar³

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 vital 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. It 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, SGR, FCR, 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.

Acknowledgements: The authors express their sincere gratitude to Islamic Azad University (Varamin-Pishva and Science and Research Branches) for providing laboratory infrastructure and analytical support. Appreciation is also extended to Namroud Fish Farm and Aqua Aquatic Feed Company for their logistical assistance and provision of feed ingredients.

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





"مقاله پژوهشی"

اثرات ویتامین C کپسوله شده با نانوکیتوزان در جیره بر عملکرد رشد، کارایی خوراک و ترکیب لاشه قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهدی رضایی سیاهکوپه^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 انتشار: ۱۴۰۵/۰۷/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۲

کلمات کلیدی

چکیده

در این مطالعه ویتامین C کپسوله شده با نانوکیتوسان (NC-VitC) را به عنوان یک افزودنی عملکردی خوراک برای قزل آلاهی رنگین کمان (*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 جیره های حاوی ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم نانوکیتوزان ویتامین C به ازای هر کیلوگرم جیره (معادل ۴/۱۷ تا ۳۳/۳۳ میلی گرم معادل ویتامین C) وارد شد. ماهیان با وزن اولیه مشابه به مدت ۶۸ روز در مخازن سه تکراری با جیره های آزمایشی تغذیه شدند. عملکرد رشد، کارایی خوراک بقا و ترکیب تقریبی لاشه ارزیابی شد. در مقایسه با شاهد، مکمل یاری جیره ای با نانوکیتوسان ویتامین C با افزایش وزن نهایی، افزایش وزن روزانه و نرخ رشد ویژه و نیز کاهش ضریب تبدیل غذایی و افزایش نسبت کارایی پروتئین همراه بود ($P < 0.05$). میزان بقا در همه تیمارها بالا باقی ماند. تحلیل رگرسیون درجه دوم نشان داد که پاسخ ها در بالاترین سطح افزودن کاهش حاشیه ای دارند و دامنه بهینه تقریبی ۱۵۰ تا ۱۷۰ میلی گرم نانوکیتوسان ویتامین C به ازای هر کیلوگرم جیره برای بیشینه سازی عملکرد رشد پیش بینی 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. مطلوب ترین پاسخ های لاشه در دامنه تقریبی ۱۱۰ تا ۱۲۰ میلی گرم نانوکیتوسان ویتامین C به ازای هر کیلوگرم جیره مشاهده شد. در مجموع، تیمار ۲۰۰ میلی گرم نانوکیتوزان ویتامین C با بهبود عملکرد رشد و استفاده از خوراک قزل آلاهی رنگین کمان همراه بود، در حالی که پاسخ ترکیب لاشه در دامنه افزودن متفاوتی ظاهر شد.

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های آب‌سرد در آبی‌پروری جهانی و منبع مهمی از پروتئین باکیفیت و اسیدهای چرب بلندزنجیر n-3 برای مصرف انسان است (Overturf et al. 2013; Hernandez & 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، تحت شرایط تنش محیطی و فیزیولوژیک بالا، تقویت کنند (Hernandez & Roman, 2016; Naylor et al. 2021).

ویتامین C (اسید اسکوربیک) یک ویتامین ضروری برای ماهیان است، زیرا تله‌استخوانیان 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 آنتی‌اکسیدانی 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 سایر ماهیان پرورشی مرتبط دانسته شده است (Darias et al. 2011; Xu et al. 2016; Rahimnejad et al. 2021). باین‌حال، اسید اسکوربیک طبیعی بسیار ناپایدار است و در طی فراوری خوراک، نگهداری و هضم در معرض تخریب اکسیداتیو 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 موکوجسب است و می‌تواند نانوذراتی تشکیل دهد که قادر به کپسوله‌سازی ترکیبات زیست‌فعال هستند. گزارش شده است که کیتوزان جیره‌ای و نانوذرات مبتنی بر کیتوزان در چندین گونه ماهی موجب بهبود عملکرد رشد، کارایی خوراک، سلامت روده، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های ایمنی می‌شوند (Abdel-Ghany & Salem, 2020; Hossam-Elden et al. 2021). هنگامی که کیتوزان

به‌عنوان حامل ویتامین C استفاده می‌شود، نانوذرات کیتوزان می‌توانند از اسید اسکوربیک در برابر اکسیداسیون محافظت کنند، زمان ماندگاری آن را در روده افزایش دهند و آزادسازی کنترل‌شده را امکان‌پذیر سازند؛ در نتیجه، اثربخشی زیستی آن افزایش می‌یابد. ر راستای این مفهوم، استفاده از نانوفرمولاسیون‌های حاوی کیتوزان و ویتامین C در 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. 2024; Elnagar et al. 2023). 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 (Adel & Khara, 2021; NRC, 2011; Rahimnejad et al. 2016). 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.

بنابراین، 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

نرم افزار 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 گردید.

