

國立臺灣大學漁業科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Fisheries Science

College of Live Science

National Taiwan University

Master Thesis

飼料中添加不同類胡蘿蔔素對紅頭金鯛之呈色影響

Effects of Dietary Carotenoid Supplements on
Pigmentation of Giant Cichlid, *Petenia splendida*



指導教授：廖文亮 博士

Advisor: Wen-Liang Liao, Ph.D.

中華民國 101 年 1 月

January, 2012

誌謝

感謝 廖文亮老師的指導，來實驗室這段時間我學到很多，非常充實。最開始我真的什麼都不懂，從實驗的操作進行、數據的整理，最後到論文的完成，老師總是在一旁關心與耐心指導。

感謝口試委員 陳弘成老師、劉富光主任、丁雲源所長在過年期間詳加審閱，撥冗指正，使這本論文能更完備。

感謝家人們能夠支持我，讓我可以繼續研究所的學業。

感謝紅頭金鯛奉獻出生命，才能完成我的研究。

感謝實驗室的同學，協助我進行實驗。

感謝關心我的長輩和朋友們增強我的信心。

這一切我全都點滴在心，雖然誌謝寫的簡單但字字發自內心，真的十分感謝大家，此時的我才能完成研究所的學業。



摘要

本研究主要探討在飼料中添加不同種類及濃度的類胡蘿蔔素(Carotenoid)，對於紅頭金鯛的呈色之影響，評估色素代謝能力，並找出提升魚隻體色之最適添加量。前8週為呈色實驗，共採用二種不同的類胡蘿蔔素:玉米黃素(Zeaxanthin, 以下簡稱Z), 蝦紅素(Astaxanthin, 以下簡稱A), 而添加在飼料中的濃度與種類分別為0(control)、Z25、Z50、A25、A50、A75及A100(mg/kg diet)共計七組。第8-12週為褪色實驗。各組皆投餵不添加類胡蘿蔔素飼料，實驗後測定成長、色差計測量體色及分析魚體體表類胡蘿蔔素含量與組成色素。

本實驗結果指出在紅頭金鯛的飼料中添加類胡蘿蔔素對成長及飼料效率沒有影響。飼養8週後的呈色實驗結果顯示，飼料中添加類胡蘿蔔素的組別，平均色彩差異值(ΔE)可達8.4-10.1。魚體體表組織分析類胡蘿蔔素含量的結果以對照組最低，平均為1.3mg/100g。添加類胡蘿蔔素組別的魚皮總類胡蘿蔔素量為4.9-12.3mg/100g隨著飼料中類胡蘿蔔素的增加而上升。第8-12週的褪色實驗結果顯示，飼料中添加類胡蘿蔔素的組別平均色彩差異值 ΔE 值為8.5-11.2，魚體體表組織測定類胡蘿蔔素含量的結果以對照組最低，平均為0.8mg/100g，添加類胡蘿蔔素組別的魚皮總類胡蘿蔔素量為2.8-8.4mg/100g。雖然由色差值的結果實驗組仍能維持與對照組的有差異，但由類胡蘿蔔素的含量之下降，顯示確實有褪色的現象平均下降率約為25-32%。玉米黃素與蝦紅素的添加影響紅頭金鯛體色的呈色能力相近，且紅頭金鯛不能將玉米黃素有效轉換成蝦紅素，為使魚隻呈現黃色或紅色，建議使用玉米黃素或蝦紅素的添加量32.4-35.5mg/kg。

關鍵字: 飼料、紅頭金鯛、類胡蘿蔔素、玉米黃素、蝦紅素

Abstract

This study focused on the different kinds and concentrations of carotenoid in diet, for effects of pigmentation of giant cichlid (*Pentenia splendida*), assessment of pigment metabolism, and raise fish pigmentation in the suitable amount. Experimental feeds are supplemented with two kinds of different carotenoid: zeaxanthin (hereinafter referred to as Z), astaxanthin (hereinafter referred to as A). The experiment period was total 12 weeks. In the pigmentation experiments for the first 8 weeks, were divided into seven groups: control, Z25, Z50, A25, A50, A75 and A100 (mg/kg diet). In the depigmentation experiments for the last 4 weeks, all the groups were fed not add carotenoids diet. Fish skin were tested with tristimulus colorimeter, and further quantified for integument pigment.

The experimental results indicate that the carotenoids have no effects on growth and feed efficiency, but improve pigmentation in the giant cichlid. In the pigmentation experiments, the average color difference value (ΔE) varied from 8.4-10.1, while the content of carotenoids in integument varied from 4.9-12.3mg/100 g. In the depigmentation experiments, the average color difference value (ΔE) varied from 8.5-11.2, while the content of carotenoids in integument varied from 2.8 -8.4mg/100 g. Although the results of the experimental group by the color difference is able to maintain with control group differences, but by the decreased content of carotenoids shows that indeed fading phenomenon fell by an average rate of about 25-32%. The ability is similar in zeaxanthin and astaxanthin to affect the pigmentation in this species. The results indicate that 32.4-35.5mg/kg is a recommended dietary level of zeaxanthin or astaxanthin to ensure good pigmentation in the giant cichlid.

Key word : diet 、 giant cichlid 、 carotenoid 、 zeaxanthin 、 astaxanthin

目錄

誌謝.....	I
中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
第一章 前言.....	1
一、 魚種介紹.....	1
二、 魚的體色.....	1
三、 體色的測定方法.....	2
四、 類胡蘿蔔素.....	3
五、 類胡蘿蔔素的蓄積方式.....	3
六、 水生動物主要代謝途徑模式.....	4
七、 類胡蘿蔔素之生理功能.....	4
九、 研究動機與目的.....	8
第二章 材料與方法.....	9
一、 實驗魚種及試驗條件.....	9
二、 實驗飼料配製.....	9
三、 飼料成分分析.....	10
四、 體表呈色測定.....	11
五、 類胡蘿蔔素分析.....	11
六、 參數分析.....	12

七、	統計分析.....	13
第三章	結果.....	14
一、	飼料分析.....	14
二、	成長效果.....	14
三、	體表顏色測定.....	14
四、	魚體組織之類胡蘿蔔素總量.....	18
五、	類胡蘿蔔素組成.....	19
六、	蝦紅素之最適添加量.....	19
第四章	討論.....	20
一、	成長效果.....	20
二、	呈色.....	20
三、	色素蓄積效果.....	22
四、	類胡蘿蔔素轉換成蝦紅素之代謝模式.....	24
五、	最適添加量.....	24
第五章	結論.....	26
參考文獻	27
表與圖	36

第一章 前言

一、 魚種介紹

紅頭金鯛(*Petenia splendida*) 英文俗名 Giant Cichlid、Bay Snook，亦有業者稱黃金鯛，在分類上屬脊索動物門(Chordata)、輻鰭魚綱(Actinopterygii)、鱸形目(Perciformes)、慈鯛科(Cichlidae)。紅頭金鯛原產於中南美洲，分布於墨西哥、瓜地馬拉及貝里斯，主要棲息於湖泊或溪谷中的底棲性淡水魚類。幼時魚苗體表呈現黑色，隨著成長黑色逐漸褪去，會漸漸轉變成以紅、黃色為主的體色。最大體長可達 40cm，其口器特殊，可以快速地伸出捕食獵物，屬大型的肉食性魚類，主要以其它小型魚為食，僅有少數種類為草食性 (Martinezpalacios and Ross, 1988)。

紅頭金鯛優點為體型大、成長快速、肉質鮮美、色彩豔麗，因此在食用魚與觀賞魚市場皆具有高經濟價值。中南美原產地主要仰賴野外捕獲，因當地地方政府疏於管控造成漁民過度捕撈使得資源量急遽下降。為此，近年來許多研究開始著手於此種魚的集約養殖，包括在卵巢發育上的研究(Pérez-Vega et al., 2006)、評估魚苗於集約養殖中成長與存活的飼養密度(Jimenez-Martinez et al., 2009)、魚苗消化系統發育(Treviño et al., 2011)與初期消化酵素之活性(Uscanga-Martinez et al., 2011)。除此之外，瓜地馬拉漁業局與台灣漁業技術團合作下，成功研發出人工繁殖技術。近年花蓮水產培育所從南美引進紅頭金鯛繁殖。目前主要供應觀賞魚市場，屬高單價觀賞魚，部分在台灣南部民間養殖以黃金鯛名稱外銷為食用魚。

此魚種具少有殘食的優點，飼養管理容易，適合高密度飼養。由於對此新興養殖魚種之營養需求尚未十分清楚。在原產地進行之養殖，多以鱒魚飼料進行飼養(Treviño et al., 2011)，而台灣南部養殖戶則以鱸魚飼料飼養，這兩種魚飼料均無添加類胡蘿蔔素，使得人工養殖魚隻的體色偏淡，不如野生環境成長的色彩豔麗。

二、 魚的體色

魚的體色因應不同的生長階段與環境改變受到多重因子影響，包含色素細胞(chromatophore)的型態與數量及環境的變化。位於真皮層中的色素細胞是構成體色的基本單元，一般包含三種細胞，第一種為黃色素細胞(xanthophores)，包含蝶啶(pteridine)、類胡蘿蔔素(carotenoid)色素，第二種為黑色素細胞(melanophores)，包含了黑色素(melanin)，第三種為彩虹色素細胞(iridophore)，由結構變化影響體色。其中類胡蘿蔔素與黑色素，是魚類中比較常研究的二種色素，而魚體呈現的各種紅色、橙色、黃色則會隨著與黃色素結合類胡蘿蔔素種類與數量所影響(Price et al., 2008)。除此之外，魚體可經由感知環境後，由神經及內分泌系統操控色素細胞內色素的聚散達到快速而短期的體色變化。另外，透過色素細胞的種類更替消長與色素細胞內的色素蓄積與代謝之變化，則較為緩慢而長期(Fujii, 2000)。

體色對魚類具有多樣的生物功能，其中在行為上比較廣泛被認識的交配選擇(sexual selection)，是藉由個體較醒目的體色爭取更多與異性交配機會的種內競爭(Berglund et al., 1996)。其它行為上功能的還包括物種的辨識(species recognition)、警戒色彩(warning colouration)、侵略展示(aggressive displays)以及偽裝作用(camouflage) (Svensson and Wong, 2011)。

三、 體色的測定方法

依據國際照明委員會 (Munsell Color Science Lab) 模擬人眼感官所能感受的色彩空間 CIE L*a*b*系統將顏色定義出顏色參數 (a*, b*和 L*值)，a*值越高代表紅色程度越高，而 a*值越低代表綠色程度越高。b*值越高代表黃色程度越高，而 b*值越低代表藍色程度越高。L*值代表亮度，其值越高代表亮度越高。其應用方法為，利用色差計 (Color difference meter) 直接偵測魚體，並可利用色差公式進一步計算顏色差異值 (ΔE) 比較色差。當 $\Delta E > 6$ 則表示已達人眼感官可明顯分辨的標準。依此系統，前人的研究發現天然的嘉鱘魚(*Pagrus major*)與養殖的魚在眼上方頭部位置其 ΔE 值為 11.1，同時測定其他 7 個不同位置有 5 個位置 ΔE 大於 6.0。天然的香魚(*Plecoglossus altivelis*)與養殖的魚在側線前方位其 ΔE 值為 6.3。此兩種魚皆可由人眼明顯感受到天然魚與養殖魚在體色有顯著性差異(Aoki et al., 1991)。亦有許多研究應用此套系統做為評斷呈色的依據如大西洋

鮭魚(*Salmo salar L.*)(Buttle et al., 2001)、虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)(Storebakkena et al., 2004)、嘉鱾 (*Pagrus auratus*)(Booth et al., 2004)、赤鯛(*Pagrus pagrus*)(Doolan et al., 2008; Kalinowski et al., 2005)、海膽(*Psammechinus miliaris*)(Suckling et al., 2011)等。

四、 類胡蘿蔔素

目前在自然界中已經被發現 750 種以上的類胡蘿蔔素。類胡蘿蔔素為廣泛存在自然界中可由植物、藻類或微生物合成，雖然發現一些動物身上也存在類胡蘿蔔素，但由於動物無法自身合成，僅能由食物中攝取或是經代謝轉換攝取到的類胡蘿蔔素(Goodwin, 1986)。依結構大致可分成二大類，一為結構中不含氧，僅由碳和氫元素所構成的胡蘿蔔素，例如： β -胡蘿蔔素(β -carotene)、蕃茄紅素(lycopene)。另一類則為結構中含氧元素的葉黃素(xanthophylls)，例如：玉米黃素(zeaxanthin)、蝦紅素(astaxanthin)。由於類胡蘿蔔素含有的多個共軛雙鍵結構，容易吸收波長 400-500 nm 的光，呈現出各種黃色、橙色或紅色，也因為其結構穩定性不高，容易受到氧、光、熱和酸的影響產生異構化的現象。

五、 類胡蘿蔔素的蓄積方式

類胡蘿蔔素在生物體中與脂質、蛋白質結合或單獨的以游離的型式存在。在皮膚上的類胡蘿蔔素經常與脂肪酸結合而以酯化的型式存在。其中蝦紅素為水生生物中最常見的類胡蘿蔔素，在魚類經常以此種方式在魚肉或魚皮蓄積蝦紅素，如鮭鱒科魚類(salmonid)與嘉鱾。此外類胡蘿蔔素也可能與蛋白質結合，形成類胡蘿蔔素蛋白(carotenoproteins)。甲殼類生物體內的蝦紅素常與外骨骼中的蛋白質結合形成類胡蘿蔔素蛋白，因色素分子結構與蛋白質結合後使得色素穩定性增加，又因結合的蛋白質不同，造成甲殼類呈現出如紫色、藍色甚至綠色等不同的顏色(Zagalsky et al., 1970)，所以當經過加熱處理、使與類胡蘿蔔素結合蛋白變性後，甲殼類會顯現出原始蝦紅素的紅色(Cianci et al., 2002)。除此之外，出現在卵

中的類胡蘿蔔素一般則以游離態的方式聚集後與脂質結合增加穩定性 (Parker, 1996)。

六、 水生動物主要代謝途徑模式

水生動物外表的呈色除了和攝入的色素種類有關之外，也可能經由自身的酵素系統轉換，代謝成其它種類的色素，也因為各個物種轉換吸蓄積色素的能力不盡相同，因此呈色結果也有所差異。蝦紅素為多數水生動物蓄積的色素，將其它類胡蘿蔔素轉換成蝦紅素之代謝模式分為以下三種型式(Simpson and Kamata, 1979):

1. 紅鯉型(Red carp type)

可以利用葉黃素(Lutein)、玉米黃素或中間的代謝物轉換成蝦紅素，大部分的淡水魚屬於此類型。例如:錦鯉(*Cyprinus carpio*)、金魚(*Carassius auratus*)

2. 鯛魚型(Sea bream type)

不能由其它的類胡蘿蔔素轉換成蝦紅素，但可以直接將蝦紅素吸收蓄積在體內，大部分的海水魚及鮭鱒魚類屬於此類型。

例如:嘉鱻、鮭魚(*Salmo gairdneri*)、鱒魚(*Onchorhynchus kisutch*)

3. 蝦型(Prawn type)

可以利用 β -胡蘿蔔素、玉米黃素或中間的代謝物轉換成蝦紅素，大部分的甲殼類屬於此類型。

七、 類胡蘿蔔素之生理功能

體色除了生態行為上的意義之外，也具有許多生理功能，在影響體色的類胡蘿蔔素中也有愈來愈多的作用被發現。例如在鬥魚(*Betta splendens*)的藍、紅二個品系的研究中，類胡蘿蔔素在紅色雄魚可以增強紅色程度來吸引雌魚以增加繁殖的機會，而在藍色雄魚類胡蘿蔔素的含量則與呈現較高的免疫能力具有相關性(Cloutfelter et al., 2007)。在孔雀魚(*Poecilia reticulata*)的研究也指出，雄魚攝食較多的類胡蘿蔔素，會提升身上橘點的鮮豔度，並可增加吸引雌魚的配種機會

(Kodricbrown, 1989)。此雄魚也具有較好的免疫能力來抵抗外部的寄生蟲(Kolluru et al., 2006)，剛治癒完寄生蟲疾病的孔雀魚，身上橘點的鮮豔度會下降，削弱了吸引雌魚的配種機會(Houde and Torio, 1992)。綜合以上研究，可以了解魚的體色不僅在生態與生理上皆具有一定的重要性，在不同魚種利用類胡蘿蔔素的策略的考量上亦有所差異。

類胡蘿蔔素主要影響內分泌系統，如生殖腺發育及生殖力、卵的孵化率及幼苗(larva)之存活率及生長(Miki et al., 1982)。魚的卵巢及卵由於存在不同含量及組成的類胡蘿蔔素或類胡蘿蔔素蛋白，因而提供了卵黃的色澤。魚的卵巢及卵細胞及其他細胞類胡蘿蔔素的變異相當大，它的存在決定於所吃的食物色素種類，以及其個體發生成長之階段，可以同化或修飾食物中的類胡蘿蔔素，而將這些類胡蘿蔔素累積在卵巢 (Blount et al., 2000; Craik, 1985)。在鮭鱒魚類達性成熟時被發現在其肌肉組織中之類胡蘿蔔素會經由成熟之卵巢轉移至卵細胞及皮層，因此被認為蝦紅素會和蛋白質結合而參與胚胎發育(Storebakken et al., 1992)。在早期的研究中曾觀察到魚卵中的蝦紅素會漸漸轉移至胚胎之皮膚或肝臟之肌纖維組織中，做為新孵化魚苗之保護色。類胡蘿蔔素在魚類的胚胎發育上也扮演著各種不同的生物及代謝上的角色。這些功能中最主要的就是具有原維他命 A (provitamin A) 的活性。鮭魚類具有高含量蝦紅素之個體，會呈現對細菌及黴菌類疾病有很強的抵抗力，推論是因為蝦紅素會轉變為 β -胡蘿蔔素再轉變為維他命 A，使細胞膜韌性增強而產生抗病力(Bauernfeind et al, 1981)。類胡蘿蔔素亦具有抗氧化劑的功用，可防止有害的脂肪過氧化作用(Liebler, 1993)。亦可避免保護敏感組織受到氧的傷害(Tacon, 1981)。有研究指出在敏感的胚胎發育時期，需要類胡蘿蔔素的抗氧化功能避免細胞遭受自由基的損害(Blount et al., 2000; Surai and Speake, 1998)。卵中的多元不飽和脂肪容易氧化及快速的被氧化劑所破壞，但在胚胎發育時期的快速代謝卻會不斷的產生氧化劑，由於類胡蘿蔔素具有能夠降低氧化壓力的功能，因此在胚胎發育顯得相當重要(Miki, 1991)。

