دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳
http://japu.gau.ac.ir

# اثر ویتامین C جیره غذایی بر رشد و ترکیب اسیدهای چرب بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

**مریم خواجوی[۱] و*عبدالمحمد عابدیان کناری[۲]**
[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه تربیت مدرس،
[۲] استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۷

## چکیده

در این پژوهش، شاخص‌های رشد و تغییرات پروفیل اسیدهای چرب بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) با میانگین وزنی ۰/۱ ±۰/۰۲ گرم تحت تاثیر سطوح مختلف ویتامین C بررسی گردید. بدین‌منظور ۵ جیره‌ی غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین به‌ازای هر کیلوگرم غذا) در سه تکرار و به مدت ٦ هفته به بچه‌ماهیان خورانده شد. پس از گذشت ٦ هفته پرورش، نتایج حاصل از شاخص‌های رشد و زنده‌مانی اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نشان داد ($P$<۰/۰۵) پایین‌ترین درصد BWG، SGR و زنده‌مانی در گروه شاهد و بالاترین درصد این فاکتورها در گروه تغذیه شده با سطح ۷۵۰ میلی‌گرم ویتامین C مشاهده گردید. نتایج حاصل از بررسی ترکیب اسیدهای چرب بدن نشان داد اسیدهای چرب PUFA، HUFA، ۳-$n$ و ٦-$n$ تحت تاثیر سطوح مختلف ویتامین C جیره‌ی غذایی از تیمار شاهد به تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم اختلاف معنی‌داری نداشت ($P$ > ۰/۰۵). فاکتورهای مذکور پایین‌ترین میزان را در تیمار شاهد و بالاترین مقادیر را در تیمار ۷۵۰ میلی‌گرم نشان دادند. بالاترین مقدار اسیدهای چرب SFA در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم مشاهده گردید. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که بچه‌ماهی آزاد دریای خزر جهت حفظ سلامت و بهبود رشد و عملکرد فیزیولوژیک خود در شرایط معمول و استرس‌زا نیازمند حضور ویتامین C در جیره‌ی غذایی است.

***واژه‌های کلیدی:*** ویتامین C، رشد، اسید چرب، بچه ماهی نورس، ماهی آزاد دریای خزر

*مسئول مکاتبه: aabedian@yahoo.co.uk

**مقدمه**

چربی‌ها و اسیدهای چرب سازنده آنها، به‌همراه پروتئین‌ها، اصلی‌ترین جزء ترکیبات آلی بدن ماهی بوده و منبع اصلی انرژی سوخت و سازی برای رشد، تولیدمثل، حرکت و مهاجرت به‌شمار می‌آیند (تاچر، ۲۰۰۳). همچنین چربی‌ها نقش اساسی در رشد، عملکرد بهینه آبشش و کلیه، تکامل سیستم عصبی و بینایی و همچنین تولیدمثل دارند (مورنته و همکاران، ۲۰۰۷). ماهیان سرشار از اسیدهای چرب بلند زنجیره‌ی غیراشباع (PUFA) به‌ویژه (HUFA؛ EPA و DHA) هستند که نقش حیاتی در ساختار و عملکرد غشای سلولی ایفا می‌کنند با این وجود این ترکیبات به‌شدت در معرض آسیب‌های ناشی از اکسیژن و دیگر رادیکال‌های آزاد زیستی قرار دارند (هالیول، ۲۰۱۲). تخریب PUFA موجود در فسفولیپیدهای غشاء می‌تواند بر ساختار و عملکرد غشای سلولی تاثیر گذاشته و در نتیجه باعث بروز اثرات آسیب‌شناختی بر سلول و بافت گردد (مورنته و همکاران، ۲۰۰۷). رادیکال‌های آزاد طی فرآیندهای فیزیولوژیک معمول در پاسخ به استرس‌های محیطی تولید می‌شوند و قادرند به پروتیین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب برسانند (گائو و همکاران، ۲۰۱٤). تخریب اسیدهای نوکلئیک می‌تواند جهش، تخریب لیپید، مرگ سلول و تخریب پروتیین، مهار آنزیم‌ها را به‌دنبال داشته باشد (نژلالا و همکاران، ۲۰۱۰).

وجود اکسیژن به عنوان آخرین گیرنده الکترونی در تنفس سلولی، برای زندگی هوازی ضروری است و حدود ۵ درصد از اکسیژنی که تنفس می‌شود به گونه‌های فعال اکسیژنی ROS[1] تبدیل می‌گردد (باندی اپاژیا و بانرجی، ۱۹۹۹؛ هالیول، ۲۰۱۲). ROS هایی مانند آنیون سوپراکسید ($O_2^-$)، پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) و رادیکال هیدروکسیل (OH) سبب استرس اکسیداتیو می‌شوند و عملکرد سلول را مختل می‌کنند (راها و روبینسون، ۲۰۰۰؛ تانیاما و گریندلینگ، ۲۰۰۳). سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن به دو صورت آنزیمیک و غیرآنزیمیک اقدام به حذف رادیکال‌های آزاد می‌کند که آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی خود به دو دسته‌ی ضروری (ویتامین‌ها: E و C و پیش‌سازهای ویتامین‌ها: کارتنوئیدها) و غیرضروری (ترکیبات دارای وزن مولکولی کم و با مبنای پلی فنولی) تقسیم می‌شوند (اسمیرنف و گلن، ۲۰۰۰؛ هرنا و بارباس، ۲۰۰۱؛ تورس و همکاران، ۲۰۰۸).