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 پارامترهای تحلیلی توصیه‌شده برای نمونه‌های نانومقیاس توسط Ritchie و Newbury (۲۰۱۳) انجام گرفت. 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

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 درصد (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 دی‌یونیزه 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 صورت گرفت. 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 شد و تا زمان استفاده بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

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 گرفت (Stetefeld et al. 2016). توزیع اندازه به‌صورت قطر هیدرودینامیکی متوسط Z گزارش شد. گردآوری و تحلیل داده‌ها با استفاده از

شد (جدول ۱). سایر 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 کربوکسی‌متیل سلولز به عنوان ماده چسباننده آماده شدند. این سطوح افزودن، به ترتیب 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 گردید. 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 به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و در معرض هوا خشک شدند، در کیسه‌های متالایز شده به‌صورت وکیوم بسته‌بندی شدند و تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

جدول ۱ ترکیب مواد اولیه و آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) که پس از یک دوره سازگاری ۱۰ روزه به مدت ۶۸ روز به قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شدند.

Table 1 Ingredient composition and proximate analysis of the experimental diets containing graded levels of nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC) fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for 68 days following a 10-day adaptation period.

Ingredient composition (g/kg diet)	Control	T1 (25mg/kg)	T2 (50mg/kg)	T3 (100mg/kg)	T4 (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)	5	5	5	5	5
Proximate composition (% , as-fed basis)					
Parameter	C	T1	T2	T3	T4
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. 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 کربوکسی‌متیل سلولز (CMC)

به‌عنوان چسباننده بود. تمام جیره‌ها به‌صورت هم‌نیترژن و هم‌چربی فرموله شدند. پرمیکس ویتامینی تهیه شده از

کارخانه تولید غذای آبزیان پرشین فید، فاقد ویتامین C بود و هیچ ویتامین C بلوری به جیره پایه افزوده نشد.

ماهیان و شرایط پرورش

بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان از یک مزرعه تجاری قزل‌آلا نمود فیروزکوه، تهیه و به مرکز تحقیقات آبروری 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 1 ± 30 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 طول دوره تغذیه ۶۸ روزه، ماهیان تحت شرایط کنترل‌شده نگهداری شدند. دمای آب 1 ± 14 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $0.3 \pm 7/5$ میلی گرم در لیتر و pH در دامنه ۷/۲ تا ۷/۶ بود. دمای آب، اکسیژن محلول و pH با استفاده از دستگاه چندپارامتری 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 درصد آب هر مخزن به‌صورت روزانه تعویض شد. سلامت و رفتار ماهیان در طول 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 شد و در مجموع ۱۵ مخزن آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت.

ماهیان در طول 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 کم کردن خوراک باقی‌مانده از کل خوراک ارائه‌شده برآورد گردید. 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 گردید. 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 جهت به دست آمدن وزن میانگین هر مخزن به‌صورت تجمیعی وزن شدند. وزن بدن با استفاده از ترازوی دیجیتال سکوتی (Mahak, MHK-40KG, Iran؛ دقت ۲ گرم) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، طول 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 تجمیعی خوراک طی دوره ۶۸ روزه محاسبه گردید. شاخص‌های عملکرد رشد و کارایی خوراک با در نظر گرفتن مخزن به‌عنوان واحد آزمایشی محاسبه شدند. پارامترهای زیر محاسبه شدند:

(W_i) وزن اولیه - (W_f) وزن نهایی = (گرم، WG) افزایش وزن

$100 \times [(W_i) \text{ وزن اولیه} / (W_f) \text{ وزن نهایی}] = (PWG, \%)$ درصد افزایش وزن

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

$100 \times \text{مدت زمان پرورش} / [\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه} - \text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی}] = (SGR, \text{درصد در روز})$ نرخ رشد ویژه

$(WG) \text{ افزایش وزن (گرم)} / (FI) \text{ مقدار غذای مصرف شده (گرم)} = (FCR)$ ضریب تبدیل غذایی

(PI) مقدار پروتئین مصرفی (گرم) / (WG) افزایش وزن (گرم) = (PER) نسبت کارایی پروتئین
 $100 \times (L^3) \text{ (طول ماهی (سانتی متر) / (W) وزن ماهی (گرم) = (CF) ضریب وضعیت بدنی}$
 $100 \times (\text{تعداد ماهی زنده در ابتدای آزمایش} / \text{تعداد ماهی زنده در پایان آزمایش}) = (SR, \%)$ نرخ بقا

داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شدند و مخزن به عنوان واحد آزمایشی در نظر گرفته شد ($n=3$ برای هر تیمار غذایی). پیش از تحلیل، نرمال بودن داده ها با آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس ها با آزمون لوین بررسی شد. در صورت لزوم، داده های درصدی با تبدیل جذر سینوسی و سایر متغیرها با تبدیل لگاریتمی برای برآورده کردن مفروضات تحلیل واریانس تبدیل شدند؛ با این حال، میانگین های تبدیل نشده برای وضوح ارائه شده اند. اثر تیمارهای غذایی با تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) بررسی و در صورت مشاهده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$)، مقایسه میانگین ها با آزمون توکی (HSD) انجام شد. برای توصیف روابط پاسخ-دوز میان سطوح جیره ای نانوکیتوزان ویتامین C و شاخص های عملکرد رشد و استفاده از خوراک، تحلیل رگرسیون درجه دوم به کار رفت. تمام تحلیل های آماری با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۶؛ IBM Corp., Armonk, NY, USA) انجام شد.