八、 類胡蘿蔔素在水產養殖中的研究

在人工養殖環境下，往往因為缺乏適當或足夠的類胡蘿蔔素來源，造成水產動物的呈色不如野生的色彩鮮豔。因此在飼料中添加類胡蘿蔔素來增色以提升水生動物的色澤與價值，尤其是鮭鱒魚類的肉色及觀賞魚的呈色，魚體的呈色常常是直接影響市場價值的一項重要指標也影響消費者選購的意願。

鮭鱒魚類在自然界中主要靠著攝食含有蝦紅素的甲殼類，並從中吸收堆積蝦紅素，使其肉色達到自然的色澤(Schiedt et al., 1986; Skrede & Storebakken, 1986; Scalia et al., 1989)。水產養殖添加的色素來源，主要生產自藻類、微生物、甲殼類、植物與人工合成之色素。常應用的藻類有螺旋藻(*Spirulina*) (Liao et al., 1993)、雨生紅球藻(*Haematococcus pluvialis*) (Pan and Chien, 2009; Tejera et al., 2007)、杜莎藻(*Dunaleilla*) (Amar et al., 2004)。在微生物方面常使用紅酵母(*Phaffia rhodozyma*) (Amar et al., 2004; Liao et al., 1993; Storebakken et al., 2004)，酵母菌 *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Johnson et al. 1977) 生產類胡蘿蔔素。最近有研究紅色吳郭魚增色使用基因轉殖之大腸桿菌生產的類胡蘿蔔素(黃, 2009)。也有使用甲殼類的副產品，如磷蝦油(Liao et al., 1993)、南極蝦粉(krill meal) (Mori et al., 1989; 曾, 2004)、蝦殼粉(Satio & Regier, 1971; Kalinowski et al., 2007; Kalinowski et al., 2005)、蟹殼粉(Garcia et al., 2010)；蟹蝦萃取油(Peterson et al., 1966)；紅蟹的殼和萃取油(Spinelli et al., 1974; Spinelli and Mahnken, 1978)，植物方面的來源，使用金盞花(Marigold flower)、辣椒萃取之辣椒紅素(Paprika) (Peterson et al., 1966)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*) (Yanar et al., 2008)。亦有直接使用人工合成的色素(Booth et al., 2004; Chatzifotis et al., 2005; Doolan et al., 2008)。挪威的大西洋鮭魚養殖過程中則常使用合成蝦紅素與斑螫黃素(Canthaxanthin) (Bjerkeng et al., 1992; Bell et al., 1998; Akhtar et al., 1999; Buttle et al., 2001)。在飼料中添加不同種類的類胡蘿蔔素外，更有許多研究報告探討不同形式之類胡蘿蔔素被蓄積利用的情形，其中最常被研究的就是游離形式和酯化形式的蝦紅素。人工合成的蝦紅素是以游離形式為主，而常見的酯化蝦紅素來源則為雨生紅球藻(*Haematococcus pluvialis*)、南極蝦粉和南極蝦油(krill oil)等。

在增色的研究中，在1966年就開始有將辣椒紅素、小龍蝦(crawfish)的萃取物、金盞花的花瓣，添加在養殖虹鱒(*Oncorhynchus mykiss*)的飼料中的研究

(Peterson et al., 1966)。由於期望能夠提升魚隻色素蓄積的效率，有許多的研究探討鮭鱒魚類的增色，促使魚肉能呈現賣相較佳的橘紅色。目前為了使大西洋鮭魚獲得較佳的呈色，一般會在飼料中添加 30-60mg/kg 的合成蝦紅素。在鮭魚的養殖中，添加的色素約佔了飼料總成本的 10-15%，是飼料中的成分最昂貴的部分 (Buttle et al., 2001)。由此可知，類胡蘿蔔素在水產養殖上的需求量相當可觀。此外也有許多的研究探討養殖的嘉鱻體色較黑並且不如野生的外表呈漂亮的粉紅色等問題(Booth et al., 2004; Chatzifotis et al., 2005; Doolan et al., 2008; Kalinowski et al., 2007; Kalinowski et al., 2005; Tejera et al., 2007)。近年來亦有愈來愈多的研究朝向觀賞魚的增色，包括孔雀魚(Karino and Haijima, 2004)，金魚(Xu, 2006; Yanar et al., 2008)、鬥魚(Clotfelter et al., 2007)、紅旗(*Hyphessobrycon callistus*)(Wang et al., 2006)、小丑魚(*Amphiprion ocellaris*)(Yasir and Qin, 2010)、紅魔鬼(*Cichlasoma citrinellum*)(Pan and Chien, 2009)、金波羅(*Cichlasoma severum*)(Kop and Durmaz, 2008)等。除了魚類之外，亦有研究致力於蝦類(Boonyaratpalin et al., 2001; Liao et al., 1993; Paibulkichakul et al., 2008)、海膽(*Psammechinus miliaris*)生殖腺的增色(McBride et al., 2004; Shpigel et al., 2006; Suckling et al., 2011)。為有效的增進紅色色澤，在赤鯛的研究中指出，建議以蝦殼粉做為色素來源時，蝦紅素在飼料中的最適添加量為 40 mg/kg diet (Kalinowski et al., 2005)。後來有研究建議，在上市前 120-180 天的赤鯛投餵以蝦殼粉做為蝦紅素來源，蝦紅素濃度為 21mg/kg diet 的飼料為最適量(Kalinowski et al., 2007)。而在嘉鱻(*Pagrus auratus*)的研究中則建議，蝦紅素在飼料中的最適添加量為 30 mg/kg diet (Doolan et al., 2008)。在紅色吳郭魚的研究中，建議添加 50mg/kg diet 的蝦紅素於飼料中(黃, 2009)。此外色素在觀賞魚的添加量也依魚種有所差異，在紅旗(*Hyphessobrycon callistus*)的研究建議使用 40mg/kg diet 的類胡蘿蔔素(Wang et al., 2006)。在金魚的研究指出，以紫花苜蓿做為類胡蘿蔔素來源，其最適添加量為 100mg/kg diet(Yanar et al., 2008)，而在紅魔鬼建議使用 160mg/kg diet 的蝦紅素增色為佳(Pan and Chien, 2009)。目前為提升魚隻的體色在飼料中所添加的類胡蘿蔔素量，一般在鮭鱒魚飼料與觀賞魚飼料的中添加量多在 100mg/kg diet 以下。

由於各物種蓄積、轉換色素的能力不盡相同，而在飼料中添加色素將造成本負擔，因此色素在種類的選擇上與劑量的考量上都是值得研究的問題。隨著類胡蘿蔔有愈來愈多的生理功能被發現，除了增豔效果，有些研究開始探討類胡蘿蔔素對於水生生物更多層面的影響，其中包括維他 A 轉換能力(Hu et al., 2006)、抗氧化(Pan et al., 2011)、免疫能力(Amar et al., 2004; Clotfelter et al., 2007)、抗緊迫(Pan et al., 2011)。

九、 研究動機與目的

本研究室已探討飼料中添加不同含量的蛋白質與脂質及植物性原料取代魚粉對紅頭金鯛的影響(林，2010)，而目前紅頭金鯛存在人工養殖環境成長下體色偏淡的問題，因此本實驗探討類胡蘿蔔素對紅頭金鯛呈色的影響，使紅頭金鯛的飼料開發更加完備。

本實驗目的主要分成三部分：

1. 利用在紅頭金鯛之飼料中添加不同濃度的蝦紅素，期望能找出蝦紅素的色素蓄積飽合曲線，在飼料成本及時效性的考量下，研究出最適的添加濃度。
2. 為評估紅頭金鯛類之胡蘿蔔素代謝模式，在飼料中添加玉米黃素，測試其是否能轉換成蝦紅素，替代蝦紅素添加在紅頭金鯛的飼料中使用。
3. 在飼料中添加蝦紅素與玉米黃素的呈色實驗之後安排褪色實驗，評估紅頭金鯛對於已蓄積色素之維持能力。

第二章 材料與方法

一、 實驗魚種及試驗條件

實驗用紅頭金鯛，購買自屏東縣民間種苗繁殖場平均體重約 0.2g 於漁業科學研究所飼養一年後魚體黑色已褪去，轉變成淡黃色為主的體色。實驗開始前，投餵無添加類胡蘿蔔素之飼料進行 4 週的馴養，並於實驗分組前一天停餵。實驗分組時，將平均體重 20 克的魚，分成 7 組，每組 8 尾，二重覆隨機取樣分配到 30cm×30cm×45cm 的魚缸中，並設置氣動式水中過濾器。實驗進行期間，每日依攝食狀況，投餵總量為魚體體重 2-4% 的實驗飼料，每日投餵二次，並於每次餵食完一小時後清除殘餌與換水，每日換水量約為總水體的 3/4，定期清洗過濾棉及刷洗內壁，避免藻類生長。實驗於室內進行，飼養期間水溫範圍 19~29℃。實驗共進行 12 週，前 8 週為呈色實驗，僅實驗組投餵含有添加類胡蘿蔔素的飼料；最後 4 週為褪色實驗，各組皆投餵無添加類胡蘿蔔素的對照組飼料。實驗於第 4、8、12 週，停餵一天，將紅頭金鯛以 2-phenoxyethanol (2-PE) 100ppm 進行麻醉後，進行秤重，且各組隨機採五尾測量體表呈色。另外於第 8、12 週各犧牲採樣 3 尾，保存於 -20 °C 的冰箱內，供日後魚體組織之類胡蘿蔔素分析。

二、 實驗飼料配製

實驗飼料配方如 Table 1 所示，實驗飼料以魚粉 65% 做為蛋白質主要來源，脂肪以大豆油 4.8% 及魚油 3.2% 添加。其中第 1 組飼料無添加類胡蘿蔔素為對照組；第 2、3 組飼料添加玉米黃素，使其類胡蘿蔔素含量分別為 25、50 mg /kg，玉米黃素來源由新鮮黃玉米烘乾後，再經粉碎製成之玉米粉經丙酮萃取，玉米黃素含量為 3.5-4mg/kg。第 4-7 組飼料添加人工合成蝦紅素 (Carophyll pink, contained 8% pure astaxanthin; Roche)，使其類胡蘿蔔素含量分別為 25、50、75、100mg /kg。將各種原料攪拌均勻後，加入原料 30~35% 的水混合均勻，通過孔徑直徑 2mm 之擠粒機，再分成適當大小，送入鼓風式乾燥機，以 40℃ 烘 15 小時，冷卻後保存在 -20 °C 冰箱。

三、 飼料成分分析

(一) 水分與灰分

1. 水分分析方法

依據 AOAC (1984) 方法分析。首先將坩鍋以 110 °C 烘乾 2 小時，再將坩鍋移到乾燥器中冷卻半小時後，秤空坩鍋重量(W0)。秤取飼料約 0.5 g 置於坩鍋，以烘箱 110°C 烘乾，每隔 2 小時秤重一次，秤重前先坩鍋移到乾燥器中冷卻半小時，直到所測坩鍋重量(W1) 達恆定為止。將 W1 減去 W0，可得減少水分重量，將減少水分重量除以開始所秤的飼料重量，即可求得飼料中的水分含量。

2. 灰分分析方法

首先將坩鍋以 110 °C 烘乾 2 小時，再將坩鍋移到乾燥器中冷卻半小時後，秤空坩鍋重量(W0)。秤取飼料約 0.5 g 置於坩鍋並加蓋坩鍋蓋，以灰化爐(NEY 2-525) 600°C 持續加熱 15 小時，秤重前先坩鍋移到乾燥器中冷卻半小時，測坩鍋重量(W2)。將 W2 減去 W0，可得灰分重量，灰分重量除以開始所秤的飼料重量，即可求得飼料中的灰含量。

(二) 粗蛋白

各組飼料蛋白質之含量，皆依照 Micro-Kjeldahl 的分析方法(AOAC , 1984) 來分析。取樣品飼料約 0.2 g 以 90 mm 濾紙(Toyo , Japan) 包覆，放入凱氏氮分解瓶中，加入 $K_2SO_4 : CuSO_4 = 9 : 1$ 的催化劑 3 g，隨後再加入 10 ml 18 N 的濃硫酸，將凱氏氮分解瓶放入粗蛋白質分解裝置(Büchi 435)，先以 210 °C 預熱 30 分鐘，接著再提高溫度至 560 °C，約二小時之後分解完畢，此時溶液為淡藍綠色且澄清，使其於室溫下冷卻，將此分解完畢的樣品，以凱氏氮自動測定儀(Büchi K355) 根據硫酸滴定量，再計算樣本中粗蛋白質含量。

自動分析裝置使用的溶劑及溶液分別為：30 ml 蒸餾水、75 ml 氫氧化鈉(NaOH, 40%)、50 ml 硼酸(H_3BO_3 , 2%) 及滴定用硫酸(H_2SO_4 , 0.1 N)。換算公式如下：

粗蛋白(%) = $[6.25 \times 0.1 \times 1.0 \times \text{硫酸滴定量}(\text{ml}) \times 14 \div \text{樣本重}(\text{mg})] \times 100$

(三) 粗脂質

依照 Folch 等人(1957)的方法。秤取飼料約 2 克，研磨成粉狀，加入 50 ml 氯仿/甲醇 (chloroform / methanol, 2 : 1 v/v) 的溶液，以均質機 (Nissei AM-3, Tokyo Japan) 5000 rpm 攪拌 5 分鐘，再以 Büchner funnel 過濾，並以氯仿/甲醇 (2 : 1 v/v) 50 ml 洗滌，將過濾液完全移入分液漏斗中，並加入 0.03 M 氯化鎂 ($MgCl_2$) 20 ml 強力混合 1 分鐘，靜置一夜。取濃縮瓶加入氯仿，以減壓回轉濃縮機濃縮後，將空濃縮瓶秤重(W_0)。取分液漏斗下層液含脂質至濃縮瓶中，以減壓回轉濃縮機濃縮，將含萃取物之濃縮瓶秤重(W_1)。將 W_1 減去 W_0 ，可得粗脂質重量，將粗脂質重量除以開始所秤的飼料重量，即可求得飼料中的粗脂質含量。

四、體表呈色測定

利用色差計(Minolta CR-10 hand held chromameter)直接偵測魚體魚的臉頰、背部及尾鰭的三個位置點，測量出顏色參數(a^* , b^* 和 L^* 值)，並比較顏色差異(ΔE)。顏色參數係依據國際照明委員會(Munsell Color Science Lab)制定之色彩空間 CIE Lab 系統， a^* 值越高代表紅色程度越高，而 a^* 值越低代表綠色程度越高； b^* 值越高代表黃色程度越高，而 b^* 值越低代表藍色程度越高； L^* 值代表亮度，其值越高代表亮度越高。顏色差異(ΔE)為 $a^*-a^*_0$ 的平方加 $b^*-b^*_0$ 的平方加 $L^*-L^*_0$ 的平方值之平方根，當 $\Delta E > 6$ 則表示已達人眼感官可明顯分辨的標準。

五、類胡蘿蔔素分析

(一) 類胡蘿蔔素總量

樣本組織分別取自魚的臉頰、額頭、背部表皮及尾鰭的四個位置點。樣本經秤重後置於研鉢，加入適量無水硫酸鈉共同研磨，利用丙酮萃取組織中的類胡蘿蔔素，並將丙酮萃取液以 90 mm 濾紙 (Toyo, Japan) 過濾後收集至濃縮瓶中，重覆加入丙酮萃取組織中的類胡蘿蔔素，直至丙酮萃取液出現的顏色極淡。以減壓迴轉濃縮機(Yamato BM42、Yamato BM400)將收集的萃取液進行濃縮。濃縮完

後加入總量為 15 ml 乙醚與 5 ml 去離子水，各分 3 次加入濃縮瓶中，輕輕搖晃後，將溶液倒入分液漏斗，並上下搖晃充分混合溶液，待溶液靜置分層後收集乙醚層，水層再另外加入乙醚，同樣以分液漏斗萃取乙醚層，重覆進行 3 次。將收集到的乙醚層再以減壓迴轉濃縮機進行濃縮。濃縮後得到的產物以苯溶解，移至定量瓶中，定容至標線，以分光光度計(Thermo AQUAMATE)測量樣本在波長 480 nm 的吸光值。總類胡蘿蔔素的含量換算根據 McBeth's formula (McBeth, 1972)。最後將樣本移入樣本瓶，保存於-20 度冰箱，待類胡蘿蔔素組成分析。

(二) 類胡蘿蔔素組成

依 Okada 等人 (1994) 的方法，將由上述方法所得到的各組總類胡蘿蔔素利用 silica gel column chromatography 分離色素。在直徑 1 cm 的 column 內置入約 5-6 cm 高粒徑 40 μ m 的 silica gel(Baker Co.)。先以正己烷(hexane)洗滌 column 約 3 次，再將樣本液注入 column。以正己烷 20ml 通過 column，此時可得到 β -胡蘿蔔素。然後再以正己烷-苯-乙基乙酯 (ethyl acetate) 為 5:10:1 的混和液 30ml 作為 mobile phase 將色素分離出。將各色素分別收集並以正己烷定量並測定濃度。

六、 參數分析

(一) 增重百分比 Weight gain

$$= [\text{Final body weight (g)} - \text{Initial body weight(g)}] / [\text{Initial body weight (g)}] \times 100$$