ویتامین C یا آسکوربیک اسید (AA) یکی از ویتامین‌های گروه محلول در آب بوده که دارای نقش‌های متابولیک متعدد به‌ویژه به‌عنوان یک کوفاکتور، در واکنش‌های هیدروکسیلاسیون عمل نموده

1. Reactive Oxigen Species

و یک مادهی کاهندهی بیولوژیک قوی در بافت‌ها و سلول‌ها می‌باشد و در صورت کمبود آن، علائمی همچون ناهنجاری اسکلتی، تاخیر در رشد، تغییر شکل بافت غضروف، بی‌اشتهایی و سرکوب سیستم ایمنی بروز می‌کند (دابروسکی، ۲۰۰۱). همچنین این ویتامین جزء ضروری جیره برای حفظ بقا و رشد بهینه ماهی است (تواری و پاترا، ۲۰۰۸). نقش آنتی‌اکسیدانی ویتامین C محدود به محیط آبی است اما این نقش را در چربی نیز به‌واسطه‌ی احیای مجدد ویتامین E اعمال می‌کند (لیم و همکاران، ۲۰۱۰؛ دابروسکی، ۲۰۱۰). ویتامین E از پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در غشای سلولی، میتوکندری و شبکه‌ی آندوپلاسمی جلوگیری کرده و به حفظ یکپارچگی آن‌ها کمک می‌کند (شلوتر و جانستون, ۲۰۱۱). بنابراین فرآیند تخریب اسیدهای چرب غیراشباع با عملکرد مشترک این دو ویتامین در جهت حذف رادیکال‌های آزاد مهار می‌شود (مورنته و همکاران، ۲۰۰۷).

اثر ویتامین C بر رشد و زنده‌مانی گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است که در ذیل به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود: اویسی‌پور و همکاران، (۱۳۸۵)، (*Acipenser persicus*)؛ ژیائو و همکاران، (۲۰۱۰)، (*Rachycentron canadum*)؛ ائو و لی، (۲۰۰۸)، (*Takifugu rubripes*)؛ کوماری و ساهو، (۲۰۰۵)، *Clarias batrachus*؛ آیی و همکاران، (۲۰۰٤)، (*Lateolabrax japonicus*)؛ کولکوسکی و همکاران، (۲۰۰۰)، (*Stizostedion vitreum*)؛ ناواره و هالور (۱۹۸۹)، (*Oncorhynchus Mykiss*). در زمینه اثر آنتی‌اکسیدان‌ها بر پروفیل اسیدهای چرب پژوهش‌هایی صورت گرفته است (اویسی‌پور و همکاران، (۱۳۸۵)؛ وفرز و سیس، (۱۹۸۷)؛ رتسکی و فری، (۱۹۹۵)؛ شانگ و همکاران، (۲۰۰۲) و پوآنگ کاو و همکاران، (۲۰۰۵)؛ گائو و همکاران، (۲۰۱٤). ولی در زمینه اثر ویتامین C بر روی پروفیل اسید چرب بر روی بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر پژوهشی انجام نشده است. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر سطوح مختلف ویتامین C بر پروفیل اسیدهای چرب بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

تخم چشم‌زده‌ی ماهی آزاد دریای خزر از مرکز تکثیر و پرورش قزل چشمه‌ی کوثر واقع در روستای عسل محله شهرستان تنکابن تهیه گردیده و به سالن پرورش آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت. پس از جذب کامل کیسه‌ی زرده، تغذیه‌ی فعال با غذای پایه‌ی فاقد ویتامین C آغاز و جهت سازگارسازی به‌مدت یک هفته ادامه یافت. سپس ماهیان با وزن اولیه‌ی

۱۰۰ میلی‌گرم و تراکم ۰/۱ گرم در لیتر، در قالب ۵ تیمار در تانک‌های ۹۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. غذادهی ۵ نوبت در روز در حد سیری انجام شد. تانک‌ها هر روز قبل از اولین و پس از آخرین وعده‌ی غذایی سیفون شدند. به‌منظور تامین اکسیژن از سنگ هوا استفاده گردید. آزمایش در سالن سرپوشیده، با دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به‌مدت ٦ هفته، انجام شد.

**فرمولاسیون و آماده‌سازی جیره‌ی غذایی:** فرمولاسیون جیره‌های آزمایشی با سطوح مختلف ویتامین C، توسط نرم‌افزار لیندو انجام شد. به‌منظور آماده‌سازی جیره‌ی آزمایشی، اجزای خشک جیره پس از تهیه، از الک ۱۰۰ میکرون گذرانده و سپس با دستگاه همزن به‌خوبی با یکدیگر مخلوط گردید. ویتامین C در ابتدا با سلولز مخلوط گردیده سپس به سایر اجزای غذایی افزوده شد. سپس روغن لسیتین، روغن ماهی و روغن سویا به مخلوط به‌دست آمده اضافه گردید. پس از اضافه کردن آب به مخلوط، عمل اختلاط ادامه یافت سپس توده‌ی غذا جهت ساخت پلت به چرخ گوشت منتقل شد، پلت‌های ساخته شده پس از خشک شدن از الک‌های ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ میکرون عبور داده شده و تا زمان استفاده در کیسه‌های جداگانه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. جیره آزمایشی به‌دلیل حساسیت ویتامین C یک هفته قبل از شروع آزمایش تهیه گردید (جدول ۱).