نتایج

مشخصه یابی فیزیکی و شیمیایی نانوذرات کیتوزان-ویتامین C
طیف سنجی FTIR کیتوزان و نانوذرات کیتوزان-ویتامین C

طیف های FTIR نانوذرات کیتوزان خالی (CHITOVCB) و نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با ویتامین C (CHITOVCF) در شکل ۱ نشان داده شده اند. هر دو فرمولاسیون در ناحیه ۳۲۰۰ تا ۳۵۰۰ بر سانتی متر یک باند جذبی پهن داشتند. تفاوت هایی در شکل و شدت این باند بین دو فرمولاسیون مشاهده شد که می تواند به هم پوشانی ارتعاش های کششی O-H و N-H، که در سامانه های مبتنی بر کیتوزان معمول هستند، نسبت داده شود.

در این معادلات، W_i و W_f به ترتیب میانگین وزن اولیه و نهایی بدن (گرم)، t مدت آزمایش (۶۸ روز)، Protein intake مقدار پروتئین مصرفی (گرم) که از حاصل ضرب کل خوراک خشک مصرف شده در کسر پروتئین خام جیره به دست آمد، W وزن بدن (گرم) و L طول کل (سانتی متر) هستند (NRC, 2011; Jalili et al. 2013; Huang et al. 2021).

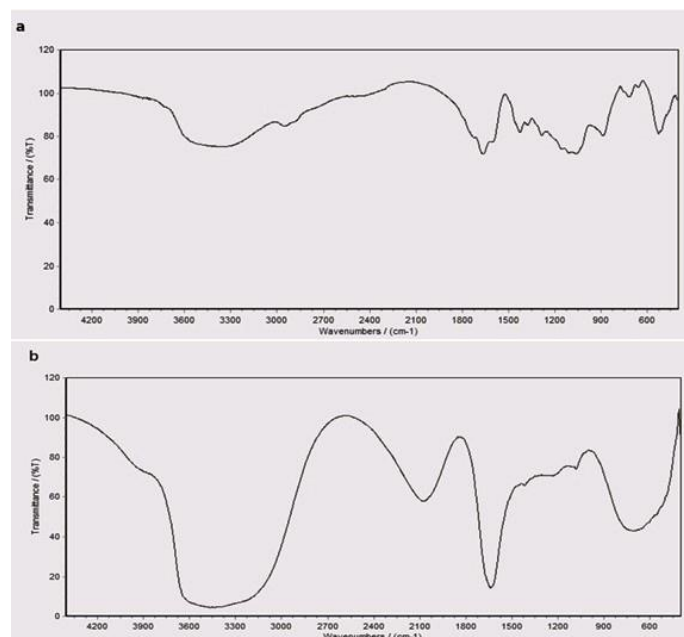
ترکیب تقریبی لاشه

در پایان دوره تغذیه، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشته شدند و سپس با استفاده از دوز بیش از حد ماده بیهوشی، به روش انسانی آسان کشی شدند. پس از شست و شو با آب مقطر و خشک کردن سطحی، ماهی ها تشریح و احشا خارج شدند. احشا و کبد برداشته شد و بافت باقی مانده لاشه برای تحلیل ترکیب تقریبی نگهداری گردید. نمونه های لاشه بر اساس مخزن، به عنوان واحد آزمایشی، تجمع و با استفاده از مخلوط کن آزمایشگاهی همگن شدند و مطابق روش های استاندارد AOAC (۲۰۲۳) اندازه گیری شدند. رطوبت، پروتئین خام (روش کلدال؛ $N \times 6.25$)، چربی خام (استخراج سوکسله با پترولیوم اتر) و خاکستر (۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت) تعیین شدند. نتایج برحسب درصد وزن تر گزارش شدند.

بیانیه اخلاقی

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

تجزیه و تحلیل آماری



شکل ۱ طیف‌های FTIR نانوذرات کیتوزان با و بدون ویتامین C

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.