(二) 飼料效率 Feed efficiency (%)

$$= [\text{Body weight gain (g)} / \text{Feed intake(g)}] \times 100$$

(三) 存活率 Survival (%)

$$= (\text{Final fish number} / \text{Initial fish number}) \times 100$$

(四) 整體色差值 $\Delta E = [(a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2 + (L^* - L^*_0)^2]^{1/2}$

$$\text{紅色色差值 } \Delta E_a = [(a^* - a^*_0)^2]^{1/2}$$

$$\text{黃色色差值 } \Delta E_b = [(b^* - b^*_0)^2]^{1/2}$$

a^*_0 , b^*_0 和 L^*_0 為對照組之 a^* , b^* 和 L^* 值

(五) 類胡蘿蔔素含量 Carotenoids content (mg carotenoids / 100g tissue)

$$= [OD_{\lambda} \times Vol.(ml) \times 10^3] / [E \times \text{weight of sample}(g)]$$

E1%1cm：類胡蘿蔔素在苯中 1%的 extinction coefficient value=1900

E1%1cm：玉米黃素在正己烷中 1%的 extinction coefficient value=2480

E1%1cm：蝦紅素在正己烷中 1%的 extinction coefficient value=2100

七、 統計分析

以 SPSS(Statistical Products Service & Solutions)套裝軟體對測量參數進行 one-way ANOVA 分析比較，若有顯著差異時，續以 Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) test，做各組間兩兩比較($\alpha=0.05$)。



第三章 結果

一、 飼料分析

實驗飼料設計及成分分析如 Table 1 所示。配製的實驗飼料蛋白質含量在 45-48%之間，粗脂質含量為 14-15%，灰份含量為 13-14%水分含量為 6-8%。使用兩種類胡蘿蔔素來源，希望將添加玉米黃素的二組 (Z25、Z50)含量控制在 25、50 mg/kg diet，而添加蝦紅素的四組(A25、A50、A75、A100)含量控制在 25、50、75、100 mg/kg diet。實際測量飼料中的類胡蘿蔔素含量，Z25、Z50 為 42.9、44.9 mg/kg diet，而 A25、A50、A75、A100 為 20.3、34.3、48.2、79.1 mg/kg diet。

二、 成長效果

在紅頭金鯛的飼料中分別添加不同類胡蘿蔔素含量為玉米黃素 25、50 mg/kg (Z25、Z50) 與蝦紅素 25、50、75、100 mg/kg (A25、A50、A75、A100)，飼養 4、8 個星期及 12 個星期後，其成長結果如 Table 2 所示。首先各組紅頭金鯛在飼養 4 個星期後，平均體重由 20.1-21.7 g 增加到 27.3-31.1 g，魚隻重量在各組之間並無顯著差異，增重率為 36 - 48%，飼料效率為 39 - 54%。接著在飼養 8 個星期後，平均體重由 27.3-31.1g 增加到 39.0- 44.9g，魚隻重量在各組之間並無顯著差異，增重率為 94 - 123%，飼料效率為 45 - 58%。經 4 星期飼養對照組無添加類胡蘿蔔素飼料的褪色實驗，平均體重由 39.0- 44.9g 增加到 47.6-54.2g，魚隻重量在各組之間並無顯著差異，增重率為 131 -168%，飼料效率為 47 -59%。由本實驗結果顯示，在飼料中有無添加或添加種類的不同的類胡蘿蔔素並不影響紅頭金鯛的增重率與飼料效率。除此之外，本實驗飼養期間各階段之存活率皆為 100%。

三、 體表顏色測定

紅頭金鯛全身顏色最深的為額頭部位，但是由於魚體相當側扁，使用色差計進行此部位測量不易，容易造成測量上的誤差，故體表呈色之測量點，選擇其它顏色也相對較明顯之部位(Fig.4)。另外，在組織中類胡蘿蔔素之萃取時無色差計測量之困難，故增加顏色明顯的額頭部位(Fig.17)。

第 4、8、12 的星期的魚隻照片(Figs.1-3)。由色差計 (Minolta CR-10 hand held chromameter) 偵測魚體體表各位置(Fig.4)，實驗進行至 4、8、12 週的呈色效果如 Table 3 所示。

(一) L 值(lightness 亮度，值介於 0-100，其值愈高代表亮度愈高)

1. 臉頰(Point 1)

第 4 星期的平均 L*值在 41.2-45.5，皆低於初始的 46.0。第 8 星期的平均 L*值在 45.1-50.4，其中以 Control 與 Z25 二組最高，有組間顯著差異。第 12 星期的平均 L*值在 45.4-51.4，其中以 A100 組為最低，有組間顯著差異。

2. 背部(Point 2)

第 4 星期的平均 L*值在 45.0-48.0，在各組之間並無顯著差異。第 8 星期的平均 L*值在 41.1-45.0，其中以 Control 組的值最高，但只與 Z50、A75 與 A100 三組有顯著差異。第 12 星期的平均 L*值在 43.2-46.2，其中以 Control 組的值为最高，不過也只與 A75 組有組間顯著差異。在背部的 L*值(Fig.6)結果顯示，在第 4 星期時各組之間的亮度沒有差異，而第 8、12 星期各組的亮度亦相差不大。

3. 尾鰭(Point 3)

第 4 星期的平均 L*值在 69.4-76.5，其中 Control 組的值較高，而 A100 組的值較低。第 8 星期的平均 L*值在 62.0-71.9，其中以 Control 的值最高，而 A50、A75、A100 三組最低，有組間顯著差異。第 12 星期的平均 L*值在 70.2-82.0，其中以 Control 組的值得明顯高於其它組別，有組間顯著差異。

(二) a 值(redness，其值愈高代表紅色程度愈高)

1. 臉頰(Point 1)

第 4 星期的平均 a 值在-2.3-7.7，其中以 Control 組為最低，而 A100 組為最高，A75 組次之，存在組間顯著差異。第 8 星期的平均 a 值在-1.5-4.8，其中以 Control、Z25 二組最低，A75、A100 二組最高，有組間顯著差異。第 12 星期的平均 a 值在-1.1-6.9，其中以 A100 組為最高，有組間顯著差異。由臉頰的 a 值(Fig.8)

結果顯示，添加蝦紅素劑量較高的 A75、A100 組，在實驗期間其紅色的程度明顯比其它組高，而添加玉米黃素的 Z25、Z50 二組則與 A25、A50 二組的紅色程度相近，其中 Control 組在各個時期皆為負值，在各組間保持最低的紅色程度。

2. 背部(Point 2)

在第 4 星期的平均 a*值在-1.6-7.2，其中以 A100 組最高，而 Control、Z25、Z50 組最低，有組間顯著差異。第 8 星期的平均 a*值在-4.1-3.4，其中添加蝦紅素的 A25、A50、A75、A100 四組的值最高，與 Control 組、添加玉米黃素的 Z25、Z50 組有顯著差異。第 12 星期的平均 a*值在-3.8-0.6，添加蝦紅素的四組同樣高於 Control、Z25、Z50 三組，達到顯著差異。在背部的 a*值(Fig.9)結果顯示，自第 4-12 星期，都可以偵測到添加蝦紅素的組別之紅色程度明顯高於 Control 組與添加玉米黃素的組別；另外 A100 組在第 4 星期時，背部的紅色程度明顯為添加蝦紅素的四組當中最高，但於第 8 星期時，在添加蝦紅素的四組則已變得相當接近。

3. 尾鰭(Point 3)

在第 4 星期的平均 a*值在-0.6-8.9，其中添加蝦紅素的組別高於 Control 組，具有顯著差異，而添加玉米黃素的組別則與 Control 組相近。第 8 星期的平均 a*值在-2.7-10.1，添加蝦紅素的組別高於 Control 組與添加玉米黃素的組別。第 12 星期的平均 a*值在-3.7-12.1，添加蝦紅素的組別仍高於 Control 組。由尾鰭的 a*值(Fig.10)結果顯示，添加蝦紅素的組別尾鰭紅色程度較對照組與玉米黃素高。

(三) b 值(Yellowness，其值愈高代表黃色程度愈高)

1. 臉頰(Point 1)

第 4 星期的平均 b 值在 8.3-17.2，其中以添加玉米黃素 Z25、Z50 二組的值較添加蝦紅素的組別都來的高，有組間顯著差異。第 8 星期的平均 b 值在 12.3-20.4，其中以 Control、A25、A75、A100 組較低，而 Z25 組最高，有組間顯著差異。第 12 星期的平均 b 值在 12.2-19.0，其中添加玉米黃素的 Z25、Z50 組為最高，有組間顯著差異。由臉頰的 b 值(Fig.11)結果顯示，自第 4-12 星期，添加玉米黃

素的 Z25、Z50 二組，黃色的程度比其它組高，而 Control 組與添加蝦紅素的組別的黃色程度相近。

2. 背部(Point 2)

在第 4 星期的平均 b 值在 3.0-9.8，其中以 A100 組最高。第 8 星期的平均 b 值在 8.2-16.0，其中以 Z25 的值為最高。第 12 星期的平均 b 值在 8.6-14.7，以 Control、A75、A100 值最低，達到顯著差異。由背部的 b 值(Fig.12)結果顯示，以添加玉米黃素的組別黃色的程度較高，而其它在 Control 與添加蝦紅素的四組呈現黃色的程度較低。

3. 尾鰭(Point 3)

在第 4 星期的平均 b 值在 9.9-22.5，以添加玉米黃素 Z25、Z50 二組的值為最高，有組間顯著差異。第 8 星期的平均 b 值在 15.9-28.7，亦以添加玉米黃素 Z25、Z50 二組的值為最高，有組間顯著差異。第 12 星期的平均 b 值在 17.0-32.7，以 Z50 組為最高，Z25 組次之，有組間顯著差異。在尾鰭的 b 值(Fig.13)結果顯示，添加玉米黃素的組別尾鰭黃色程度明顯比對照組與蝦紅素的組別來的高。

(四) ΔE 、 ΔE_a 、 ΔE_b (ΔE 可比較整體色差，另外 ΔE_a 、 ΔE_b 可分別檢視紅色與黃色的差異程度)

Z25、Z50、A25、A50、A75、A100 六組與對照組的色彩差異比較結果如 Table 4 和 Figs.14-16 所示。

1. 各測點之平均 ΔE 值(Fig.14)

在第 4-8 週，在添加類胡蘿蔔素的各組都達到人眼感官可直接察覺差異的標準($\Delta E > 6.0$)，其中又以添加蝦紅素的 A75 或 A100 組的平均 ΔE 值最高。但其中在第 12 週時，僅有 A25 組的平均 ΔE 值下降為 4.8(< 6)，未達到與對照組呈現人眼感官可分辨的差別。

2. 各測點之平均 ΔE_a (Fig.15)

在第 4-12 星期，添加蝦紅素的 ΔE_a 皆高於添加玉米黃素的組別，表示添加蝦紅素的組別與對照組之紅色差異程度，明顯高於添加玉米黃素的組別，其結果亦能清楚由第 4、8、12 的星期的魚隻照片(Figs.1-3)印證。

3. 各測點之平均 ΔE_b (Fig.16)

在第 4-12 星期，添加玉米黃素的組別 ΔE_b 皆高於添加蝦紅素的組別，表示添加玉米黃素的組別與對照組之黃色差異程度，明顯高於添加蝦紅素的組別，其結果亦能清楚由第 4、8、12 的星期的魚隻照片(Figs.1-3)印證。

四、魚體組織之類胡蘿蔔素總量

分析魚體體表各位置組織總類胡蘿蔔素(Fig.17)，測定的結果如 Table 5 和 Figs.18-21 所示。

1. 臉頰(Position 1)

第 8 星期的總類胡蘿蔔素含量在 1.1-7.3mg/100g，以 A100 組的含量較高。第 12 星期的總類胡蘿蔔素含量在 0.9-3.3mg/100g，各組間含量並無顯著差異。

2. 額頭(Position 2)

第 8 星期的總類胡蘿蔔素含量在 1.7-19.8mg/100g，以 A75 與 A100 組的含量最高。第 12 星期的總類胡蘿蔔素含量在 1.0-14.4mg/100g，以 A75 與 A100 組的含量較高。

3. 背部(Position 3)

第 8 星期的總類胡蘿蔔素含量在 1.0-11.1mg/100g，添加蝦紅素的組別有隨濃度上升而增加的趨勢，而添加玉米黃素的組別也有相同的趨勢。第 12 星期的總類胡蘿蔔素含量在 0.8-8.8mg/100g，仍有著隨添加的濃度上升組織中類胡蘿蔔素含量上升的現象。

4. 尾鰭(Position 4)

第 8 星期的總類胡蘿蔔素含量在 1.3-10.8mg/100g，以 A75 與 A100 組的含量最高。第 12 星期的總類胡蘿蔔素含量在 0.5-9.1mg/100g，以 A75 含量最高，有顯著差異。

在第 8 星期時，改成各組皆投餵對照組的飼料，由第 8 與第 12 星期在所測的四個部分比較(Figs.18-21)，可觀察出在飼料中原本有添加類胡蘿蔔素的各組，組織中的總類胡蘿蔔素含量皆有下降的現象。而在臉頰及額頭下降率為 32%，背部 25%，尾部 28%。

五、 類胡蘿蔔素組成

測定含量的結果如 Table 6 所示。由 Control 組在正己烷中的吸光值判斷，第 8、12 星期的分光光度計之吸光值在 444-446 nm 之間，表示在 Control 組中主要組成黃色的色素。在添加玉米黃素的組別中，在第 8 星期時，分別在 Z25、Z50 組測得 3.7 與 4.6mg/100g tissue 的玉米黃素，第 12 星期時，分別在 Z25、Z50 組測得 4.4 與 3.2mg/100g tissue 的玉米黃素，其餘色素中並沒有測到蝦紅素。

在添加蝦紅素的組別中，在第 8 星期經萃取後溶在正己烷中的吸光值最大值落在 470 nm，分別在 A25、A50、A75、A100 組測得 3.6、4.5、8.1、10.8mg/100g tissue 的蝦紅素，第 12 星期時，分別在 A25、A50、A75、A100 組測得 2.5、3.6、5.2、7.2mg/100g tissue 的蝦紅素，其餘色素中並無測到玉米黃素。

六、 蝦紅素之最適添加量

以無添加類胡蘿蔔素的 Control 組與添加蝦紅素的 A25、A50、A75、A100 的四組，由第 8 星期由色差計在魚體背部所測得之 a 值，對飼料中實際類胡蘿蔔素作 broken-line 分析，其 breakpoint 落在 32.4 mg/kg diet (Fig.22)。

以無添加類胡蘿蔔素的 Control 組與添加蝦紅素的 A25、A50、A75、A100 的四組，由第 8 星期由背部魚皮組織所測得之總類胡蘿蔔素含量，對飼料中實際類胡蘿蔔素作 broken-line 分析，其 breakpoint 落在 35.5mg/kg diet (Fig.23)。

第四章 討論

一、 成長效果

由本實驗結果指出，在平均體重約 20g 的紅頭金鯛飼料中，添加玉米黃素、蝦紅素做為類胡蘿蔔素來源以及不添加類胡蘿蔔素的對照組，其實驗魚隻的增重率、飼料效率、肝體比、存活率在各組中並無顯著差異。此結果顯示無論紅頭金鯛飼料中有無添加類胡蘿蔔素抑或是添加不同濃度與種類的類胡蘿蔔素，皆不影響魚隻的成長與活存。

在其它魚種的實驗亦出現相似的結果。在平均體重 5g 的金魚以酵母菌 (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) 做為蝦紅素來源，添加 60mg/kg 含量的類胡蘿蔔素到飼料中，經 60 天飼養後，皆與對照組間的成長沒有顯著差異(Xu, 2006)；在平均體重 300g 的大西洋鮭(*Salmo salar L.*)的飼料中分別添加 50mg/kg diet 的蝦紅素與不同濃度之葉黃素，飼養 138 天後，皆與對照組間的成長沒有顯著差異(Olsen and Baker, 2006)；在平均體重 88g 的嘉鱻分別在飼料中添加 60mg/kg diet 斑螫黃素與蝦紅素，飼養 50 天以後，皆與對照組間的成長沒有顯著差異(Doolan et al., 2008)。

以不同大小的赤鯛所進行的研究，在平均體重 44g 的赤鯛在飼料中分別添加斑螫黃素與以蝦殼粉為來源的蝦紅素，飼養 105 天後，皆與對照組間的成長沒有顯著差異(Kalinowski et al., 2005)。平均體重 82g 或 150g 的赤鯛的飼料中分別添加 100mg/kg diet 的蝦紅素、 β -胡蘿蔔素、茄紅素，飼養 10 週後，皆與對照組間的成長沒有顯著差異(Chatzifotis et al., 2005)。平均體重 223g 的嘉鱻以蟹殼粉做為蝦紅素來源，添加 3-6mg/kg 含量的類胡蘿蔔素到飼料中，經 165 天飼養後，皆與對照組間的成長沒有顯著差異(Garcia et al., 2010)。雖然在水生生物的生理代謝過程中，類胡蘿蔔素扮演了許多重要的角色，但在本研究結果及前人對於其它的魚種、不同的魚隻大小或者使用其它來源的類胡蘿蔔素之研究中，皆顯示在飼料中添加類胡蘿蔔素並不會對魚隻的成長產生影響。