**جدول ۱- اجزا و ترکیب تقریبی غذای ساخته شده جهت تغذیه بچه‌ماهیان**

| اجزای جیره‌های آزمایشی | | | تیمار | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (گرم در کیلوگرم غذا) | شاهد | ۵۰ | ۲۵۰ | ۷۵۰ | ۱۵۰۰ |
| کازئین[1] | ٤۹۰ | ٤۹۰ | ٤۹۰ | ٤۹۰ | ٤۹۰ |
| ژلاتین[2] | ۱۳۵ | ۱۳۵ | ۱۳۵ | ۱۳۵ | ۱۳۵ |
| دکسترین[2] | ۱۷۷/۳ | ۱۷۷/۳ | ۱۷۷/۳ | ۱۷۷/۳ | ۱۷۷/۳ |
| روغن ماهی[3] | ٦۵ | ٦۵ | ٦۵ | ٦۵ | ٦۵ |
| روغن سویا[4] | ٦۵ | ٦۵ | ٦۵ | ٦۵ | ٦۵ |
| لسیتین[3] | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۰ |
| آنتی اکسیدان[3] | ۰/۲ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۰/۲ |
| ضد قارچ[3] | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ |
| مکمل معدنی[3] | ۲۰ | ۲۰ | ۲۰ | ۲۰ | ۲۰ |
| مکمل ویتامینی[5] | ۲/۵ | ۲/۵ | ۲/۵ | ۲/۵ | ۲/۵ |
| ویتامین C[6] | ۰ | ۰/۰۵ | ۰/۲۵ | ۰/۷۵ | ۱/۵ |
| کریر | ۵ | ٤/۹۵ | ٤/۷۵ | ٤/۲۵ | ۳/۵ |

**ادامه جدول ۱-**

| ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی (٪ ماده خشک) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| پروتئین | ٥٦/٤٦ | ٥٧/٤ | ٥٨/٥ | ٥٧/٦٦ | ٥٧/٠٨ |
| چربی کل | ١٤/٧ | ١٢/٩٢ | ١٤/٥٤ | ١٣/١٩ | ١٣/٦٨ |
| خاکستر | ٩/٠٣ | ٨/٤٤ | ٨/٥٧ | ٨/٧٩ | ٨/٥٩ |
| کربوهیدرات | ١٩/٧٨ | ٢١/٢٣ | ١٨/٣٨ | ٢٠/٣٤ | ٢٠/٦٤ |
| انرژی ناخالص | ٢٢/٥٤ | ٢٢/٣ | ٢٢/٧١ | ٢٢/٣٢ | ٢٢/٤٢ |

۱. شرکت Fluka، ۲. شرکت سیگما، ۳. کارخانه خوراک دام و آبزیان ساری، ٤. شرکت غنچه، ٥. شرکت ارسبازار آمل، ٦. شرکت F.Haffman-La Roch. مکمل ویتامینی حاوی ویتامین‌های: A=١٢٠٠٠٠ IU، D3 =٤٠٠٠٠ IU، E–٣٠٠ میلی‌گرم، K3– ١٢٠ میلی‌گرم، B1– ٢٠ میلی‌گرم، B2– ٣٣٦ میلی‌گرم، B7– ٧٢٠ میلی‌گرم، B5– ٩٠٠ میلی‌گرم، B6– ٢٤٠ میلی‌گرم، B9– ٦٠ میلی‌گرم، B12– ٠/٤میلی‌گرم و کریر تا ١٠٠ میلی‌گرم می‌باشد. هرکیلوگرم مکمل معدنی شامل آهن: ٢٠ گرم، روی: ٦٠ گرم، سلنیم: ٤٠٠ میلی‌گرم، کبالت: ٢٠٠ میلی‌گرم، مس: ٢ گرم، منگنز: ٤٠ گرم، ید: ٤٠٠ میلی‌گرم، کولین کلراید: ٦٠ گرم، کریر: تا ١کیلوگرم می‌باشد.

پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت بر حسب درصد ماده‌ی خشک است. محاسبه کربوهیدرات بر حسب رابطه (پروتئین + چربی + خاکستر+ رطوبت)– ١٠٠ و محاسبه انرژی ناخالص بر حسب کیلوژول بر گرم جیره از رابطه حاصل‌ضرب مقدار مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (٢٣/٦ کیلو ژول)، چربی (٣٩/٥ کیلو ژول) و کربوهیدرات (١٧/٢ کیلو ژول) تعیین گردید (NRC، ١٩٩٣).

## جمع‌آوری و آنالیز نمونه‌ها

**سنجش ویتامین C بافت:** سنجش میزان ویتامین C بافت و جیره بر اساس روش (نلیس و لیهیر، ١٩٩٧) انجام گردید. یک گرم نمونه به یک لوله‌ی پلاستیکی ٢٥ میلی‌لیتر منتقل شده و ١٠٠ میکرولیتر استاندارد داخلی (ایزو آسکوربیک اسید) و سپس ٢ میلی‌لیتر محلول استاندارد (EDTA ١ میلی‌مولار و هموسیستئین ٢ میلی‌مولار) به آن اضافه گردید. پس از هموژن کردن نمونه‌ها، فاز شفاف جدا شده و سانتریفیوژ گردید. سوپرنتنت به‌دست آمده پس از عبور از کارتریژ ١٨ – C کاندیشن شده، فیلتر شد (کارتریژ به‌ترتیب با عبور متانول، آب دیونیزه و استاندارد کاندیشن شد). برای تعیین میزان ویتامین C بافت از دستگاه کروماتوگرافی مایع ( HPLC: Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH / Hegauer Weg 38 / D-14163 Berlin GERMANY) مجهز به ستون

($ODS_3$, $C_{18}$) و آشکارساز نوع UV و در دمای اتاق استفاده گردید. از $KH_2PO_4$ ۵۰ میلی‌مولار، pH ۲/۸ و با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. شناسایی آسکوربیک اسید با توجه به زمان بازداری و محاسبه‌ی مقدار آن با توجه به مقدار استاندارد داخلی اضافه شده به نمونه صورت پذیرفت. جهت محاسبه سطح زیر پیک از نرم‌افزار EZ chrom Elit استفاده شد و نتایج به صورت غلظت میکرو گرم بر گرم بافت گزارش گردید.