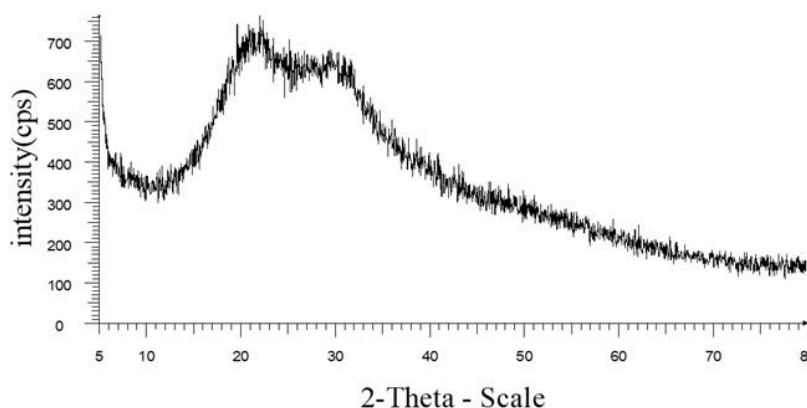
مجموع، این تغییرات طیفی نشان می‌دهند که بارگذاری ویتامین C محیط شیمیایی گروه‌های عاملی را درون ماتریس نانوذرات کیتوزان تغییر داده است (شکل ۱).

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 بلوری شده شدید همراه هستند. در دامنه اسکن شده ۲θ، بازتاب‌های شدید یا کاملاً تعریف‌شده‌ای مشاهده نشد که نشان‌دهنده درجه پایین نظم ساختاری دوربرد و ماهیت عمدتاً آمورف نمونه تحلیل‌شده است (شکل ۲).

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 سایر نواحی مربوط به گروه‌های عاملی نشان می‌دهند که مؤید برهم‌کنش‌های مولکولی بین کیتوزان و ویتامین C در فرمولاسیون بارگذاری‌شده است.

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 پلی‌ساکارییدی نسبت داده می‌شود، بین CHITOVCB و CHITOVCF تغییرات قابل‌توجهی نشان داد. در



شکل ۲ الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با ویتامین C

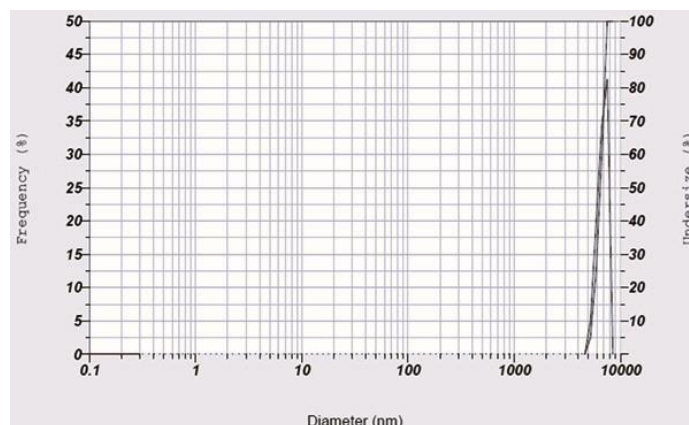
Figure 2 X-ray diffraction (XRD) pattern of vitamin C-loaded chitosan nanoparticles

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.

نتایج پراکندگی نور دینامیکی (DLS) در شکل ۳ ارائه شده‌اند. قطر هیدرودینامیکی با وزن دهی شدت در محدوده میکرومتری قرار داشت و میانگین آن تقریباً 671.0 ± 6399.8 نانومتر و نمای آن حدود 6736.9 نانومتر بود. این نتایج نشان می‌دهند که اجسام پراکنده شده اندازه‌گیری شده 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 اعمال شده اندازه‌گیری نشان می‌دهند (شکل ۳).

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 پراکنده شدن/کپسوله شدن ویتامین C درون ماتریس کیتوزان سازگاری دارد.

توزیع اندازه هیدرودینامیکی در سوسپانسیون (DLS)



شکل ۳ توزیع اندازه‌گیری شده با DLS برای سوسپانسیون نانوذرات

Figure 3 Dynamic light scattering (DLS) size distribution of the nanoparticle suspension

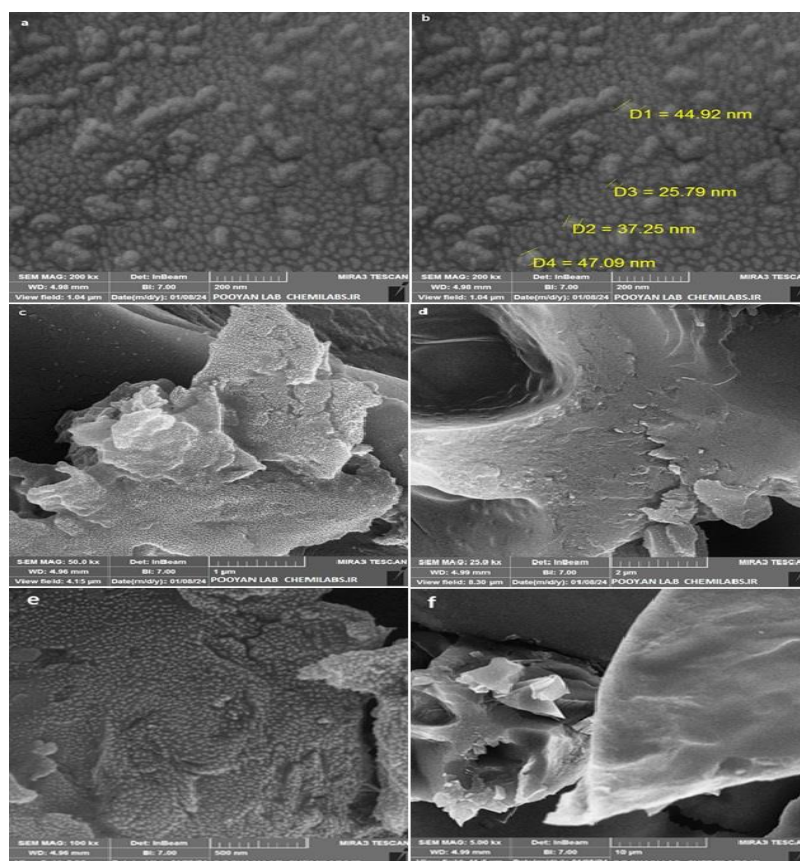
DLS results for the nanoparticle dispersion showing the intensity-weighted hydrodynamic size distribution (and summary statistics, as reported by the instrument). The micrometer-range