二、 呈色

由實驗結果的照片可以看出，對照組的體色偏淡而且稍微較暗，添加玉米黃素的組別體色偏黃，而添加蝦紅素的組別體色偏紅。其第 4、8、12 週的魚隻照片結果亦能客觀的由色彩差異值得到印證。初步將實驗組與對照組數值比較平均整體色彩差異值(ΔE)，來檢視與各實驗組與對照組之差異，結果指出添加類胡蘿蔔素的各組，在 8 週實驗組餵食類胡蘿蔔素的呈色實驗當中，其整體色彩差異值(ΔE)為 8.4-10.1，皆大於 6 已達人眼感官清楚辨別的水準，顯示在飼料中添加的這二種色素都可以有效提升魚隻的體色。而在 12 週各組皆餵食不含類胡蘿蔔素的褪色實驗當中，除了 A25 以外，各組的整體色彩差異值(ΔE)為 8.5-11.2，仍大於 6，顯示即使停止餵食 4 週仍能夠維持與對照組之顏色差異。接著分別再以平均紅色差異值(ΔE_a)與黃色差異值(ΔE_b)來判斷與對照組之差異，由數據指出在添加蝦紅素的組別，其紅色程度明顯比添加玉米黃素的組別高；相反的，在添加玉米黃素的組別，其黃色程度明顯比添加蝦紅素的組別高，結果顯示添加蝦紅素主要能夠明顯提升的為紅色色澤，而添加玉米黃素能夠明顯提升的為黃色色澤。

比較各組實際之色差值，紅色程度(a^* 值)在添加蝦紅素的組別均有隨添加濃度而提升的趨勢，而在對照組與添加玉米黃素的組別之 a^* 值有下降的情形；黃色程度(b^* 值)在對照組與實驗組間，皆有上升的現象，尤其是添加玉米黃素的組別，其值最高，而對照組與添加蝦紅素的組別的黃色程度較為接近；最後在亮度方面(L^* 值)，則沒有明顯的趨勢。各個測點的呈現出魚的體色並非均分布，以尾鰭的呈色值最高，而臉頰、背部次之，除此之外，在第 8 週時，由各測點在 A75、A100 的 a^* 值均無顯著差異，故推論其紅色程度都已達到了飽合。第 12 週時，各組的各測點，其 a^* 、 b^* 有下降的現象。

在赤鰭笛鯛(*Lutanus erythropterus*)的研究中，平均 2.32g 的魚隻飼料中添加 50、100mg/kg diet 的蝦紅素、 β -胡蘿蔔素、南極蝦粉，飼養 6 週後，可使平均 ΔE 達 7.0-9.0。平均 35g 的赤鰭笛鯛飼料中添加 50、100mg/kg diet 的蝦紅素、螺旋藻，飼養 8 週後，可使平均 ΔE 達 8.6-13.3。二次實驗結果皆達人眼感官能明顯感受到差異的效果。另外， a^* 值的增加皆明顯較 b^* 、 L^* 值高，顯示與對照組的主要呈現在紅色的差異(曾，2004)。紅色吳郭魚(*Oreochromis sp.*)的研究中，平均 2.6g 的魚隻的飼料中添加 50、100mg/kg diet 的蝦紅素，飼養 10 週後，可使平均

ΔE 達 8.06-14.89。而平均 53g 的紅色吳郭魚，飼養 60 天後，可使平均 ΔE 達 9.06-14.15，二次實驗結果皆達人眼感官能明顯感受到差異的效果，另外， a^* 值皆明顯較 b^* 、 L^* 值高，顯示與對照組的主要呈現在紅色的差異(黃，2009)。

在研究赤鯛亦呈現魚體體色分布不均勻的現象，在前側位置出現的紅色程度最高，接著是尾鰭和背部，色彩飽合度在 105 天的時候下降，推測顏色已達到飽合，在 L^* 值方面則沒有影響(Kalinowski et al., 2005)；同樣以赤鯛為實驗魚種，以蟹殼粉做為蝦紅素來源，添加到飼料中，經 165 天飼養後，對體色有促進的效果，但在 L^* 值在各組之間沒有差異(Garcia et al., 2010)。而在嘉鱻的研究當中指出，隨飼料中添加的蝦紅素，可提高體表的紅色程度，在第 6 週以後，添加 36 與 72mg/kg diet 之組別，所呈現之 a^* 值沒有顯著差異，由此推測已達到蝦紅素蓄積的飽合，另外在 L^* 值與 b^* 值方面，並沒有影響(Booth et al., 2004)；另外一篇研究也指出，嘉鱻隨飼料中添加的蝦紅素，可提高體表的紅色程度，在第 50 天以後，添加 30 與 60mg/kg diet 之組別，所呈現 a^* 、 b^* 值沒有顯著差異，由此推測已達到蝦紅素蓄積的飽合，在 L^* 值並沒有影響(Doolan et al., 2008)。

除了添加玉米黃素的組別之外，在添加蝦紅素的組別中，紅頭金鯛體表的黃色也有增加的現象，而無添加類胡蘿蔔素的對照組，其體色亦呈現出淡淡的黃色色澤，可能是飼料所添加的魚粉也含有一些類胡蘿蔔素(8.8mg/kg diet)所造成的，雖然對照組中的類胡蘿蔔素沒有確定其組成，但由在組織萃取出色素在苯中所測得的吸光值最大值落在 435nm 左右，推測對照組與添加蝦紅素組別之體表出現黃色，是因為原始飼料中含有一些主要組成為黃色的類胡蘿蔔素所致。

三、 色素蓄積效果

在總類胡蘿蔔素的蓄積量分析可以發現，飼料中添加玉米黃素及蝦紅素的魚隻，組織內的類胡蘿蔔素蓄積量都會隨飼養天數而增加。在第 8 週時，對照組的類胡蘿蔔素含量為 1.3mg/100g，實驗組為 4.9-12.3 mg/100g，而添加蝦紅素 A75、A100，在所取樣的各部位組織中已達到了色素蓄積的飽合。此外由添加劑量相近的 Z25、Z50 與 A25、A50 相比，其色素在魚體中蓄積的量並無顯著差異。結

果顯示在紅頭金鯛的體色，蝦紅素與玉米黃素皆能有效的被蓄積在體表。而第12週時，對照組的類胡蘿蔔素含量為 0.8mg/100g，實驗組為 4.1-8.4 mg/100g，除了對照組以外的組別，蓄積的色素皆有顯下降的現象。而各個部位的蓄積的色素量並非均均分布，以額頭的魚皮為最高，背部與尾鰭次之，臉頰較少。

在赤鰭笛鯛的研究中，平均 2.32g 的魚隻飼料中添加 50、100mg/kg diet 的蝦紅素、 β -胡蘿蔔素、南極蝦粉，飼養 6 週後，類胡蘿蔔素含量為 0.36-1.74 mg/100g。平均 35g 的赤鰭笛鯛飼料中添加 50、100mg/kg diet 的蝦紅素、螺旋藻，飼養 8 週後，類胡蘿蔔素含量為 0.99-1.62 mg/100g (曾，2004)。而在紅色吳郭魚的研究中，平均 2.6g 的魚隻的飼料中添加 50、100mg/kg diet 的蝦紅素，飼養 10 週後，對照組的類胡蘿蔔素含量為 0.25mg/100g，實驗組為 0.84 mg/100g。平均 53g 的紅色吳郭魚，飼養 60 天後，對照組的類胡蘿蔔素含量為 0.25mg/100g，實驗組為 4.08 mg/100g 體表組織的類胡蘿蔔素蓄積會隨飼養天數而增加(黃，2009)。

其它魚種中的研究中嘉鱻 在飼料中添加 100mg/kg diet 的蝦紅素，飼養 10 週後，體表呈現與野生相近的紅色澤，而魚皮中的類胡蘿蔔素 27.7 μ g/g 明顯高於對照組的含量 4.33 μ g/g，實驗中也嘗試添加 β -胡蘿蔔素、茄紅素，但結果只有蝦紅素能明顯提升背部魚皮類胡蘿蔔素的含量，而 β -胡蘿蔔素、茄紅素並沒有明顯的效果 (Chatzifotis et al., 2005)。金魚以 60mg/kg 的濃度在飼料中添加蝦紅素，15 天後即與對照組有顯著差異，不同部位蓄積的色素的能力不同，在色素濃度最高的出現在尾鰭，接著是魚鱗、頭部(Xu, 2006)。

魚類因應不同時期的生理需求，可能發生蓄積的類胡蘿蔔素在體內產生轉移到不同組織的現象。在紅鮭(*Oncorhynchus nerka*)的研究中發現，紅鮭在產卵時，魚體肌肉中的游離蝦紅素僅剩產卵前的1%，其中雄魚以酯化的型式蓄積了身上95%蝦紅素在皮膚，而在雌魚則以游離的型式將身上85%的蝦紅素蓄積在卵當中 (Crozier, 1970)。鮭魚在經歷性成熟時期，為了產卵而在溪流中上溯，此時肌肉中的類胡蘿蔔素會開始下降，經由血液運送到魚皮和生殖腺(Ando et al., 1986)。此外在紅魔鬼的研究各組織中的類胡蘿蔔的濃度並不相同，其中生殖腺中的濃度

為最高，其次是魚皮、肌肉，推論可能為於實驗後期，魚進入性成熟的體型大小導致(Pan and Chien, 2009)。紅頭金鯛的性成熟體型約在12公分左右，當在第12週呈色實驗結束後，魚隻體長已達15-18公分，並在分析實驗犧牲魚隻時，發現其卵巢已有發育的情形，除此之外在實驗結束後，剩下蓄養魚隻在一、二個月之後有產卵的情形，因此推測在本實驗中第8-12週的褪色實驗中，魚皮組織色素蓄積量的下降，可能是魚隻隨著生殖的發育，經代謝運輸轉移到生殖腺，造成魚體體表所蓄積的類胡蘿蔔素量下降。

四、類胡蘿蔔素轉換成蝦紅素之代謝模式

各魚種對類胡蘿蔔素的代謝轉換能力不盡相同，在嘉鱻的研究指出，添加25-50mg/kg 的蝦紅素到飼料中，經 4 個月飼養後，其魚皮中蝦紅素的含量為2.9-4.8mg/100g，組成佔總類胡蘿蔔素的65-84%，其研究指出在飼料中添加的蝦紅素較多時，體內蓄積的蝦紅素比例也會比較高(Tejera et al., 2007)。而在紅頭金鯛經飼養8週後，添加蝦紅素25-100mg/kg的組別中，魚皮中蝦紅素的含量為3.6-4.5mg/100g。第12週時，魚皮中的蝦紅素含量為2.5-7.2mg/100g。結果與前述研究相符，也就是飼料中添加的蝦紅素量會影響到體內蓄積色素的組成。此外其體內蓄積的色素組成皆以蝦紅素為主，並沒有發現轉換成其它種類胡蘿蔔素的現象。另外在添加玉米黃素的組別，其結果亦存在相似的趨勢，其組成以玉米黃素為主，並沒有發現轉換成其它種類胡蘿蔔素的現象。由以上結果推測紅頭金鯛，在水生動物類胡蘿蔔素代謝轉換類型中，並不同紅鯉魚型(red carp type)的代謝類型能夠將玉米黃素，或其中間產物轉換成蝦紅素。應相似鯛魚型(Sea bream type)，不能轉換玉米黃素成蝦紅素，但能夠以不經修飾的蝦紅素直接儲存在體內。

五、最適添加量

由第8星期呈色實驗的結果，以無添加類胡蘿蔔素的Control組與添加蝦紅素的A25、A50、A75、A100的四組，利用broken-line做評估。藉由色差計在魚體背部所測得之a值，計算出之最適添加量為32.4 mg/kg diet；另外藉由魚皮組

織中的類胡蘿蔔素量，計算出之最適添加量為 35.5mg/kg diet，二者所得之最適添加量接近。在赤鯛的研究中指出，以體表呈色值做為評估依據，建議以蝦殼粉做為色素來源時，蝦紅素在飼料中的最適添為 40 mg/kg diet，以期能夠有效促進體色呈現紅色(Kalinowski et al., 2005)；而在嘉鱻的研究中建議，以體表呈色值做為評估依據，蝦紅素在飼料中的最適添為 30 mg/kg diet，經 50 天在箱網中飼養後可以有效的增進紅色色澤(Doolan et al., 2008)；另外在金魚的研究中建議，由體內的類胡蘿蔔素蓄積為評估依據，添加 100mg/kg diet 的類胡蘿蔔素到飼料中，經 60 天飼養後可以有效的增加組織內的類胡蘿蔔素，進而增強色澤來提高市場接受度(Yanar et al., 2008)。亦有研究建議，在上市前 120-180 天的赤鯛投餵以蝦殼粉做為蝦紅素來源，蝦紅素濃度為 21mg/kg diet 的飼料，可以使體色接近野生飼養的魚隻，並能夠提升魚皮中的類胡蘿蔔素含量。但是實驗組體表的 a^* (7.8-9.0)、 b^* (11.2-12.2)值與野生魚隻的 a^* (8.7)、 b^* (13.1)值相近，但魚皮之類胡蘿蔔素含量(10.4-14.0mg/kg diet)卻明顯低於野生魚隻(54.0mg/kg diet)。由相關性檢定發現，魚皮之類胡蘿蔔素含量與 a^* 、 b^* 值比較接近對數性相關，而非線性，故以人眼感官判斷組織內的色素含量有其限制性(Kalinowski et al., 2007)。

綜合以上結果可發現蓄積色素效果的評估的研究中，主要分為二種研究方法，有研究偏向採用體表所測得之色差值做為依據，而另一派研究偏向採用組織內所蓄積的色素量做為依據。本研究同時進行這二種研究方法，二者所得之最適添加量接近，表示此最適添加範圍(32.4-35.5mg/kg diet)符合有效的增進魚體的體色的需求。但若要嚴格選擇單一標準時，本研究認為雖然魚隻體表的呈色與組織內的類胡蘿蔔素含量皆可能隨攝取的色素增進，若就消費者一般僅以人眼感官做為判斷的水產品的外觀呈色的依據而論，其添加的色素劑量可以考慮以體表之呈色效果為標準，較能符合提升魚體增色之目的實用性與飼料成本之經濟性，並非一定要滿足體內組織蓄積之類胡蘿蔔素完全達到飽合，故建議紅頭金鯛在飼料中的添加量為 32.4mg/kg diet。另外，相較於金魚來說，紅頭金鯛之最適添加量與赤鯛和嘉鱻之魚種較為接近，而代謝模式也較為接近，可做為目前研究較少的紅頭金鯛進一步研究之參考。此外每個人對於顏色的喜好有所不同，雖然許多東方人傾向選購代表喜氣的紅色觀賞魚隻，不過也許有消費者偏好黃色魚隻，若有生產黃

色魚隻的考量時，由於實驗結果可以看出玉米黃素與蝦紅素的在組織中的蓄積能力相當，且玉米黃素影響體色提升黃色程度的能力亦不亞於蝦紅素提升紅色程度的能力，故欲添加玉米黃素至飼料當中，增進黃色的體色，其添加量可以參考蝦紅素的用量。

第五章 結論

- 一、在紅頭金鯛的養殖過程中添加玉米黃素與蝦紅素可以增加魚體體表之呈色作用，但對其成長表現沒有影響。
- 二、類胡蘿蔔素的添加中，玉米黃素與蝦紅素皆可明顯增強體色，其中玉米黃素主要使色差計所測得的 b^* 值有上升的趨勢，而蝦紅素則對 a^* 值的上升比較有明顯的作用，而若停止供給類胡蘿蔔素的添加，會使體色出現褪色的現象，且體表組織蓄積的色素下降 25-32%，故應持續供給含色素之飼料，以保持其體色色澤。
- 三、紅頭金鯛對類胡蘿蔔素的代謝利用模式，較接近鯛魚型 (Sea bream type)，不能轉換玉米黃素成蝦紅素，但能夠以不經修飾的方式直接儲存在體內。
- 四、蝦紅素在紅頭金鯛飼料中的最適添加量為 32.4-35.5mg/kg。

參考文獻

- 曾偉誠(2004)，飼料中添加不同類胡蘿蔔素對赤鰭笛鯛體色之影響。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- 黃侑勛(2009)，飼料中添加不同濃度與來源之類胡蘿蔔素對紅色吳郭魚體表增豔效果之影響。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- 林淙裕(2010)，飼料中添加不同含量的蛋白質與脂質及植物性原料對紅頭金鯛的影響。國立台灣大學漁業科學研究所碩士論文。
- Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., and Watanabe, T. (2004) Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish Shellfish Immun.*, *16*, 527-537.
- Ando, S., Takeyama, T., and Hatano, M. (1986) Deterioration of chum salmon muscle during spawning migration .8. transport associated with serum vitellogenin of carotenoid in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) *Agric. Biol. Chem.*, *50*, 557-563.
- Akhtar P., Gray J.I., Cooper T.H., Garling D.L. and Booren A.M. (1999) Dietary pigmentation and deposition of α -tocopherol and carotenoids in rainbow trout muscle and liver tissue. *J. Food Sci.*, *64*, 234-239.
- Aoki, T., Takada, K., and Kunisaki, N. (1991) On the study of proximate composition, mineral, fatty acid, free amino acid, muscle hardness, and color difference of six species of wild and culture fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, *57*, 1927-1934.
- Bauernfeind J. C., Adams C. R. and Marusich W. L.(1981) Carotenes and other vitamin A precursor in animal feed. In "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors" Bauernfeind J. C ed.. Academic Press, New York.