**فاکتورهای رشد:** جهت بررسی تغییرات رشد و مقایسه بین تیمارهای مختلف، درصد زنده‌مانی، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، نرخ رشد ویژه (SGR) و درصد افزایش وزن بدن (BWG) با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (هامزا و همکاران، ۲۰۰۸؛ پیدکائوسا و همکاران، ۲۰۰۷).

دوره درصد زنده‌مانی = (تعداد بچه‌ماهیان پایان / تعداد بچه‌ماهیان اول دوره) ×۱۰۰

(FCR) = (غذای خشک داده شده (گرم) / افزایش وزن (گرم)

(SGR) = (ln(وزن نهایی) – ln (وزن اولیه) / (طول دوره‌ی پرورش)*۱۰۰

(BWG) = [(میانگین وزن ثانویه (گرم) – میانگین وزن اولیه (گرم) / وزن اولیه (گرم))*۱۰۰]

**سنجش پروفیل اسید چرب:** سنجش ترکیب اسید چرب بر اساس روش (فولچ و همکاران، ۱۹۵۷) طی دو مرحله استخراج چربی و استری کردن چربی صورت گرفت. به‌منظور استخراج چربی از کلروفرم و متانول (با نسبت ۱:۲) استفاده شد و در ادامه جهت متیله کردن چربی استخراج شده از Bromo 3 Floride (BF3) استفاده شد. سپس به‌منظور بررسی و شناسایی ترکیب اسیدهای چرب نمونه‌ها، از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) فیلیپس مجهز به ستون کاپیلاری از نوع BPX 70 SGE; (60m ×0.25 mm i.d., film thickness 0.25µm) و آشکارساز نوع FID استفاده گردید. دمای آشکارساز و محل تزریق به ترتیب بر روی ۲۶۰ و ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. ۱ میکرولیتر از نمونه استری با استفاده از سرنگ میکرولیتری به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق شد. از مقایسه‌ی زمان بازداری کروماتوگرام‌های نمونه‌ی مجهول با کروماتوگرام‌های به‌دست آمده از محلول استاندارد اسیدهای چرب متیل استر، اسیدهای چرب موجود در نمونه شناسایی شد. ترکیب اسید چرب نمونه‌ها با پیک استاندارد مقایسه گردیده و جهت محاسبه سطح زیر پیک از نرم‌افزار Chromatography Varian Star Software (version 6.41) استفاده شد و نتایج به صورت درصد گزارش گردید.

**آنالیز آماری:** تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS ۱۷ انجام گردید. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smironov مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون همگنی واریانس توسط تست Levene انجام شد و به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده گردید. آزمایش در ۳ تکرار انجام شد و مقایسه‌ی میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

## نتایج

نتایج حاصل از بررسی تجمع بافتی ویتامین C در بافت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطوح مختلف ویتامین C جیره بوده بدین‌صورت که با افزایش سطح ویتامین C جیره، میزان تجمع این ویتامین در بدن افزایش یافته و بالاترین میزان در ارتباط با گروه تغذیه شده با سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین C و حداقل تجمع بافتی در سطح صفر مشاهده گردید (جدول ۲).

**جدول ۲- میزان تجمع بافتی آسکوربیک اسید در بدن بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C**

| جیره ی غذایی (میلی‌گرم ویتامین C به ازای یک کیلوگرم غذا) | میزان ویتامین C بدن (µg/g WW) |
|---|---|
| ۰ | ۱۱/۸±۰/۵ d |
| ۵۰ | ۸۸/۸±۱۳ c |
| ۲۵۰ | ۱۹۸/۲±۹ b |
| ۷۵۰ | ٤۳۱/۲±٤۳ a |
| ۱۵۰۰ | ٤۸٦/۹٦± ٤۱ a |

(Mn ±SD ،n =۲ ،α =۰/۰۵). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

نتایج بدست آمده از شاخص‌های رشد نشان داد فاکتورهای رشد با افزایش میزان ویتامین C بهبود یافت (جدول ۳). نتایج حاصل از SGR بیانگر این امر است که افزایش ویتامین C در جیره غذایی در مقایسه با عدم حضور ویتامین باعث افزایش معنی‌دار این فاکتور می‌شود ($P$<۰/۰۵) و بالاترین میزان این فاکتور در سطح ۷۵۰ میلی‌گرم مشاهده گردید. درصد افزایش وزن بدن با افزایش سطح ویتامین C به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار گرفت ($P$<۰/۰۵). بیشترین اختلاف بین تیمارهای فاقد ویتامین C و

تیمار حاوی ۷۵۰ میلی‌گرم ویتامین مشاهده گردید. مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که افزایش غلظت ویتامین C از تیمار شاهد به تیمار حاوی ۷۵۰ میلی‌گرم ویتامین C باعث افزایش بیش از ۲ برابری این فاکتور گردیده است و در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم کاهش یافت. ضریب تبدیل غذایی در سطوح بالا نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P$<۰/۰۵) کمترین و بیشترین میزان این فاکتور به‌ترتیب در تیمارهای ۷۵۰ میلی‌گرم و شاهد رویت گردید. در رابطه با فاکتور زنده‌مانی نتایج به‌دست آمده نشان دهنده‌ی تاثیر معنی‌دار ویتامین C بوده است به‌طوری‌که زنده‌مانی در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها دارای مقدار کمتری بود ($P$<۰/۰۵) و بالاترین میزان زنده‌مانی با اختلاف ناچیزی از تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در گروه تغذیه شده با سطح ۷۵۰ میلی‌گرم مشاهده شد.