hydrodynamic diameter reflects aggregate/agglomerate size in suspension under the measurement conditions rather than the primary particle size.

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 به صورت مجموعه‌های خوشه‌ای مشاهده شدند. این یافته اندازه هیدرودینامیکی بزرگ‌تر به دست آمده از DLS را توضیح می‌دهد، زیرا این روش ذرات موجود در سوسپانسیون را اندازه‌گیری کرده و به تشکیل تجمعات حساس است. از این رو، نتایج FE-SEM و DLS باید مکمل یکدیگر و نه متناقض با هم در نظر گرفته شوند.

نتایج پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای سوسپانسیون نانوذرات که توزیع اندازه هیدرودینامیکی وزن‌دهی شده 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/به هم چسبیدگی در سوسپانسیون تحت شرایط اندازه‌گیری است و نشان‌دهنده اندازه ذرات اولیه نیست.

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



شکل ۴ تصاویر FE-SEM نانوذرات کیتوزان-ویتامین C

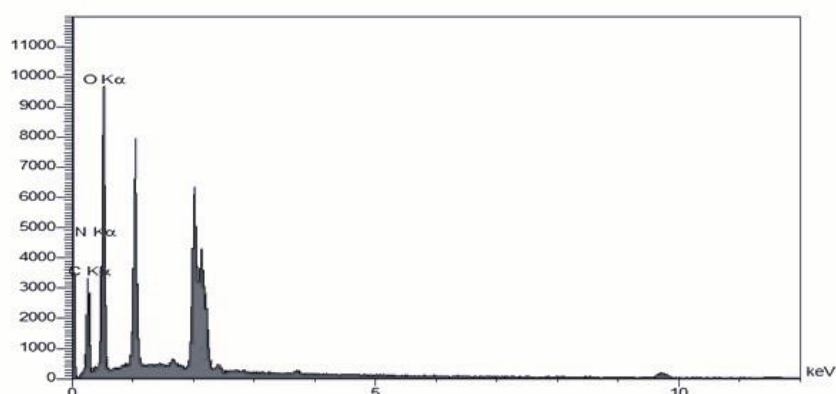
Figure 4 FE-SEM micrographs of chitosan-vitamin C nanoparticles

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.

تحليل EDS برای بررسی ترکیب عنصری نانوذرات CS-VitC تهیه شده انجام شد (شکل ۵). طيف به دست آمده سيگنال های اصلی مربوط به کربن، نيتروژن و اکسيژن را نشان داد که با ترکیب مورد انتظار فرمولاسيون مبتني بر کیتوزان حاوی ویتامین C مطابقت داشت. همچنین، قله آشکاري مربوط به عناصر معدني مشاهده نشد که نشان دهنده نبود ناخالصی های معدني قابل توجه در نمونه تحليل شده است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) از CHITOVCF در بزرگنمایی های مختلف (a-f) که ویژگی های دانه ای در مقیاس نانو را نشان می دهند که درون تجمعات خشک شده بزرگ تر آرایش یافته اند. پیل (b) اندازه گیری های نماینده ای از اندازه ذرات در محدوده چند ده نانومتر را نشان می دهد. نوارهای مقیاس در هر پیل ارائه شده اند.

ترکیب عنصری (EDS)



شکل ۵ طيف EDS نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با ویتامین C

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.

ویتامین C کپسوله شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) به مدت ۶۸ روز در جدول ۲ ارائه شده است. وزن اولیه بین تیمارها اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$) که نشان دهنده شرایط آغازین مشابه بود. در مقابل، وزن نهایی، افزایش وزن، درصد افزایش وزن، افزایش وزن روزانه، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، نسبت کارایی پروتئین و ضریب وضعیت تحت تأثیر معنی دار تیمار غذایی قرار گرفتند ($P < 0.05$)، در حالی که بقا به طور معنی داری تحت تأثیر قرار نگرفت.