- Bell J.G., McEvoy J., Webster J.L., McGhee F., Millar R.M. and Sargent J.R. (1998) Flesh lipid and carotenoid composition of scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) J. Agric. Food Chem., 46, 119–127.
- Bjerkeng B., Storebakken T. and Liaaen-Jensen S. (1992) Pigmentation of rainbow trout from start feeding to sexual maturation. Aquaculture, 108, 333–346.
- Berglund, A., Bisazza, A., and Pilastro, A. (1996) Armaments and ornaments: an evolutionary explanation of traits of dual utility. Biol. J. Linn. Soc., 58, 385-399.
- Blount, J.D., Houston, D.C., and Moller, A.P. (2000) Why egg yolk is yellow. Trends Ecol. Evol., 15, 47-49.
- Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G., and Schlipalius, L.E. (2001) Effects of beta-carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. Aquac. Res., 32, 182-190.
- Booth, M.A., Warner-Smith, R.J., Allan, G.L., and Glencross, B.D. (2004) Effects of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801) Aquac. Res., 35, 458-464.
- Buttle, L., Crampton, V., and Williams, P. (2001) The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquacult. Res., 32, 103-111.
- Chatzifotis, S., Pavlidis, M., Jimeno, C.D., Vardanis, G., Sterioti, A., and Divanach, P. (2005) The effect of different carotenoid sources on skin coloration of cultured red porgy (*Pagrus pagrus*) Aquacult. Res., 36, 1517-1525.
- Cianci, M., Rizkallah, P.J., Olczak, A., Raftery, J., Chayen, N.E., Zagalsky, P.F., and Helliwell, J.R. (2002) The molecular basis of the coloration mechanism in lobster

- shell: beta-crustacyanin at 3.2-angstrom resolution. P. Natl. Acad. Sci., USA 99, 9795-9800.
- Clotfelter, E.D., Ardia, D.R., and McGraw, K.J. (2007) Red fish, blue fish: trade-offs between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. Behav. Ecol., 18, 1139-1145.
- Craik, J.C.A. (1985) Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. Aquaculture, 47, 61-88.
- Crozier, G.F. (1970) Tissue carotenoids in prespawning and spawning sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). J. Fish. Res. Board Can., 27, 973-975.
- Doolan, B.J., Allan, G.L., Booth, M.A., and Jones, P.L. (2008) Effect of carotenoids and background colour on the skin pigmentation of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801) Aquacult. Res., 39, 1423-1433.
- Fujii, R. (2000) The regulation of motile activity in fish chromatophores. Pigm. Cell Res. 13, 300-319.
- Garcia, J.R., Kalinowski, C.T.H., Izquierdo, M.S.L., and Robaina, L.E.R. (2010) Marine and freshwater crab meals in diets for red porgy (*Pagrus pagrus*): effect on growth, fish composition and skin colour. Aquacult. Res., 41, 1759-1769.
- Goodwin, T.W. (1986) Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. Annu. Rev. Nutr., 6, 273-297.
- Houde, A.E., and Torio, A.J. (1992) Effect of parasitic infection on male color pattern and female choice in guppies. Behav. Ecol., 3, 346-351.
- Hu, C.J., Chen, S.M., Pan, C.H., and Huang, C.H. (2006) Effects of dietary vitamin A or beta-carotene concentrations on growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Aquaculture, 253, 602-607.

- Jimenez-Martinez, L.D., Alvarez-Gonzalez, C.A., Contreras-Sanchez, W.M., Marquez-Couturier, G., Arias-Rodriguez, L., and Almeida-Madriral, J.A. (2009) Evaluation of larval growth and survival in mexican mojarra, *Cichlasoma urophthalmus*, and bay snook, *Petenia splendida*, under different initial stocking densities. *J. World Aquacult. Soc.*, *40*, 753-761.
- Kalinowski, C.T., Izquierdo, M.S., Schuchardt, D., and Robaina, L.E. (2007) Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. *Aquaculture*, *272*, 451-457.
- Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Fernandez-Palacios, H., Schuchardt, D., and Izquierdo, M.S. (2005) Effect of different carotenoid sources and their dietary levels on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*, *244*, 223-231.
- Karino, K., and Haijima, Y. (2004) Algal-diet enhances sexual ornament, growth and reproduction in the guppy. *Behaviour*, *141*, 585-601.
- Kodricbrown, A. (1989) Dietary carotenoids and male mating success in the guppy an environmental component to female choice. *Behav. Ecol. Soc.*, *25*, 393-401.
- Kolluru, G.R., Grether, G.F., South, S.H., Dunlop, E., Cardinali, A., Liu, L., and Carapiet, A. (2006) The effects of carotenoid and food availability on resistance to a naturally occurring parasite (*Gyrodactylus turnbulli*) in guppies (*Poecilia reticulata*). *Biol. J. Linn. Soc.*, *89*, 301-309.
- Kop, A., and Durmaz, Y. (2008) The effect of synthetic and natural pigments on the colour of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). *Aquacult. Int.*, *16*, 117-122.

- Liao, W.L., Nureborhan, S.A., Okada, S., Matsui, T., and Yamaguchi, K. (1993) Pigmentation of cultured black tiger prawn by feeding with a Spirulina-supplemented diet. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 165-169.
- Liebler D.C.(1993) Antioxidant reactions of carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 691, 20-31.
- Martinezpalacios, C.A., and Ross, L.G. (1988) The feeding ecology of the central American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *J. Fish Biol.*, 33, 665-670.
- McBride, S.C., Price, R.J., Tom, P.D., Lawrence, J.M., and Lawrence, A.L. (2004) Comparison of gonad quality factors: color, hardness and resilience, of *strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the northern California fishery. *Aquaculture*, 233, 405-422.
- Miki M., Yamaguchi K. and Konosu S.(1986) Carotenoid composition of *Spirulina maxima*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 1225-1227.
- Miki W., Yamaguchi K. and Konosu S.(1982) Composition of carotenoids in ovaries of marine fish and shellfish. *Comp. Biochem. Phys.*, B 71, 7-11.
- Miki, W. (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.*, 63, 141-146.
- Mori T., Makabe K., Yamaguchi K., Konosu S. and Arai S. (1989) Comparison between krill astaxanthin diester and synthesized free astaxanthin supplemented to diets in their absorption and deposition by juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Phys.*, B 93, 255–258.
- Olsen, R.E., and Baker, R.T.M. (2006) Lutein does not influence flesh astaxanthin pigmentation in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 258, 558-564.

- Pérez-Vega, M.H., Uribe-Aranzabal, M.C., García-Lorenzana, M., Romero-Ramírez, M.C., and Arredondo-Figueroa, J.L. (2006) Description of the ovarian follicle growth of the neotropical cichlids *Petenia splendida* and *Parachromis managuensis* (Perciformes: Cichlidae). *J. Appl. Ichthol.*, 22, 515-520.
- Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., and Menasveta, P. (2008) Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. *Aquaculture*, 282, 83-89.
- Pan, C.H., and Chien, Y.H. (2009) Effects of dietary supplementation of alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow), synthetic astaxanthin and beta-carotene on survival, growth, and pigment distribution of red devil, *Cichlasoma citrinellum* (Gunther). *Aquacult. Res.*, 40, 871-879.
- Pan, C.H., Chien, Y.H., and Wang, Y.J. (2011) Antioxidant defence to ammonia stress of characins (*Hyphessobrycon eques* Steindachner) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquacult. Nutr.*, 17, 258-266.
- Parker, R.S. (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb J.*, 10, 542-551.
- Peterson, D.H., Jager, H.K., Savage, G.M., Washburn, G.N., and Westers, H. (1966) Natural coloration of trout using xanthophylls. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 95, 408-414.
- Price, A.C., Weadick, C.J., Shim, J., and Rodd, F.H. (2008) Pigments, patterns, and fish behavior. *Zebrafish*, 5, 297-307.
- Scalia S., Isaksen M. and Francis G.W. (1989) Carotenoids of the Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.*, 34, 969-970.
- Schiedt K., Vecchi M. and Glinz E. (1986) Astaxanthin and its metabolites in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp. Biochem. Phys.*, B. 83, 9-12.

- Shpigel, M., Schlosser, S.C., Ben-Amotz, A., Lawrence, A.L., and Lawrence, J.M. (2006) Effects of dietary carotenoid on the gut and the gonad of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 261, 1269-1280.
- Simpson K. L. and Kamata T. (1979) Use of carotenoids in fish feeds. In: finfish nutrition and fishfeed technology (Halver J. E. & Thiews K. eds.), Vol. 2, pp. 415-424. H. Heenemann GmbH & Co., Berlin, Germany.
- Skrede G. and Storebakken T. (1986) Instrumental colour analysis of farmed and wild Atlantic salmon when raw, baked and smoked. *Aquaculture*, 53, 279–286.
- Storebakken T. and No H. K. (1992) Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, 100, 209-229.
- Storebakken, T., Sørensen, M., Bjerkeng, B., and Hiuc, S. (2004) Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature. *Aquaculture*, 236, 391-403.
- Suckling, C.C., Symonds, R.C., Kelly, M.S., and Young, A.J. (2011) The effect of artificial diets on gonad colour and biomass in the edible sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Aquaculture*, 318, 335-342.
- Surai, P.F., and Speake, B.K. (1998) Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *J. Nutr. Biochem.*, 9, 645-651.
- Svensson, P.A., and Wong, B.B.M. (2011) Carotenoid-based signals in behavioural ecology: a review. *Behaviour*, 148, 131-189.
- Tacon A. G. J. (1981) Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish Cult.*, 43, 205-208.

- Tejera, N., Cejas, J.R., Rodriguez, C., Bjerkeng, B., Jerez, S., Bolanos, A., and Lorenzo, A. (2007) Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources. *Aquaculture*, 270, 218-230.
- Treviño, L., Alvarez-González, C.A., Perales-García, N., Arévalo-Galán, L., Uscanga-Martínez, A., Márquez-Couturier, G., Fernández, I., and Gisbert, E. (2011) A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther, 1862 from hatching to the juvenile stage. *J. App. Ichthy.*, 27, 73-82.
- Uscanga-Martinez, A., Perales-García, N., Alvarez-Gonzalez, C.A., Moyano, F.J., Tovar-Ramirez, D., Gisbert, G.E., Marquez-Couturier, G., Contreras-Sanchez, W.M., Arias-Rodriguez, L., and Indy, J.R. (2011) Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 37, 667-680.
- Wang, Y.J., Chien, Y.H., and Pan, C.H. (2006) Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture*, 261, 641-648.
- Xu, X. (2006) Effect of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* on pigmentation of goldfish, *Carassius auratus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 37, 282-288.
- Yanar, M., Ercen, Z., Hunt, A.O., and Buyukcapar, H.M. (2008) The use of alfalfa, *Medicago sativa* as a natural carotenoid source in diets of goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 284, 196-200.

Yasir, I., and Qin, J.G. (2010) Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. J. World Aquacult. Soc., 41, 308-318.

Zagalsky, P.F., Ceccaldi, H.J., and Dumas, R. (1970) Comparative studies on some decapod crustacean carotenoproteins. Comp. Biochem. Physiol., 34, 579-607



Table 1 Composition and proximate analysis of the experiments diets

Diet no.	Inclusion (g/100g diet)						
	1 control	2 Z-25	3 Z-50	4 A-25	5 A-50	6 A-75	7 A-100
Ingredients							
Fish meal	65	65	65	65	65	65	65
Soybean oil	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Fish oil	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
Vitamin E	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Vitamin mix.*1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Mineral mix.*2	5	5	5	5	5	5	5
α -starch	15	15	15	15	15	15	15
choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
cellulose	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
Pigment addition (mg/kg)							
Zeaxanthin	0	25	50				
Astaxanthin	0			25	50	75	100
Proximate analysis (%)							
Crude protein	46.2	44.7	46.3	48.5	48.2	47.6	48
Crude lipid	14.9	15.2	15.7	15.3	15.2	14.5	15.1
Ash	13.9	13.9	14.0	13.8	14.1	13.9	14.1
Moisture	8.2	5.7	7.4	7.0	7.5	7.1	7.6
Carotenoids content(mg/kg)	8.8	42.9	44.9	20.3	34.3	48.2	79.1

*1 Ogino et al.(1979)

*2 Ogino and Yang (1978)

Table 2 Growth performance of *Petenia splendida* fed with experimental diets

Diet	Average body weight (g)									Weight gain (%)			Feed Efficiency(%)					
	Initial* ¹			4weeks* ²			8weeks* ³			12weeks* ⁴			4weeks	8weeks	12weeks			
1	20.2	± 7.5	^a	29.3	± 10.2	^a	41.5	± 14.4	^a	52.0	± 22.6	^a	45	105	157	47	49	54
2	20.8	± 10.4	^a	29.2	± 14.0	^a	42.4	± 19.4	^a	53.5	± 30.8	^a	40	104	157	42	48	55
3	20.7	± 5.9	^a	30.4	± 8.3	^a	42.4	± 11.4	^a	50.9	± 17.4	^a	47	105	146	48	49	51
4	20.6	± 7.5	^a	29.7	± 10.2	^a	42.1	± 13.5	^a	47.6	± 19.4	^a	44	105	131	46	49	47
5	20.1	± 7.4	^a	27.3	± 8.9	^a	39.0	± 11.8	^a	47.9	± 18.0	^a	36	94	138	39	45	50
6	21.7	± 6.5	^a	31.1	± 8.7	^a	44.1	± 12.3	^a	51.7	± 19.1	^a	43	103	138	46	49	50
7	20.2	± 3.2	^a	29.8	± 4.4	^a	44.9	± 7.0	^a	54.2	± 11.9	^a	48	123	168	54	58	59

*¹Mean ± SD (n=16)

*²Mean ± SD (n=16)

*³Mean ± SD (n=16)

*⁴Mean ± SD (n=10)



Table 3 L*a*b* integument color value of *Petenia splendida* fed with experimental diets (continued)

L*(lightness)

Initial						
Point						
	1		2		3	
	46.0 ±	2.1	39.2 ±	3.0	79.1 ±	1.5
4week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	41.6 ±	2.0 ab	47.9 ±	1.5 a	76.5 ±	1.0 c
2	44.7 ±	0.3 bc	45.4 ±	2.2 a	73.1 ±	1.4 abc
3	43.9 ±	1.7 abc	45.0 ±	3.6 a	72.9 ±	1.9 abc
4	44.8 ±	1.3 bc	46.5 ±	0.7 a	73.6 ±	2.4 bc
5	45.5 ±	1.6 c	47.9 ±	2.9 a	72.3 ±	1.5 ab
6	42.4 ±	0.8 abc	48.0 ±	2.8 a	74.1 ±	2.2 bc
7	41.2 ±	2.8 a	45.7 ±	1.7 a	69.4 ±	2.8 a
8week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	50.4 ±	0.7 c	45.0 ±	2.5 b	71.9 ±	1.9 d
2	50.4 ±	1.0 c	43.3 ±	1.7 ab	70.8 ±	1.1 cd
3	45.1 ±	1.3 a	41.5 ±	1.1 a	69.6 ±	1.0 c
4	46.5 ±	1.4 ab	43.0 ±	2.6 ab	67.1 ±	1.0 b
5	47.1 ±	0.8 b	43.0 ±	0.8 ab	63.7 ±	2.7 a
6	46.5 ±	0.9 ab	41.1 ±	1.3 a	62.0 ±	1.9 a
7	46.3 ±	1.9 ab	41.8 ±	1.7 a	62.2 ±	1.4 a
12week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	51.4 ±	1.8 c	46.2 ±	2.4 b	82.0 ±	1.8 d
2	50.4 ±	0.7 c	44.6 ±	2.2 ab	78.3 ±	2.1 c
3	49.8 ±	1.0 bc	43.4 ±	2.0 ab	75.9 ±	1.7 c
4	49.9 ±	0.6 bc	45.5 ±	2.1 ab	77.1 ±	3.0 c
5	49.9 ±	1.8 bc	44.0 ±	2.6 ab	70.2 ±	1.3 a
6	48.4 ±	1.1 b	43.2 ±	1.4 ab	73.1 ±	1.5 b
7	45.4 ±	1.8 a	44.0 ±	1.7 ab	71.4 ±	2.0 ab

Point:1(cheek);2(dorsal);3(caudal fin)

Table 3 L*a*b* integument color value of *Petenia splendida* fed with experimental diets (continued)

a*(redness)

Initial						
Point						
	1		2		3	
	0.1 ±	1.3	-4.3 ±	0.7	-1.0 ±	2.0
4week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	-2.3 ±	0.5 a	-1.8 ±	0.3 a	-0.6 ±	1.4 a
2	0.9 ±	0.7 b	-2.3 ±	0.9 a	1.5 ±	1.7 ab
3	2.0 ±	0.8 bc	-1.6 ±	0.8 a	0.9 ±	2.2 ab
4	2.9 ±	0.7 bc	2.9 ±	0.7 b	2.6 ±	1.0 bc
5	2.5 ±	0.5 c	3.2 ±	0.9 b	6.7 ±	3.2 c
6	5.3 ±	1.2 d	3.4 ±	3.1 b	5.5 ±	3.5 bc
7	7.7 ±	1.4 e	7.2 ±	1.3 c	8.9 ±	2.2 c
8week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	-1.7 ±	0.4 a	-3.9 ±	1.1 a	-2.7 ±	0.7 a
2	-1.5 ±	0.9 a	-4.1 ±	0.9 a	-0.5 ±	2.1 a
3	1.9 ±	0.9 bc	-2.8 ±	0.6 a	0.3 ±	0.9 a
4	1.3 ±	0.7 b	2.0 ±	1.5 b	8.5 ±	3.8 bc
5	3.0 ±	1.6 c	3.0 ±	2.4 b	6.8 ±	2.3 bc
6	4.8 ±	1.6 d	3.4 ±	1.5 b	10.8 ±	3.8 c
7	4.5 ±	0.7 d	1.9 ±	2.2 b	10.1 ±	1.6 bc
12week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	-1.1 ±	1.0 a	-3.4 ±	0.9 a	-3.7 ±	1.0 a
2	-0.8 ±	0.7 a	-2.6 ±	0.9 a	-1.1 ±	2.7 ab
3	-0.3 ±	1.3 a	-3.8 ±	0.7 a	-0.9 ±	1.6 bc
4	1.0 ±	0.4 ab	-0.4 ±	1.5 b	1.8 ±	2.1 cd
5	1.0 ±	1.7 ab	0.4 ±	2.2 b	9.0 ±	2.1 e
6	2.3 ±	1.2 b	-0.1 ±	2.1 b	3.7 ±	2.4 d
7	6.9 ±	3.0 c	0.6 ±	2.3 b	12.1 ±	1.5 f

Point:1(cheek);2(dorsal);3(caudal fin)

Table 3 L*a*b* integument color value of *Petenia splendida* fed with experimental diets

b*(yellowness)