**جدول ۳- شاخص‌های رشد بچه‌ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف ویتامین C جیره**

| پارامترها | جیره‌ی غذایی(میلی‌گرم ویتامین C به ازای یک کیلوگرم غذا) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۵۰ | ۲۵۰ | ۷۵۰ | ۱۵۰۰ |
| وزن اولیه | ۰/۱±۰/۰۲ | ۰/۱±۰/۰۱ | ۰/۱۱±۰/۰۱ | ۰/۰۹۶±۰/۰۲ | ۰/۱±۰/۰۱ |
| افزایش وزن بدن (٪) | ۲۰٤/۸۱±٤۹$^{c}$ | ۳۰۰/٦۷±۲۵$^{bc}$ | ۳۳۷/٦±۷۱$^{abc}$ | ٤٦۰/۹۸±۱۲۱$^{a}$ | ۳٦٦/٦٦±۵۷$^{ab}$ |
| نرخ رشد ویژه (٪) | ۲/۵۵±۰/۵ $^{b}$ | ۳/۳±۰/۱۵ $^{a}$ | ۳/٤۹±۰/۳۹$^{a}$ | ٤/۰٦±۰/۵۱ $^{a}$ | ۳/٦۵±۰/۳ $^{a}$ |
| ضریب تبدیل غذایی | ۱/۷۲±۰/۲٤$^{b}$ | ۱/۲۱±۰/۱۵$^{ab}$ | ۱/۰۷±۰/۰۹ $^{a}$ | ۰/۸۸±۰/۱ $^{a}$ | ۱/۰۵±۰/۱۹$^{a}$ |
| زنده‌مانی (٪) | ۵۳/۳۳±۱۷ $^{b}$ | ۷۱/۵۵±۵ $^{a}$ | ۷٦/۰۷±۹ $^{a}$ | ۸۳/۰۳±٤ $^{a}$ | ۸۲±٦ $^{a}$ |

($\alpha$ =۰/۰۵، n =۳، Mn ±SD). حروف کوچک غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار است.

نتایج پروفیل اسید چرب بچه‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌ی غذایی حاوی سطوح مختلف ویتامین C نشان داد استفاده از سطوح مختلف ویتامین C در جیره غذایی سبب افزایش مقادیر PUFA، HUFA، n-۳ و n-٦ از تیمار شاهد به تیمار ۷۵۰ میلی‌گرم گردید و در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم با کاهش اندکی مواجه گردید و نیز بالاترین مقدار SFA در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم مشاهده گردید. علی‌رغم این افزایش مقادیر، اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد ($P$>۰). (جدول ٤).

**جدول٤ ترکیب اسید چرب بدن بچه ماهی نورس آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره ی حاوی سطوح مختلف ویتامین C**

| ترکیب اسید چرب (٪) | جیره‌ی غذایی (میلی‌گرم ویتامین C به ازای یک کیلوگرم غذا) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ۰ | ۵۰ | ۲۵۰ | ۷۵۰ | ۱۵۰۰ |
| ۱٤:۰۰ | ۰/٦۳±۰/۱۳ | ۰/٦٦±۰/۰۹ | ۰/۸۲ ±۰/۲ | ۰/٦۱±۰/۱٦ | ۰/۸±۰/۰۷ |
| ۱۵:۰۰ | ۰/۱٤±۰/۰۱ | ۰/۱۵±۰/۰۰٤ | ۰/۱۸± ۰/۰۱ | ۰/۱۸± ۰/۰٦ | ۰/۲±۰/۰۲ |
| ۱٦:۰۰ | ۱۳/۹۳±۰/۵ | ۱۵/۲۵±۰/۵ | ۱٤/٦±۰/۹ | ۱٤/۱۸±۰/۸ | ۱٤/٦۵±۰/۹ |
| ۱۸:۰۰ | ۰/۱۷±۰/۰۲ | ۰/۱۷±۰/۰٤ | ۰/۱۵±۰/۰۳ | ۰/۱۵±۰/۰٤ | ۰/۱٦±۰/۰٤ |
| ۲۰:۰۰ | ۱/۲۱±۰/۰٤ | ۱/۲۹±۰/۱۲ | ۱/٤۱±۰/۲ | ۱/٤۲±۰/۳ | ۱/٤٤±۰/۳ |
| ۲۲:۰۰ | ۱/۲۳± ۰/۰۰۱ | ۱/۳۱±۰/۰۲ | ۱/۳۷±۰/۰۸ | ۱/۳٦±۰/۳ | ۱/٤۸±۰/۲ |
| ۲٤:۰۰ | ۰/۱۲±۰/۰۱ | ۰/۲٦±۰/۰۱ | ۰/۳۳±۰/۰۰۳ | ۰/۳۳±۰/۰۳ | ۰/٤۳±۰/۰۱ |
| ***∑ SFA*** | ۱۷/٤٤±۰/٦ | ۱۹/۰۹±۰/۸ | ۱۸/۸٦±۱/۲ | ۱۸/۲۲±۱/٦ | ۱۹/۱٦±۲/۲ |
| ۱۸:۱n۷ | ٤/۵۳±۰/۱ | ٤/٦٦±۰/۳ | ۵/۳۳±۰/۵ | ٤/۵۹±۰/٤ | ۵/۰۸±۰/۵ |
| ۱۸:۱n۹ | ۲۱/۸۲±۰/۷ | ۲۲/۰۵±۰/۹ | ۲۰/۳۵±۰/۹ | ۲۱/۳۸±۰/۸ | ۲۲/۱۸±۱/۱ |
| ۲۲:۱n۹ | ۰/۲۵±۰/۰۱ | ۰/۳±۰/۰۳ | ۰/۳۳±۰/۰۲ | ۰/۳۳±۰/۰۱ | ۰/۳±۰/۰۳ |
| ***∑MUFA*** | ۲٦/٦±۰/۹ | ۲۷/۰۰±۱/۸ | ۲٦/۰۰±۲/۱ | ۲۷/۱۹±۲/٦ | ۲۷/۰٦±۲/٤ |
| ۱۸:۲n٦ | ۱۷/۳۵±۰/۹ | ۱۸/۳±۱/۱ | ۱۸/۵۳±۱/۵ | ۱۷/۳٦±۰/۹ | ۱۷/٦٦±۰/۸ |
| ۱۸:۳n٦ | ۱/۳٤±۰/٤ | ۱/۵±۰/٤ | ۱/۳±۰/۱۲ | ۱/٤۸±۰/۳ | ۱/۲۷±۰/۱ |
| ۱۸:۳n۳ | ۰/۵۱±۰/۰۰٦ | ۱/۱۵±۰/۱ | ۰/٦۵±۰/۰۳ | ۰/۸۷±۰/۰۱ | ۰/۳۳±۰/۰۲ |
| ۲۰:۳n٦ | ۱/۹۱±۰/۰۱ | ۱/۷±۰/۰۹ | ۱/۱٦±۰/۲ | ۱/٦۳±۰/۲ | ۱/۹۱±۰/٤ |
| ۲۰:۳n۳ | ۱/۱۲۵±۰/۰٤ | ۰/٦۵±۰/۰۳ | ۱/۳۲±۰/۱ | ۰/۸۳±۰/۵ | ۱/۳۵±۰/۲ |
| ۲۰:٤n٦ | ۰/۸٦±۰/ ۲ ab | ۱/۱۹±۰/۳ a | ۰/۳۵±۰/۱ b | ۰/۸۷±۰/۵ ab | ۰/۲۱±۰/۱ b |
| ۲۰:۵n۳ | ۲/۲۹±۰/۳ | ۱/٦۵±۰/۳ | ۱/۵۹±۰/۱ | ۲/۳±۰/۱ | ۱/۷۵±۰/۲ |
| ۲۲:٦n۳ | ۱٤/۷۲±۱/۲ | ۱٤/۹۹±۰/۱۵ | ۱٦/٤۷±۰/۹ | ۱٦/۵۵±۱/۱ | ۱۵/٤٤±۰/۹ |
| ***∑PUFA*** | ٤۱/۱±۰/۲ | ٤۰/۸٦±۲/٦ | ٤۱/٤۳±۲ | ٤۱/۸۹±۳ | ۳۹/۹۲±۱ |
| ***∑HUFA**** | ۲۰/۹±۲ | ۲۰/۹۲±۰/۱۸ | ۲۰/۹۵±۱/۹ | ۲۲/۱۷±۲/٦ | ۲۰/٦۵±۲/۳ |
| n ۳ | ۱۹/٦٤±۲/۳ | ۱۸/٤۲±۰/٦ | ۲۰/۰۲±۲/۳ | ۲۰/۵٤±۲/٤ | ۱۸/۸۷±۱/٦ |
| n ٦ | ۲۰/٤٦±۲ | ۲۲/٤۳±۳/۲ | ۲۱/٤۱±۲ | ۲۱/۳٤±۲/۳ | ۲۱/۰۵±۱/۷ |
| n۳/n ٦ | ۰/۹۵±۰/۲ | ۰/۸٤±۰/۱ | ۰/۹۵±۰/۱۷ | ۰/۹۷±۰/۱۷ | ۰/۹۰±۰/۱۳ |