طیف سنجی پرتو ایکس با پراکندگی انرژی (EDS) مربوط به CHITOVCF که سیگنال های غالب عناصر C، N و O را نشان می دهد؛ این نتایج با ماهیت آلي سامانه مبتني بر کیتوزان سازگار بوده و عدم وجود آلاینده های معدني عمده در ناحیه مورد بررسی را تأیید می کند.

عملکرد رشد و کارایی خوراک

عملکرد رشد، کارایی خوراک، بقا و ضریب وضعیت قزل آلاي رنگين کمان تغذیه شده با جیره های حاوی سطوح مختلف

جدول ۲ عملکرد رشد، کارایی خوراک، بقا و ضریب وضعیت قزل آلاي رنگين کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با

جیره های مکمل شده با ویتامین C کپسوله شده 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

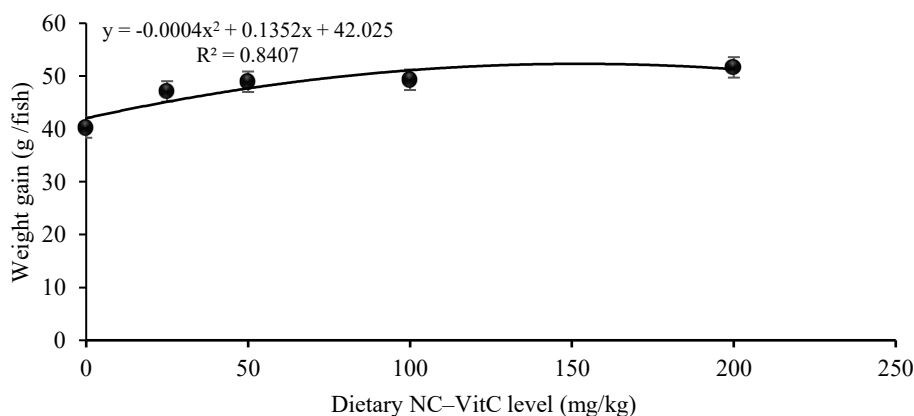
Parameter	C (Control)	T1(25)	T2(50)	T3(100)	T4(200)
-----------	-------------	--------	--------	---------	---------

Wi (g)	29.02 ± 0.16 ^a	29.47 ± 0.90 ^a	29.70 ± 0.54 ^a	29.98 ± 0.45 ^a	29.32 ± 0.89 ^a
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 ^c	1.07 ± 0.06 ^b	0.94 ± 0.03 ^a	1.11 ± 0.05 ^b	0.96 ± 0.02 ^a
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

از ۴۰/۲۶ به ۵۱/۶۵ گرم، افزایش وزن روزانه از ۰/۵۹ به ۰/۷۶ گرم در روز و نرخ رشد ویژه از ۱/۲۸ به ۱/۴۹ درصد در روز رسید. اگرچه عملکرد رشد در همه گروه‌های مکمل‌شده بهبود یافت، تفاوت بین سطوح بالاتر مکمل‌یاری در همه موارد معنی‌دار نبود.

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 معنی‌داری 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



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

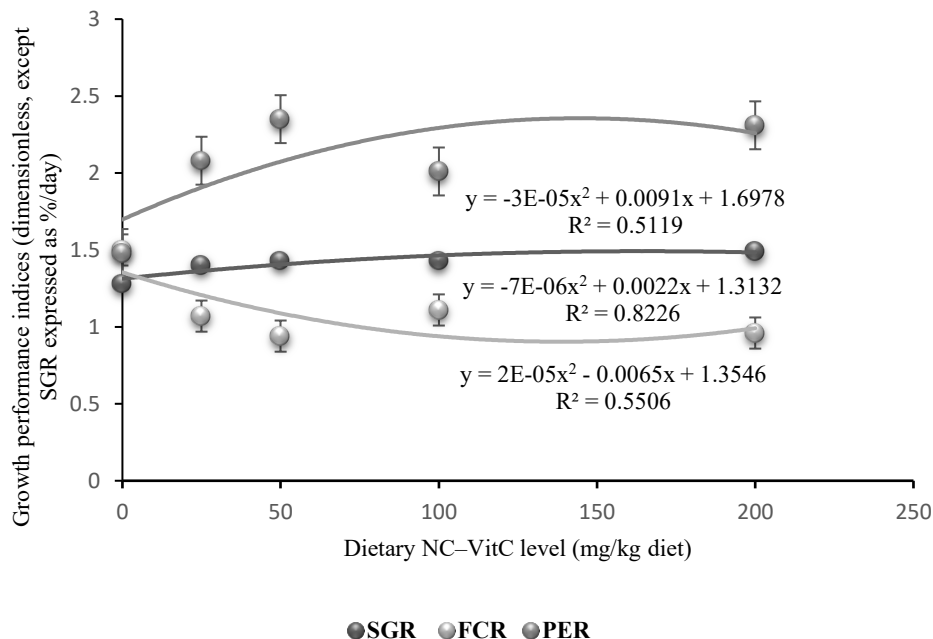
Figure 6 Quadratic regression between dietary nanochitosan-encapsulated vitamin C (NC-VitC) level and weight gain (g/fish) of rainbow trout after the feeding trial