Initial						
Point						
1		2		3		
	17.3 ± 2.0	10.8 ± 1.1	12.3 ± 2.8			
4week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	13.5 ± 3.0 bc	3.0 ± 1.6 a	9.9 ± 0.9 a			
2	16.9 ± 0.9 c	7.9 ± 0.7 bc	20.1 ± 0.9 b			
3	17.2 ± 2.9 c	6.5 ± 2.8 abc	22.5 ± 1.9 b			
4	9.1 ± 1.9 ab	5.1 ± 1.1 abc	11.5 ± 1.2 a			
5	6.4 ± 2.8 a	3.4 ± 1.0 a	11.5 ± 1.7 a			
6	8.3 ± 1.6 a	3.5 ± 2.6 a	10.5 ± 1.4 a			
7	10.5 ± 3.1 ab	9.8 ± 3.3 c	10.8 ± 1.7 a			
8week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	12.3 ± 1.0 a	8.2 ± 1.2 a	17.6 ± 1.6 a			
2	20.4 ± 1.5 d	16.0 ± 1.9 c	27.7 ± 4.3 b			
3	16.5 ± 2.3 bc	12.6 ± 3.5 b	28.7 ± 4.1 b			
4	13.4 ± 2.0 a	10.2 ± 2.0 ab	19.6 ± 2.8 a			
5	16.9 ± 3.2 c	12.0 ± 2.0 b	17.2 ± 1.0 a			
6	14.0 ± 2.1 a	10.7 ± 1.9 ab	18.8 ± 1.3 a			
7	13.3 ± 1.3 a	8.7 ± 1.5 a	15.9 ± 1.8 a			
12week						
Point						
Diet no.	1		2		3	
1	12.2 ± 0.5 a	8.6 ± 1.3 a	17.0 ± 1.3 a			
2	18.9 ± 2.9 b	14.7 ± 2.8 c	28.4 ± 2.9 b			
3	19.0 ± 3.9 b	12.4 ± 2.7 bc	32.7 ± 5.6 c			
4	14.3 ± 1.5 a	10.5 ± 2.1 ab	17.3 ± 1.5 a			
5	14.3 ± 2.5 a	12.6 ± 2.4 bc	20.0 ± 0.9 a			
6	13.1 ± 3.7 a	9.4 ± 1.4 a	17.7 ± 1.8 a			
7	12.8 ± 2.1 a	9.4 ± 1.1 a	18.3 ± 0.6 a			

Point:1(cheek);2(dorsal);3(caudal fin)

Table 4 Comparisons of the integument color value of *Petenia splendida* fed with experimental diets with the control (continued)

4week				
	Point			Mean
	1	2	3	
ΔE_{21}	5.6	5.5	10.9	7.3
ΔE_{31}	6.1	5.7	13.2	8.3
ΔE_{41}	8.0	5.1	6.3	6.5
ΔE_{51}	9.4	5.1	7.2	7.2
ΔE_{61}	9.9	6.4	7.9	8.0
ΔE_{71}	10.4	11.6	11.8	11.3

8week				
	Point			Mean
	1	2	3	
ΔE_{21}	8.1	8.0	10.4	8.8
ΔE_{31}	7.6	5.7	11.8	8.4
ΔE_{41}	5.0	6.6	12.3	8.0
ΔE_{51}	7.3	8.2	12.5	9.3
ΔE_{61}	7.8	8.6	16.7	11.1
ΔE_{71}	7.5	6.7	16.1	10.1

12week				
	Point			Mean
	1	2	3	
ΔE_{21}	6.8	6.4	12.2	8.5
ΔE_{31}	7.1	4.7	17.0	9.6
ΔE_{41}	3.3	3.6	7.3	4.8
ΔE_{51}	3.3	5.9	17.5	8.9
ΔE_{61}	4.7	4.5	11.5	6.9
ΔE_{71}	10.0	4.6	19.0	11.2

Point: 1(cheek);2(dorsal);3(caudal fin)
 ΔE_{21} : the color difference between group Z25 and control
 ΔE_{31} : the color difference between group Z50 and control
 ΔE_{41} : the color difference between group A25 and control
 ΔE_{51} : the color difference between group A50 and control
 ΔE_{61} : the color difference between group A75 and control
 ΔE_{71} : the color difference between group A100 and control

Table 4 Comparisons of the integument color value of *Petenia splendida* fed with experimental diets with the control (continued)

4week				
	Point			Mean
	1	2	3	
$\Delta\mathbf{Ea}_{21}$	3.2	-0.4	2.1	1.6
$\Delta\mathbf{Ea}_{31}$	4.3	0.2	1.5	2.0
$\Delta\mathbf{Ea}_{41}$	5.2	4.4	5.5	5.0
$\Delta\mathbf{Ea}_{51}$	4.7	5.1	7.3	5.7
$\Delta\mathbf{Ea}_{61}$	8.4	6.2	7.5	7.4
$\Delta\mathbf{Ea}_{71}$	10.0	8.5	9.4	9.3
8week				
	Point			Mean
	1	2	3	
$\Delta\mathbf{Ea}_{21}$	0.2	-0.1	2.2	0.8
$\Delta\mathbf{Ea}_{31}$	3.6	1.2	3.0	2.6
$\Delta\mathbf{Ea}_{41}$	3.0	5.9	11.2	6.7
$\Delta\mathbf{Ea}_{51}$	4.7	6.9	9.5	7.0
$\Delta\mathbf{Ea}_{61}$	6.5	7.3	13.5	9.1
$\Delta\mathbf{Ea}_{71}$	6.1	5.9	12.8	8.3
12week				
	Point			Mean
	1	2	3	
$\Delta\mathbf{Ea}_{21}$	0.3	0.8	2.6	1.2
$\Delta\mathbf{Ea}_{31}$	0.8	-0.4	2.7	1.0
$\Delta\mathbf{Ea}_{41}$	2.1	3.0	5.4	3.5
$\Delta\mathbf{Ea}_{51}$	2.1	3.7	12.5	6.1
$\Delta\mathbf{Ea}_{61}$	3.4	3.3	7.4	4.7
$\Delta\mathbf{Ea}_{71}$	8.0	4.0	15.7	9.2

Point:1(cheek);2(dorsal);3(caudal fin)

$\Delta\mathbf{Ea}_{21}$: the color difference of redness between group Z25 and control

$\Delta\mathbf{Ea}_{31}$: the color difference of redness between group Z50 and control

$\Delta\mathbf{Ea}_{41}$: the color difference of redness between group A25 and control

$\Delta\mathbf{Ea}_{51}$: the color difference of redness between group A50 and control

$\Delta\mathbf{Ea}_{61}$: the color difference of redness between group A75 and control

$\Delta\mathbf{Ea}_{71}$: the color difference of redness between group A100 and control

Table 4 Comparisons of the integument color value of *Petenia splendida* fed with experimental diets with the control

4week				
	Point			Mean
	1	2	3	
ΔEb_{21}	3.4	4.9	10.2	6.2
ΔEb_{31}	3.7	3.6	12.6	6.6
ΔEb_{41}	-4.4	2.1	1.5	-0.3
ΔEb_{51}	-7.1	0.4	1.6	-1.7
ΔEb_{61}	-5.2	1.2	0.2	-1.3
ΔEb_{71}	-3.1	6.9	0.9	1.6
8week				
	Point			Mean
	1	2	3	
ΔEb_{21}	8.1	7.8	10.1	8.7
ΔEb_{31}	4.1	4.4	11.1	6.6
ΔEb_{41}	1.0	2.0	2.0	1.7
ΔEb_{51}	4.6	3.9	-0.4	2.7
ΔEb_{61}	1.7	2.5	1.2	1.8
ΔEb_{71}	1.0	0.6	-1.7	-0.1
12week				
	Point			Mean
	1	2	3	
ΔEb_{21}	6.7	6.1	11.4	8.1
ΔEb_{31}	6.9	3.8	15.6	8.8
ΔEb_{41}	2.1	1.8	0.3	1.4
ΔEb_{51}	2.1	4.0	3.0	3.0
ΔEb_{61}	0.9	0.8	0.7	0.8
ΔEb_{71}	0.6	0.8	1.3	0.9

Point:1(cheek);2(dorsal);3(caudal fin)

ΔEb_{21} : the color difference of yellowness between group Z25 and control

ΔEb_{31} : the color difference of yellowness between group Z50 and control

ΔEb_{41} : the color difference of yellowness between group A25 and control

ΔEb_{51} : the color difference of yellowness between group A50 and control

ΔEb_{61} : the color difference of yellowness between group A75 and control

ΔEb_{71} : the color difference of yellowness between group A100 and control

Table 5 Integument carotenoids content of *Petenia splendida* fed with experimental diets

Initial									
Position									
1		2		3		4		mean	
0.5 ±	0.0	0.4 ±	0.1	0.6 ±	0.1	0.4 ±	0.1	0.5	
8week									
Position									
Diet no.	1		2		3		4		mean
1	1.1 ±	0.4 a	1.7 ±	1.6 a	1.0 ±	0.9 a	1.3 ±	1.1 a	1.3
2	3.0 ±	0.1 ab	6.3 ±	1.0 ab	4.7 ±	3.0 ab	5.6 ±	1.0 b	4.9
3	6.5 ±	1.1 ab	9.7 ±	2.3 b	5.8 ±	0.9 bc	4.9 ±	0.8 b	6.7
4	2.4 ±	0.3 ab	7.7 ±	0.9 b	5.1 ±	0.5 bc	4.5 ±	1.0 b	4.9
5	3.2 ±	1.1 ab	9.3 ±	2.1 b	6.6 ±	0.2 bcd	5.4 ±	1.1 b	6.1
6	4.1 ±	1.2 ab	13.7 ±	2.7 c	9.3 ±	1.4 cd	10.2 ±	1.5 c	9.3
7	7.3 ±	4.5 b	19.8 ±	4.2 c	11.1 ±	1.8 d	10.8 ±	2.1 c	12.3
12week									
Position									
Diet no.	1		2		3		4		mean
1	0.9 ±	0.2 a	1.0 ±	0.3 a	0.8 ±	0.1 a	0.5 ±	0.1 a	0.8
2	3.3 ±	0.6 a	5.2 ±	1.8 ab	4.0 ±	0.4 bc	3.7 ±	0.4 bc	4.1
3	3.3 ±	0.0 a	5.8 ±	1.0 ab	5.2 ±	0.3 bc	3.7 ±	0.3 bc	4.5
4	1.3 ±	0.6 a	4.7 ±	1.2 ab	2.6 ±	0.4 ab	2.8 ±	0.8 ab	2.8
5	2.0 ±	0.9 a	6.1 ±	2.3 ab	4.9 ±	1.4 bc	5.7 ±	1.2 cd	4.7
6	3.1 ±	0.9 a	10.2 ±	1.4 bc	6.2 ±	1.2 cd	9.1 ±	0.6 e	7.1
7	3.2 ±	1.9 a	14.4 ±	5.5 c	8.8 ±	1.2 d	7.3 ±	1.4 de	8.4

Position: 1(cheek); 2(head); 3(dorsal); 4(caudal fin)

Table 6 Integument carotenoids composition of *Petenia splendida* fed with experimental diets

	Diet			
	2		3	
	8week	12week	8week	12week
Zeaxanthin(mg/100g)	3.7	4.4	4.6	3.2

	Diet							
	4		5		6		7	
	8week	12week	8week	12week	8week	12week	8week	12week
Astaxanthin(mg/100g)	3.6	2.5	4.5	3.6	8.1	5.2	10.8	7.2



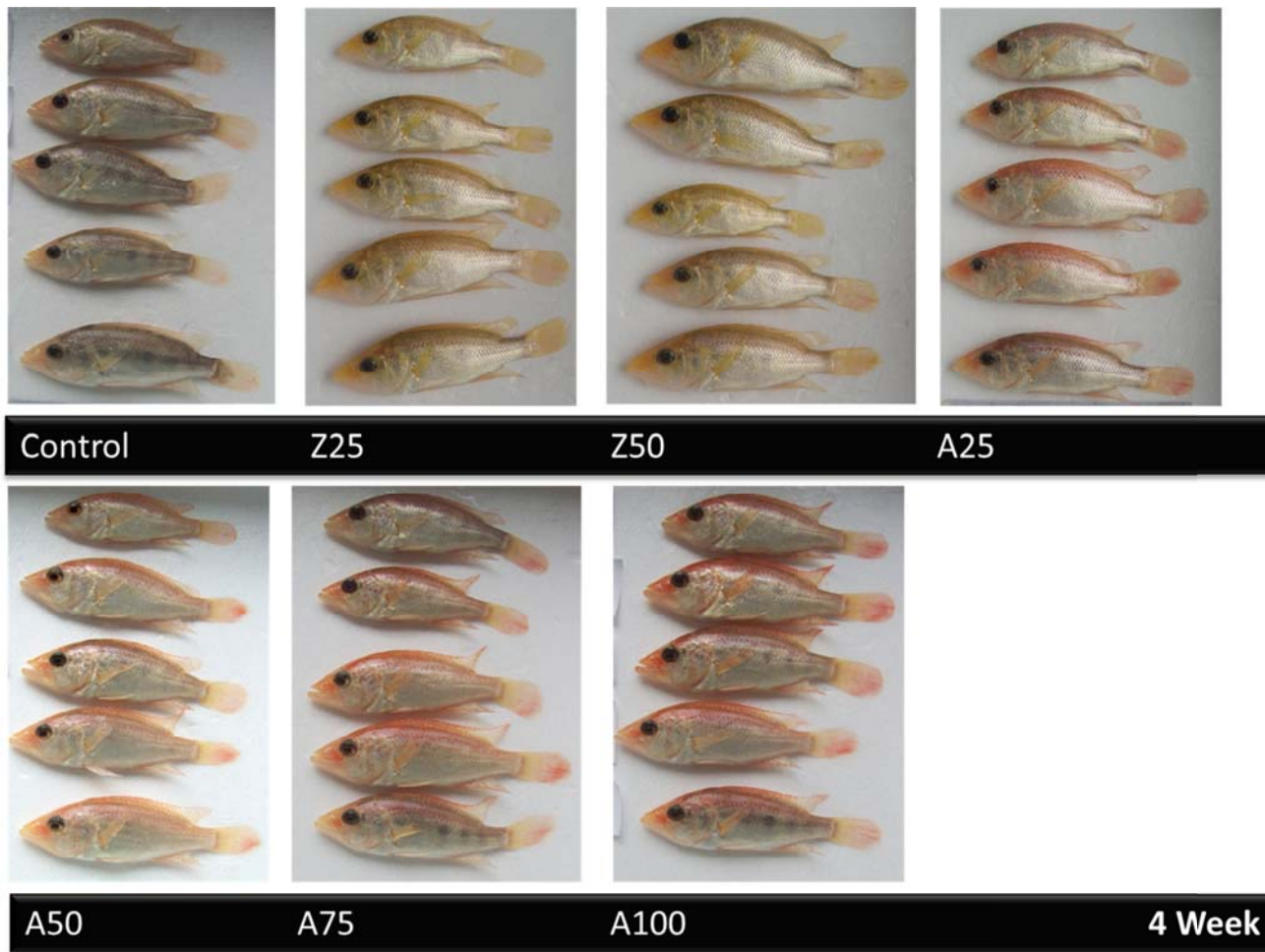


Fig.1 External views of *Petenia splendida* fed with experimental diets for 4 week

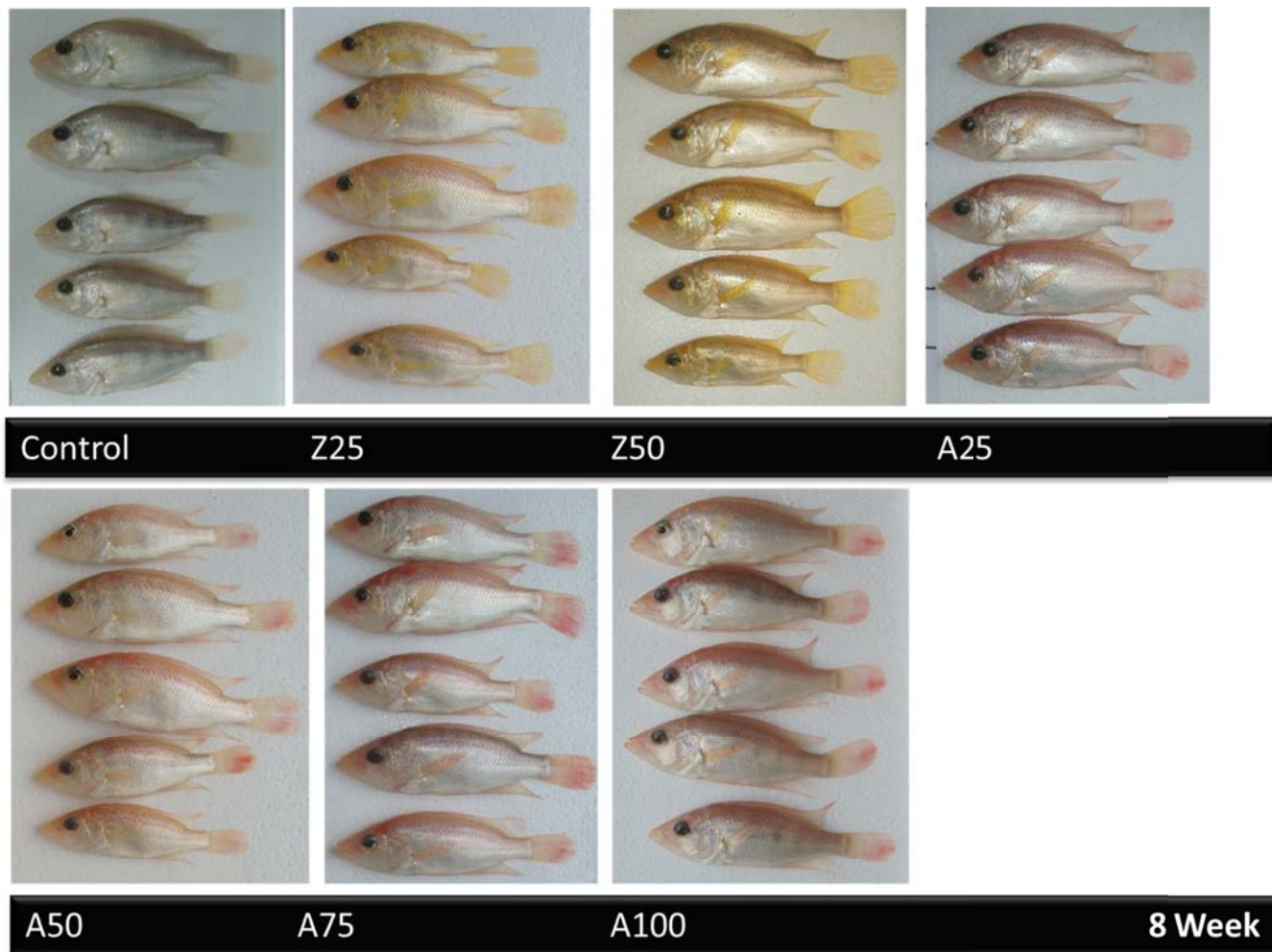


Fig.2 External views of *Petenia splendida* fed with experimental diets for 8 week