• (HUFA ≤ ۲۰ کربن و ≤ ۳ باند دوگانه؛ Stark، ۲۰۰۸)

*SFA* اسیدهای چرب اشباع، *MUFA* اسیدهای چرب یک غیر اشباع، *PUFA* اسیدهای چرب چند غیر اشباع، *HUFA* اسیدهای چرب به‌شدت غیر اشباع. در هر ردیف حروف کوچک غیرمشترک بیانگر تفاوت معنی‌دار و عدم وجود حروف کوچک در هر ردیف بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار است (Mn ±SD ،n =۳ ،α =۰/۰۵).

## بحث

نتایج نشان داد با افزایش سطح ویتامین C جیره، تجمع ویتامین C در بافت افزایش یافت. در گروه شاهد نیز مقداری هرچند ناچیز ویتامین در بافت مشاهده گردید. با توجه به اینکه ماهی آزاد دریای خزر قادر به سنتز ویتامین C نمی‌باشد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این مقدار ویتامین از مولدین به ماهی منتقل شده و طی مدت پرورش به‌طور کامل تخلیه نگردیده است و ممکن است عدم بروز علائم کمبود ویتامین در اوایل دوره‌ی پرورش به‌دلیل حضور مقادیر بالاتر ویتامین در بدن بچه‌ماهی بوده باشد که به مرور زمان کاهش یافته است.