غذایی و کمترین نسبت کارایی پروتئین را داشت، در حالی که در تیمارهای مکمل‌شده، ضریب تبدیل غذایی کمتر و

کارایی خوراک نیز با مکمل‌یاری جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C بهبود یافت. گروه شاهد بیشترین ضریب تبدیل

معنی دار تیمار غذایی قرار گرفت، اگرچه تغییرات بین گروه‌های مکمل شده در مقایسه با شاخص‌های رشد، یکنواختی کمتری داشت.

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 تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوکیتوزان ویتامین C است. میزان بقا در همه تیمارها بالا باقی ماند و بین گروه‌ها اختلاف معنی داری نداشت. ضریب وضعیت تحت تأثیر



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 قزل آلاي رنگين کمان

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

ترکیب تقریبی لاشه

ترکیب تقریبی لاشه بچه‌ماهیان قزل آلاي رنگين کمان تغذیه شده 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 معنی داری نداشت ($P > 0.05$)، اما مقدار پروتئین خام و چربی خام لاشه به‌طور معنی داری تحت تأثیر سطح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C قرار گرفت ($P < 0.05$).

تحلیل رگرسیون درجه دوم نشان داد که بین سطح جیره‌ای نانوکیتوزان ویتامین C و شاخص‌های اندازه‌گیری شده 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 جیره‌ای با نانوکیتوزان ویتامین C در شرایط این مطالعه، عملکرد رشد و استفاده از خوراک قزل آلاي رنگين کمان را بهبود داده است.

جدول ۳ ترکیب تقریبی لاشه (درصد وزن تر) بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره های مکمل شده با ویتامین C کپسوله شده 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

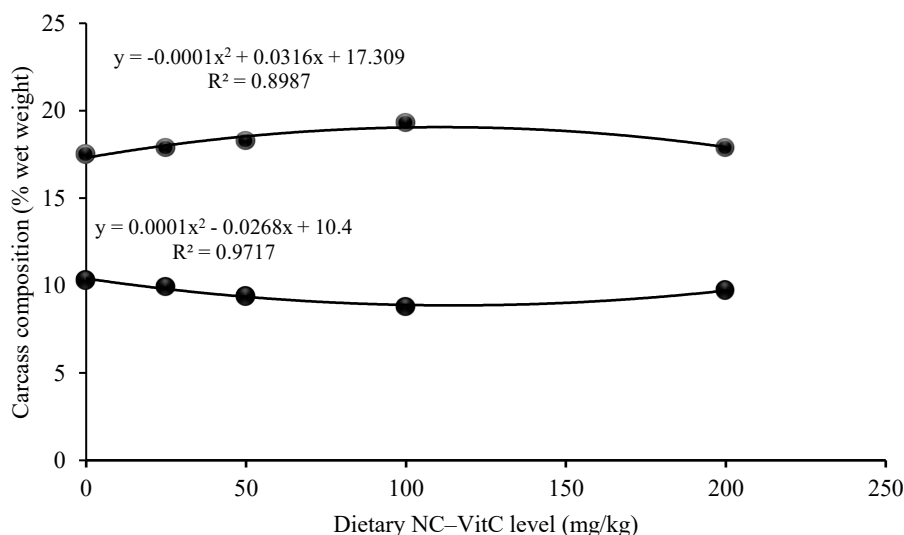
Parameter (% wet weight)	C (Control)	T1 (25)	T2 (50)	T3 (100)	T4 (200)
Crude protein	17.50 ± 0.30 ^b	17.87 ± 0.25 ^b	18.27 ± 0.25 ^b	19.30 ± 0.36 ^a	17.87 ± 0.51 ^b
Crude lipid	10.30 ± 0.20 ^c	9.93 ± 0.25 ^{bc}	9.40 ± 0.20 ^b	8.80 ± 0.20 ^a	9.73 ± 0.25 ^{bc}
Moisture	72.03 ± 0.45 ^a	71.80 ± 0.30 ^a	71.33 ± 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). Ash values were converted 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.

دریافت کننده دوز ۲۵ یا ۲۰۰ تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

تحلیل رگرسیون درجه دوم برای توصیف روابط بین سطح جیره های نانوکیتوزان و ویتامین C و پروتئین خام و چربی خام لاشه استفاده شد (شکل ۸). مدل های برازش شده در سطوح میانی نانوکیتوزان و ویتامین C، به ترتیب بیشینه پاسخ برای پروتئین لاشه و کمینه پاسخ برای چربی لاشه را نشان دادند.