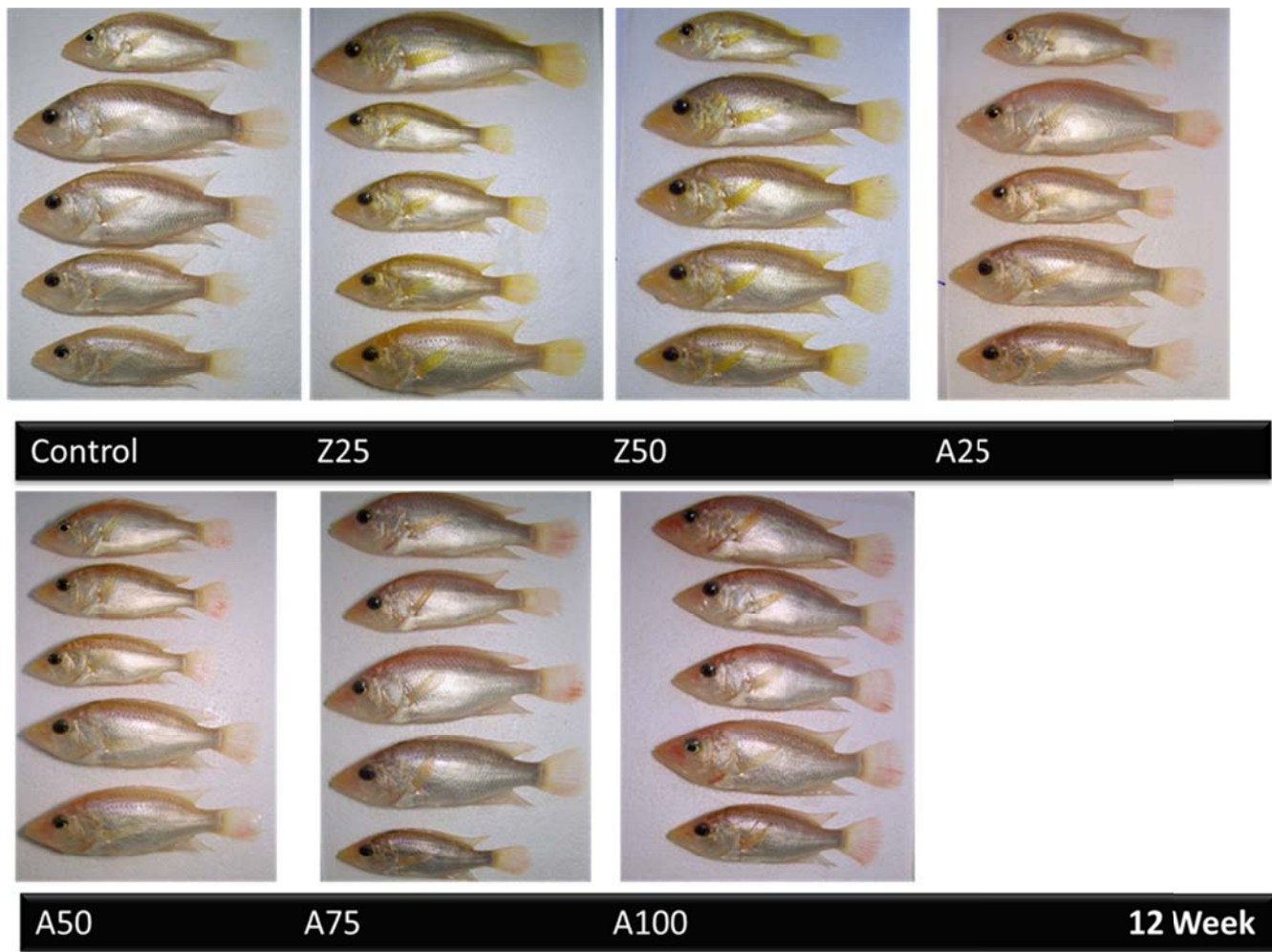


Fig.3 External views of *Petenia splendida* fed with experimental diets for 12 week

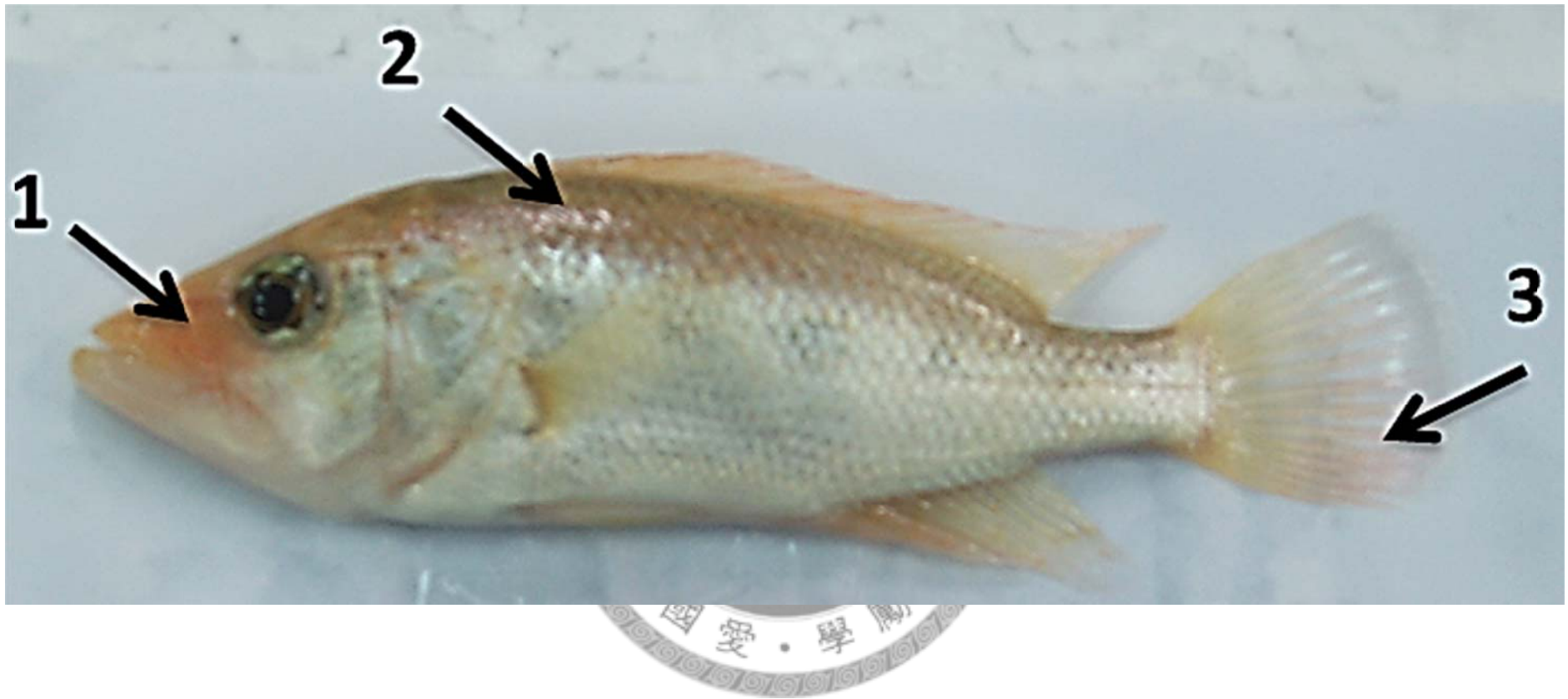


Fig.4 The point of color measurement in *Petenia splendida*

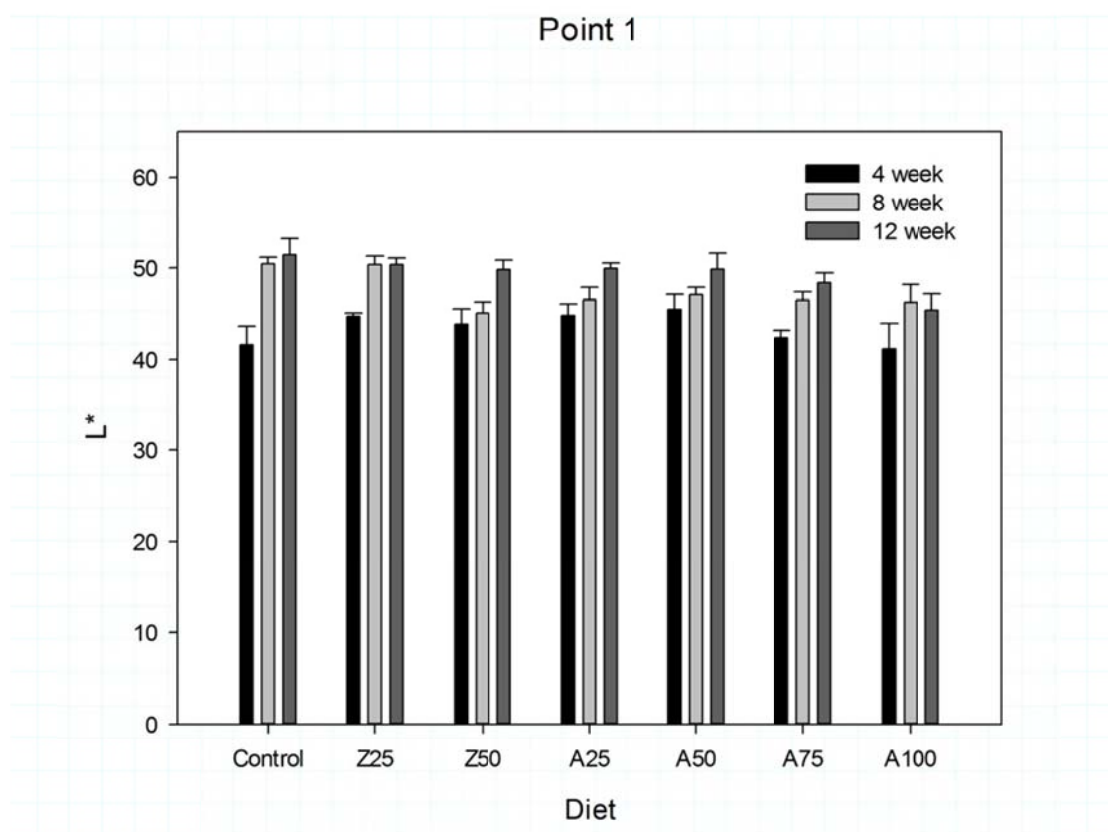


Fig.5 The integument color L*value (lightness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in cheek (point 1)

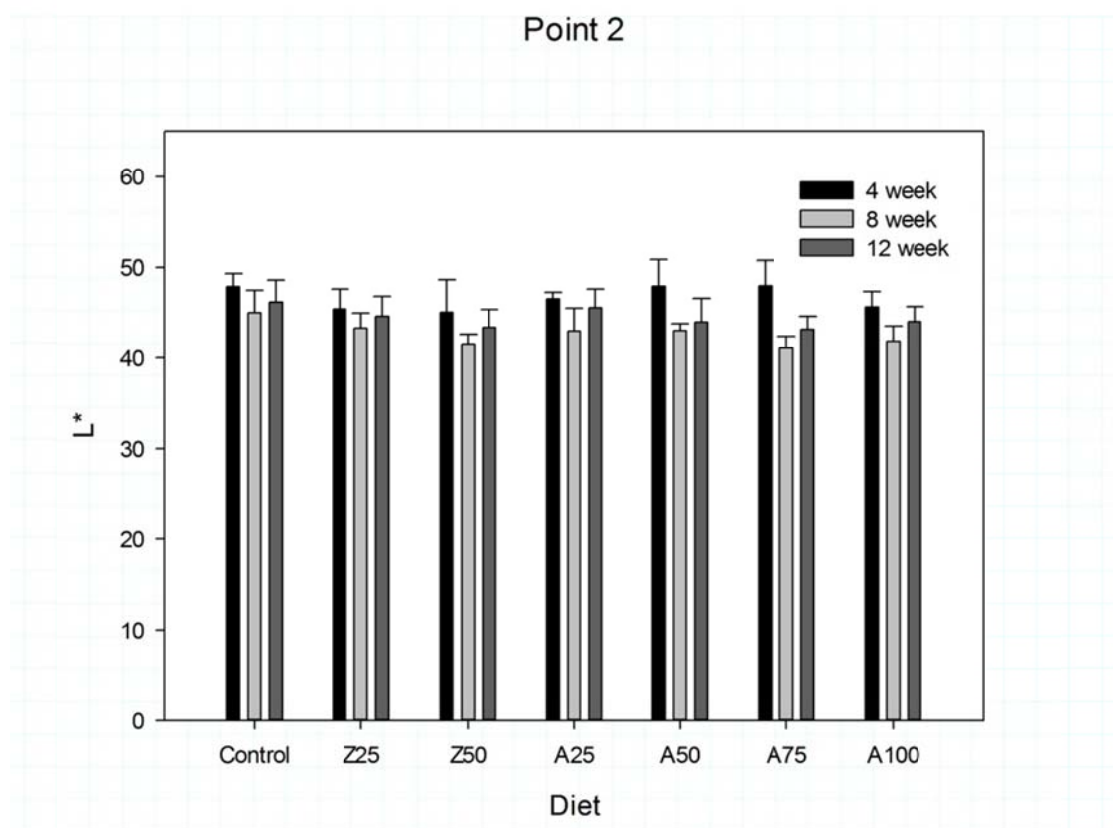


Fig.6 The integument color L*value (lightness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the dorsal (point 2)

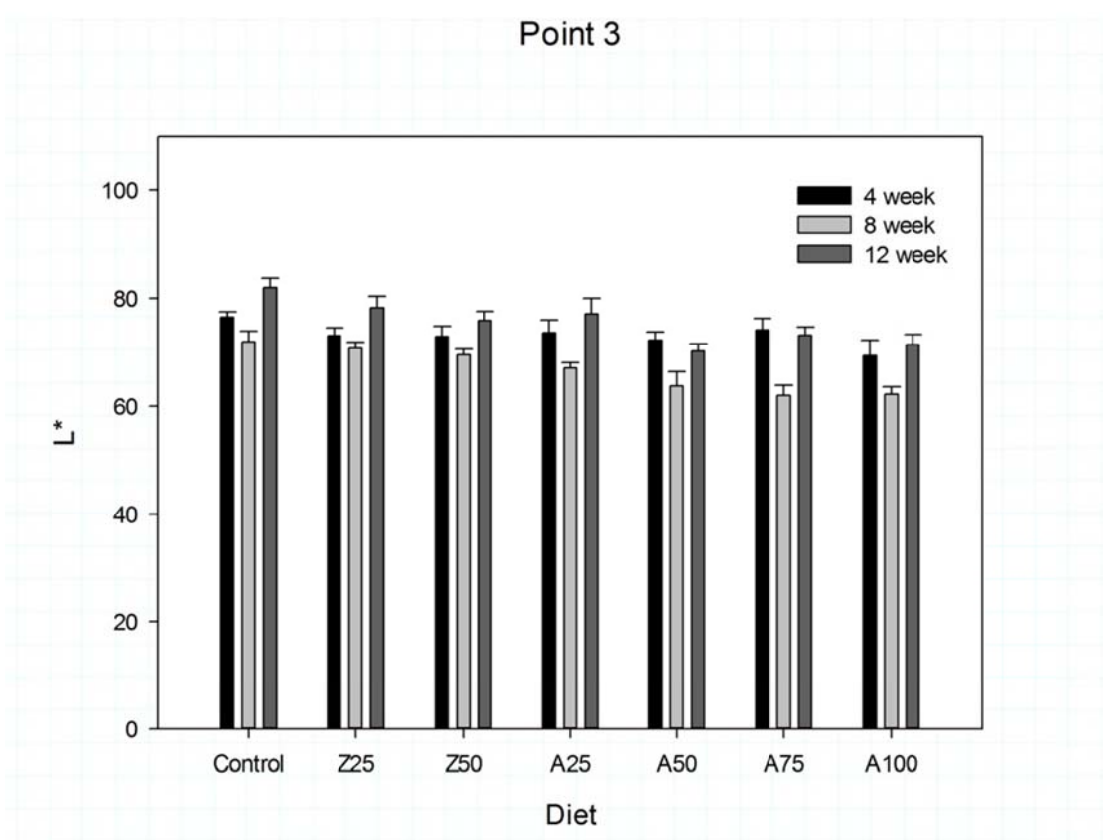


Fig.7 The integument color L*value (lightness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the caudal fin(point 3)