مطالعات متعددی در زمینه اثر ویتامین C جیره، بر رشد و زنده‌مانی انواع آبزیان صورت گرفته‌است که نتایج برخی از آن‌ها از اثر مثبت این ویتامین بر شاخص‌های رشد حکایت دارد و برخی بی‌اثر بودن آن‌را به اثبات رسانده است. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان دهنده‌ی اثر معنی‌دار ویتامین C بر شاخص‌های رشد بچه‌ماهی آزاد دریای خزر است. درصد افزایش وزن بدن، SGR و همچنین زنده‌مانی از گروه شاهد به گروه تغذیه شده با سطح ۷۵۰ میلی‌گرم افزایش یافت سپس در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم کاهش یافت در این رابطه می‌توان به این موضوع اشاره داشت که سلامتی ماهی تغذیه شده با مقادیر بیش از حد یا ناکافی مواد مغذی خاص کاهش خواهد یافت (عابدیان و همکاران، ۱۳۹۱). محققین مختلف عملکرد مناسب ویتامین C را در رشد و زنده‌مانی ماهیان مختلف گزارش کردند: اویسی‌پور و همکاران، (۱۳۸۵)، تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)؛ ژیائو و همکاران، (۲۰۱۰)، ماهی کوبیا (*Rachycentron canadum*)؛ ائو و لی، (۲۰۰۸)، بادکنک ماهی ببری (*Takifugu rubripes*)؛ کوماری و ساهو، (۲۰۰۵)، گربه ماهی آسیایی جوان *Clarias batrachus*؛ آیی و همکاران، (۲۰۰٤)؛ ماهی باس ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*)؛ کولکوسکی و همکاران، (۲۰۰۰)، اردک ماهی آب شیرین *Stizostedion vitreum*؛ ناواره و هالور (۱۹۸۹) و بچه‌ماهی انگشت قد قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus Mykiss*. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که ویتامین C درصد زنده‌مانی را افزایش داده و در برخی گونه‌ها سبب بهبود رشد می‌گردد. ساندس، ۱۹۹۱ اظهار داشت حضور این ویتامین در جیره‌ی غذایی جهت حفظ سلامت و عملکرد فیزیولوژیک و بهبود رشد ماهی ضروری است (به نقل از فلاحتکار، ۱۳۸٤). براین اساس این احتمال وجود دارد که افزایش غلظت ویتامین C، ROS تولید شده در فرآیند هضم را که ممکن است از جذب مواد غذایی جلوگیری کند مهار می‌کند بنابراین رشد را بهبود می‌بخشد (برون و لاونس، ۲۰۰۱). عامل تنظیم کننده‌ی نیاز ویتامین C، نرخ متابولیک است و

این عامل در سنین پایین‌تر بیشتر است (دابروسکی، ۲۰۰۱) بنابراین به‌نظر می‌رسد نیاز به این ویتامین در مراحل اولیه بیشتر باشد (کولکوسکی و همکاران، ۲۰۰۰) و همچنین دلیل تفاوت در بین گونه‌های مختلف می‌تواند ترکیب غذا، شرایط پرورش و وضعیت تغذیه ای متفاوت باشد. بنابراین نیاز بالای بچه‌ماهی آزاد خزر می‌تواند بدین وسیله قابل توجیه باشد.

مقادیر PUFA، HUFA، n-۳ و n-٦ در رابطه با افزایش سطح ویتامین C تا سطح ۷۵۰ میلی‌گرم افزایش یافته‌است و بیانگر این امر است که رادیکال‌های آزاد در سطوح بالاتر ویتامین C نسبت به گروه شاهد به میزان کمتری وجود دارند. پراکسیداسیون، تخریب اسیدهای چرب چند غیر اشباع از طریق اکسیداتیو است که توسط واکنش‌های زنجیره‌ای صورت می‌گیرد و به موجب آن رادیکال‌های یگانه سبب تولید واکنش‌های بیوشیمیایی مضر می‌شوند (مورنته و همکاران، ۲۰۰۷).

نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام شده توسط اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۵)، وفرز و سیس (۱۹۸۷)، رتسکی و فری (۱۹۹۵)، حمره و همکاران (۱۹۹۷)، شانگ و همکاران (۲۰۰۲)، پوآنگ کاو و همکاران (۲۰۰۵)، لیم و همکاران (۲۰۱۰)، گائو و همکاران (۲۰۱۳)، گائو و همکاران (۲۰۱٤) هم‌خوانی دارد. این محققین نیز بیان داشتند که اسیدهای چرب غیراشباع به‌ویژه PUFA در حضور آنتی‌اکسیدان‌های ویتامینی E و C حفاظت می‌گردد و این آنتی‌اکسیدان‌ها با حمله به رادیکال‌های آزاد و پایدار کردن آن‌ها به‌طور مستقیم مانع از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند و همچنین این آنتی‌اکسیدان‌ها با احیای رادیکال اسید چرب که در اثر حمله رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب ایجاد شده است به واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون خاتمه داده و از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کنند (مورنته و همکاران، ۲۰۰۷). و نیز از آنجاییکه ویتامین C سبب احیای مجدد ویتامین E از فرم اکسید شده‌ی خود می‌شود بنابراین به‌طور غیر مستقیم در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها نقش دارد (دابروسکی، ۲۰۰۱) به طوری‌که لیم و همکاران، ۲۰۱۰ با مطالعه اثر ویتامین C بر فاکتورهای رشد و ایمنی ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticus* مشاهده کردند که افزایش سطح ویتامین C جیره سبب افزایش غلظت ویتامین E در کبد گردید. همچنین اثر محافظتی همزمان فاز آب و فاز چربی در مقابل اکسیداسیون و اثر احیاکنندگی ویتامین C بر ویتامین E توسط حمره و همکاران، ۱۹۹۷ مطالعه شده است.

در پایان، با توجه به حساسیت بالای اسید چرب نسبت به فرآیند اکسیداسیون و همچنین نقش مهمی که این اسیدهای چرب در ساختار و عملکرد سلول‌ها و رشد بدن، پیشنهاد می‌گردد اثر متقابل ویتامین C با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر ویتامین E و مواد معدنی نظیر سلنیوم مورد مطالعه قرار گیرد.

**سپاسگزاری**

نویسندگان از مدیریت کارخانه‌ی تولید خوراک ارس‌بازار آمل و کارکنان آزمایشگاه دانشکده‌ی علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل همکاری صمیمانه ایشان تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورند.

**منابع**

1.Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B., and Liufu, Z. 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass. J. Aquaculture, 242: 489-500.

2.Ata, B., Retsky, K. L., & Frei, B. 1995. Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. J. Biochimica et biophysica acta, 1257: 279-287.

3.Arrigoni, O., and De Tullio, M. C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidat. Review. J. Biochimica et biophysica acta, 1569: 1-9.

4.Bandyopadhyay, U., Das, D., and Banerjee, R. K. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. J. Currect Science, 77(5): 658-666.