بیشترین مقدار پروتئین خام لاشه در ماهیان تغذیه شده با ۱۰۰ میلی گرم نانوکیتوزان و ویتامین C بر کیلوگرم جیره مشاهده شد و این مقدار به طور معنی داری بیشتر از شاهد و سایر گروه های مکمل شده بود. در مقابل، مقدار چربی خام لاشه در تیمار ۳ کمترین و در گروه شاهد بیشترین مقدار بود. ماهیان تغذیه شده با دوز ۵۰ و ۱۰۰ چربی خام کمتری نسبت به شاهد داشتند، در حالی که بین شاهد و ماهیان



شکل ۸ رگرسیون درجه دوم بین سطح جیره های ویتامین C کپسوله شده با نانوکیتوزان و ترکیب تقریبی لاشه، شامل مقدار پروتئین خام و چربی خام (درصد وزن تر)، در قزل آلائی رنگین کمان در پایان دوره تغذیه

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 و 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 طول دوره تغذیه بررسی کرد. در مجموع، مکمل‌یاری جیره‌ای 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؛ از این‌رو 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 این حال، از آنجا که اندازه‌گیری‌های مستقیم مکانیزمی در این مطالعه انجام نشد، مسیرهای زیربنایی همچنان نامشخص هستند.

مکمل‌یاری جیره‌ای 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 سایر 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؛ به‌گونه‌ای 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. 2003; Wang et al. 1998). نیاز گزارش‌شده به ویتامین C در ماهیان پرورشی بر اساس گونه، مرحله رشد و معیار پاسخ متفاوت است (Rahman et al. 2023; Xu et al. 2022)، 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 سایر ماهیان پرورشی گزارش شده است (Dawood et al. 2018). با این حال، از آنجا که خوراک مصرفی، قابلیت هضم و نقاط پایانی متابولیکی 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 & 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

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 T4 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، اگرچه 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 & 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 متابولیکی 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

سطوح متوسط افزودن، توصیف کرده‌اند (Abdel-Ghany & Salem, 2020; Dawood et al. 2018). همچنین، نانوفرمولاسیون‌های ویتامین C مبتنی بر کیتوزان اثرات مفیدی بر رشد و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک تیلاپیا نشان داده‌اند (Elnagar et al. 2024; Ibrahim et al. 2021; Sherif et al. 2024). بااین‌حال، 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 نانوکیتوزان ویتامین C از ۸۸/۳۳ درصد در شاهد به ۹۶/۶۷ درصد در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم افزایش یافت اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

نتایج نشان داد مکمل‌سازی جیره با ویتامین C کپسوله‌شده در نانوکیتوزان، ضریب تبدیل غذایی را در تمام تیمارها نسبت به شاهد (۱/۵) به‌طور معنی‌داری کاهش داد و کمترین مقادیر در تیمارهای T2 و T4، 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 اکسیداسیون 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 FCR بین ۰/۷۲ تا ۰/۷۴ را گزارش کردند. بااین‌حال، پاسخ غیرخطی تیمارها نشان می‌دهد که براساس FCR، سطح T2 کارآمدترین دوز بود، درحالی‌که T4 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 قزل‌آلای 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 قزل‌آلای با وزن اولیه حدود ۳۲ گرم طی ۱۲ هفته به وزن نهایی ۴۴/۸۵ تا ۷۹/۱۸ گرم رسیدند که معادل افزایش

بود و در بالاترین سطح، پاسخ کاهش یافت. رطوبت و خاکستر لاشه^۷ تغییر نکردند، اما سطوح میانی موجب افزایش پروتئین و کاهش چربی خام شدند که دامنه بهینه آن حدود ۱۱۰ تا ۱۲۰ میلی گرم 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 نمرد و شرکت خوراک آبریان 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.
- 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.

نانومتری، تقریباً ۲۵.۷۹ تا ۴۷.۰۹ نانومتر، در طی فرایند فرمولاسیون تشکیل شدند که بیانگر ایجاد ساختارهای نانومقیاس بود. در مقابل، اندازه‌گیری‌های DLS قطره‌های 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 (Bhattacharjee, 2016; Murdock et al. 2008).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ویتامین C کپسوله‌شده با نانوکیتوزان (NC-VitC) به جیره، رشد و کارایی خوراک قزل آلائی رنگین کمان را در شرایط آزمایشی حاضر بهبود بخشید، بقا در همه تیمارها بالا باقی ماند و تفاوت معنی‌داری نداشت؛ با این حال، ضریب وضعیت در بالاترین سطح افزودن نانوکیتوزان ویتامین C به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. براساس رگرسیون درجه دوم، دامنه بهینه برای رشد حدود ۱۵۰ تا ۱۷۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره

- 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.
- Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235: 337-351.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 & 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.
- 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. and 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. and 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.
- Newbury, D.E., Ritchie, N.W.M. 2013. Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative? *Scanning* 35: 141-168.
- 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.
- 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.
- 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.
- Stuart, B.H. 2004. *Infrared Spectroscopy. Fundamentals and Applications*. John Wiley & 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- κ B, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fish & Shellfish Immunology* 52: 111-138.
- 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.