5.Brown, M., Lavens, P. 2001. Critical review of the concentration, interactions with other nutrients, and transfer of ascorbic acid in algae, crustaceans and fish. In: Dabrowski, K. (Ed.), Ascorbic Acid in Aquatic Organisms, Status and Perspectives. CRC Press, Boca Raton, Pp: 167-189.

6.Dabrowski, K. 2001. Ascorbic Acid in Aquatic Organisms-Status and Perspectives. CRC Press, Boca Raton, Pp: 255-277.

7.Eo, J., and Lee, K.-jun. 2008. Fish and Shellfish Immunology Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. J. Fish and Shellfish Immunology, 25: 611-616.

8.Falahatkar, B. 2005. Effect of vitamin C on hematological, biochemical and growth parameters in gient sturgeon (*Huso huso*), PhD thesis, Marine Sciences Faculty of Tarbiat Modares University. 84 pp.

9.Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.J. Biol. Chem, 226: 497-509.

10.Gao, J., Koshio, Sh., Ishikawa, M., Yokoyama, S., and Mamauag, R. 2014. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceusfed* dietary oxidized fish oil. J. Aquaculture. Pp: 84-90.

11.Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. J. Nutr Rev.70:257-65.

12.Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R.K., and Lie, Ø. 1997. Vitamin C and E interact juvenile Atlantic salmon (*Salmon salar*). J. Original Contribution, 22:

137-149.
13.Hamza, N., Mhetli, M., Ben Khemis, I., Cahu, C and Kestemont P. 2008. Effect of dietary phospholipd levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. J. Aquaculture, 275: 274-282.
14.Herrera E, Barbas C. 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. J. Physiol Biochem. 57: 43-56.
15.Kolkovski, S., Czesny, S., Yackey, C., Moreau, R., Cihla, F., Mahan, D., and Dabrowski, K. 2000. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched Artemia nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. J. Aquaculture Nutrition, 6:199-206.
16.Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Welker, T., Klesius, P.H., and Li, M.H. 2010. Growth performance, immune response, and resistance to Streptococcus iniaeof Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing various levels of vitamins C and E. J. World Aquacult, 41: 35-48.
17.Martinez- Alvarez, R.M., Morales, A.E., and Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. J. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 15: 75-88.
18.Mourente, G., and Ciencias, F.D. 2000. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid /vitamin E (PUFA/ tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. J. Fish Physiology and Biochemistry, 23: 337-351.
19.Mourente, G., Bell, J.G., and Tocher, D.R. 2007. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? J. Fish Physiology and Biochemistry, 33: 269-280.
20.Navarre, O., and Halver, J.E. 1989. Disease Resistance and Humoral Antibody Production in Rainbow Trout Fed High Levels of Vitamin C. J. Aquaculture, 79: 207-221.
21.Nelis, H.J., and De Leenheer, A.P. 1997. Liquid chromatographic determination of vitamin C in aquatic organism. J. Choromatographic Science, 35: 337-341.
22.Ndhlala, A.R., Moyo, M., and Van Staden, J. 2010. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? J. Molecules, 15: 6905-30.
23.Ovissipour, M.R. 2006. Daphnia enrichment by fish oil and vitamin C and its performance on growth, survival and body composition of Persian sturgeon (*Acipencer persicus*), M.Sc thesis, Marine Sciences faculty of Tarbiat Modares University. 38p.
24.Piedecausa, M.A., Mazon, M.J., Garcia, B.G. and Hernandez, M.D. 2007. Effect of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diaplodus puntazzo*). J. Aquaculture, 263: 211-219.
25.Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S., and Watanabe, T. 2005. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. J. Comparative

Biochemistry and Physiology, 140: 187-196.
26. Raha, S., Robinson BH. Mitochondria. 2000. Oxygen free radicals, disease and ageing.Trends J. Biochem Sci., 25: 502-8.
27. Retsky, K.L. and Frei, B. 1995. Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. J. Biochimica et Biophysics Acta, 1257: 279-287.
28. Schlueter, A.K., and Johnston, C. 2011. Vitamin C: Overview and Update. J. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 16: 49.
29. Shang, F., Gong, X., Egtesadi, S., Meydani, M., Smith, D., and Perrone, G. 2002. Vitamin C prevents hyperbaric oxygen-induced growth retardation and lipid peroxidation and attenuates the oxidation-induced up-regulation of glutathione in *guinea pigs*. J. Blood, 13: 307-313.
30. Smirnoff, N., and Glen, WL. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Crit Rev. J. Biochem. Mol. Biol., 35: 291-314.
31. Stark, K.D. 2008. The Percentage of n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids in Total HUFA as a Biomarker for Omega-3 Fatty Acid Status in Tissues. J. Lipids, 43: 45-53.
32. Taniyana, Y. and Driendling, K.K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. J. Hypertension, 42: 1075-81.
33. Tewary, A., and Patra, B.C. 2008. Use of vitamin C as an immunostimulant. Effect on growth, nutritional quality, and immune response of *Labeo rohita*. J. Fish physiology and biochemistry, 34: 251-9.
34. Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish, Rev. J. Fish Sci. 11: 107-184.
35. Torres, P., Kunamneni, A., Ballesteros, A., and Plou, F.J. 2008. Enzymatic Modification for Ascorbic Acid and Alpha-Tocopherol to Enhance their Stability in Food and Nutritional Applications. J. Open food Science, 2: 1-9.
36. Wefers, H., and Sies, H. 1988. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin. J. Time, 357:353-357.
37. Xiao, L.D., Mai, K.S., Ai, Q.H., Xu, W., Wang, X.J., Zhang, W.B. and Liufu, Z.G. 2010. Dietary ascorbic acid requirement of cobia, *Rachycentron canadu*. J. Aquaculture Nutrition, 16: 582-589.