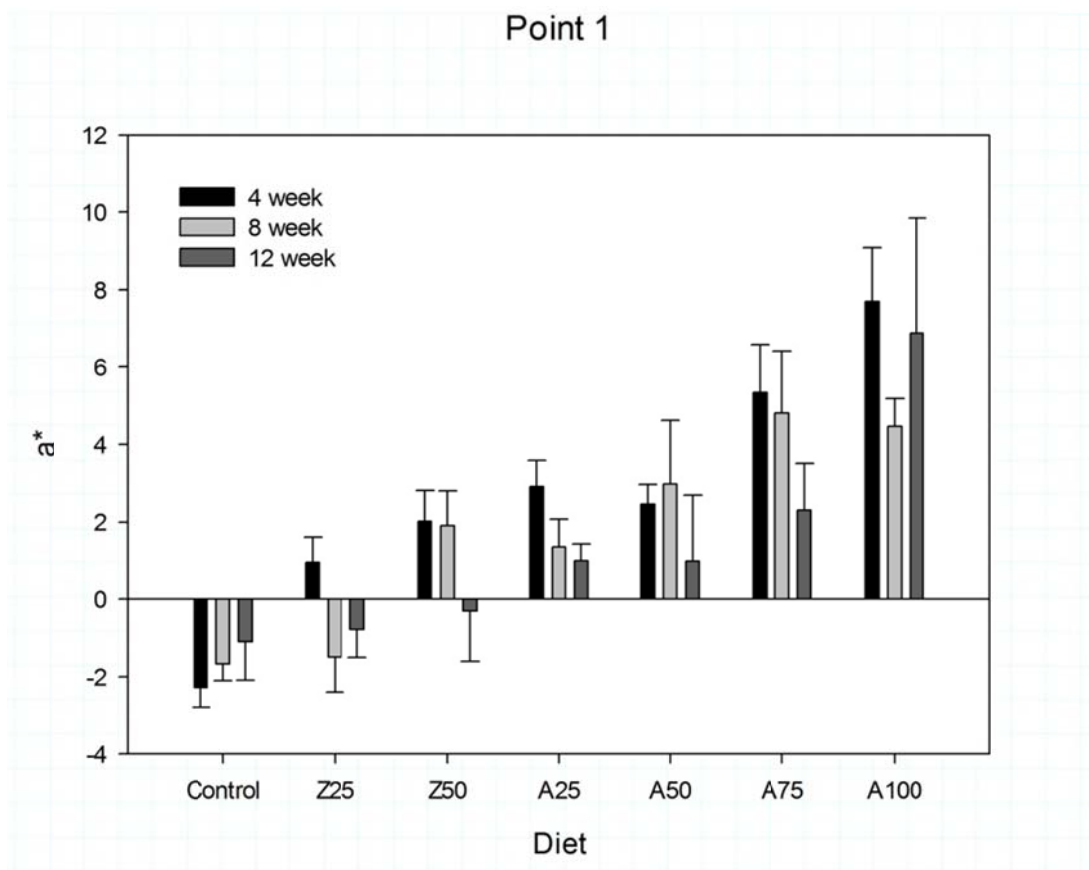


Fig.8 The integument color a*value (redness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in cheek (point 1)

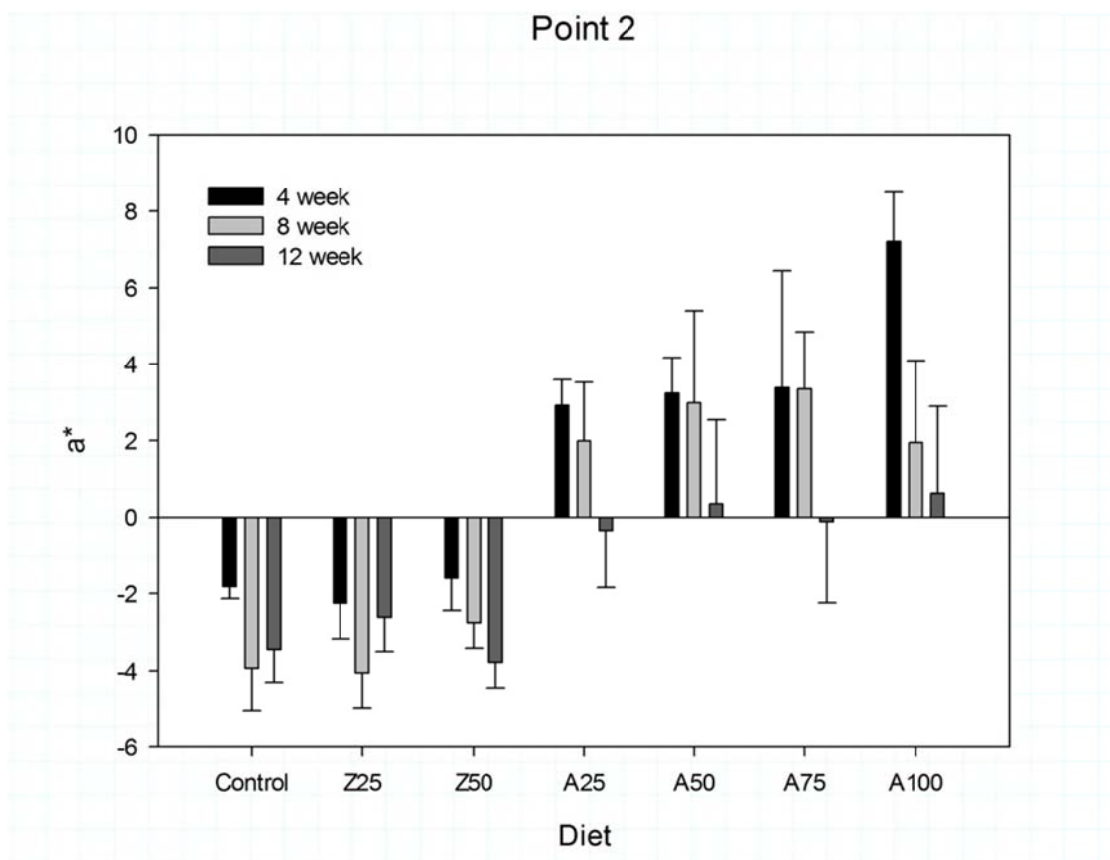


Fig.9 The integument color a^* value (redness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the dorsal 2(point)

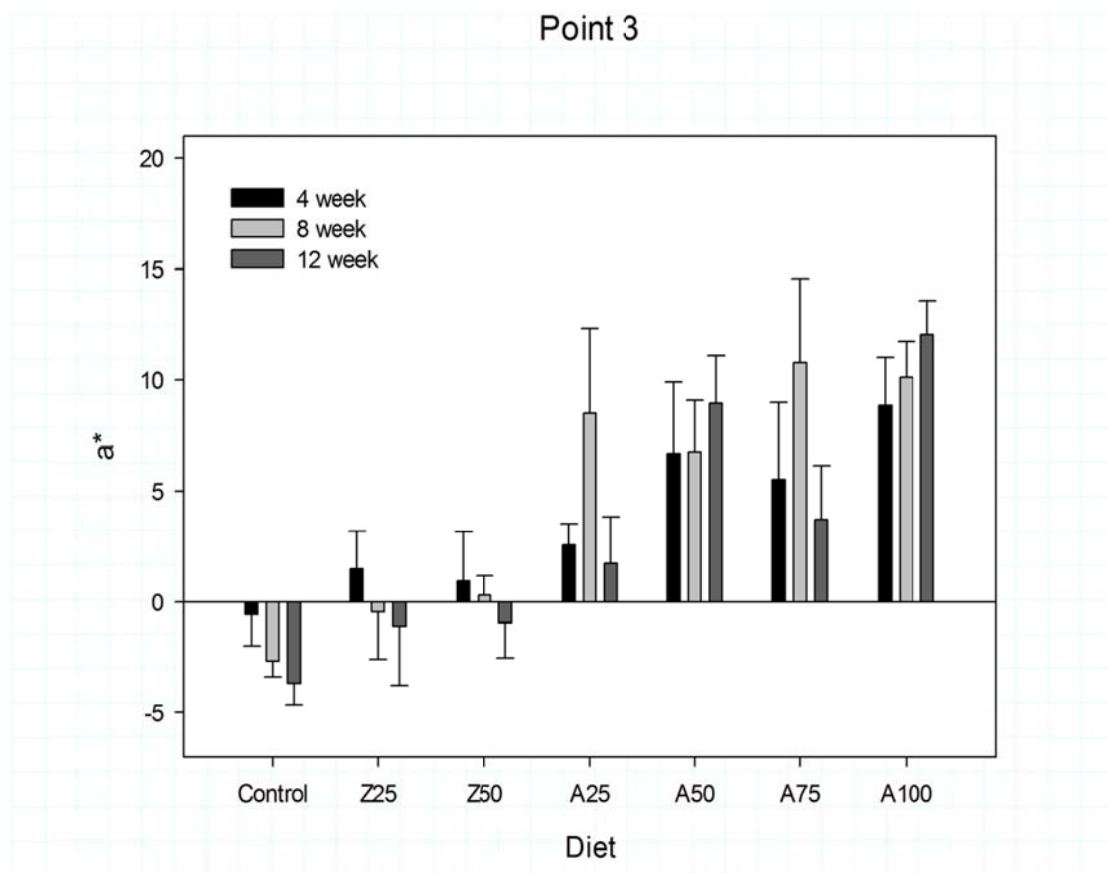


Fig.10 The integument color a*value (redness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the caudal fin(point 3)

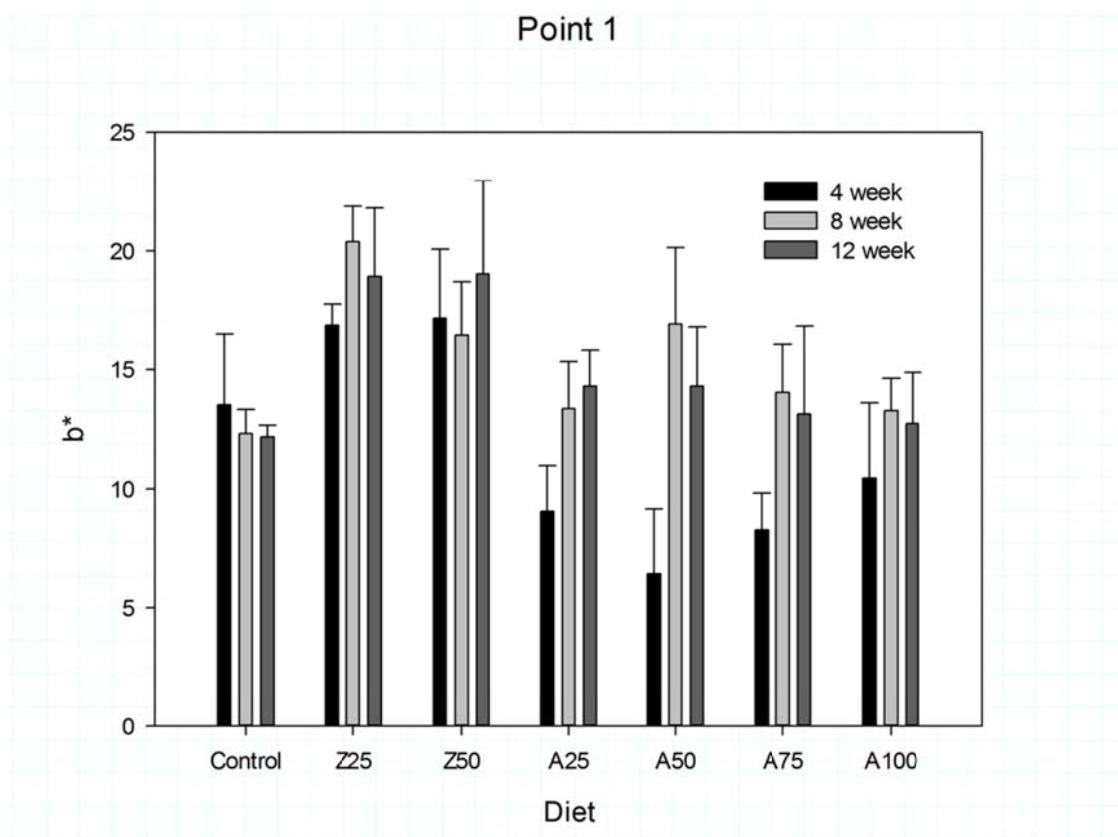


Fig.11 The integument color b*value (yellowness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in cheek (point 1)

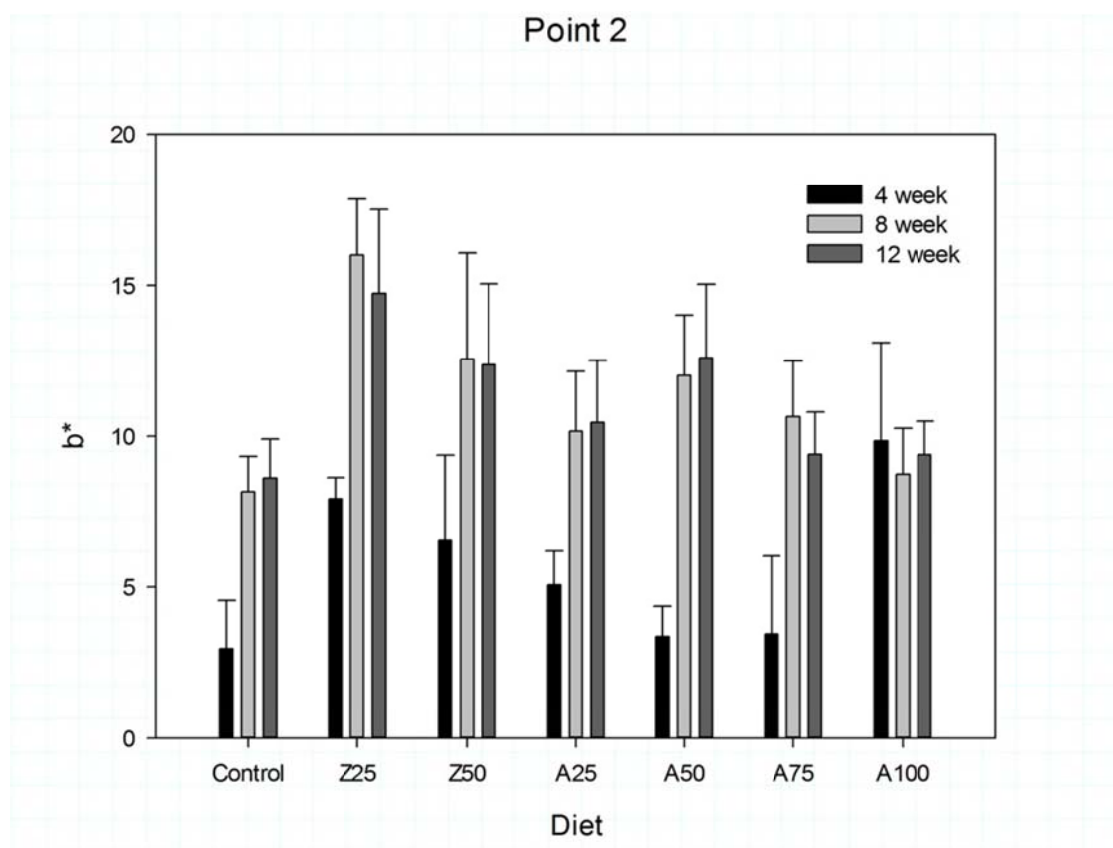


Fig.12 The integument color b*value (yellowness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the dorsal 2(point)

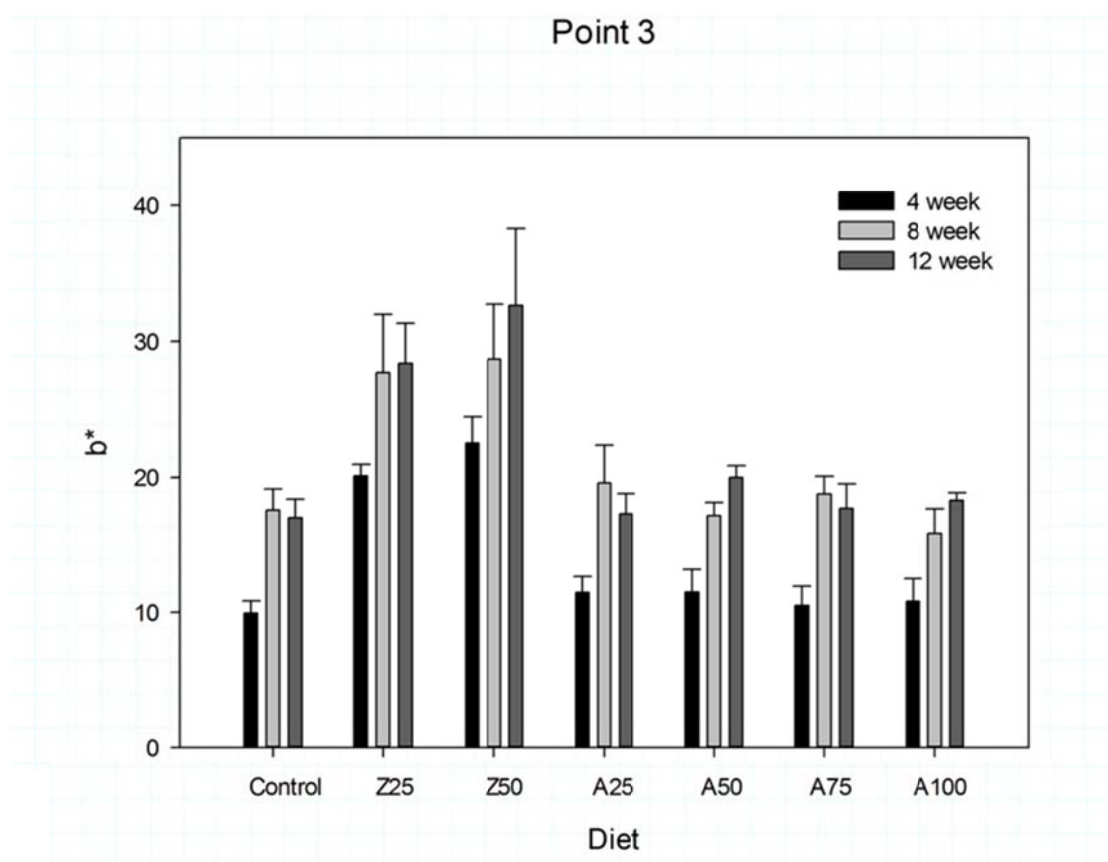


Fig.13 The integument color a*value (redness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the caudal fin(point 3)

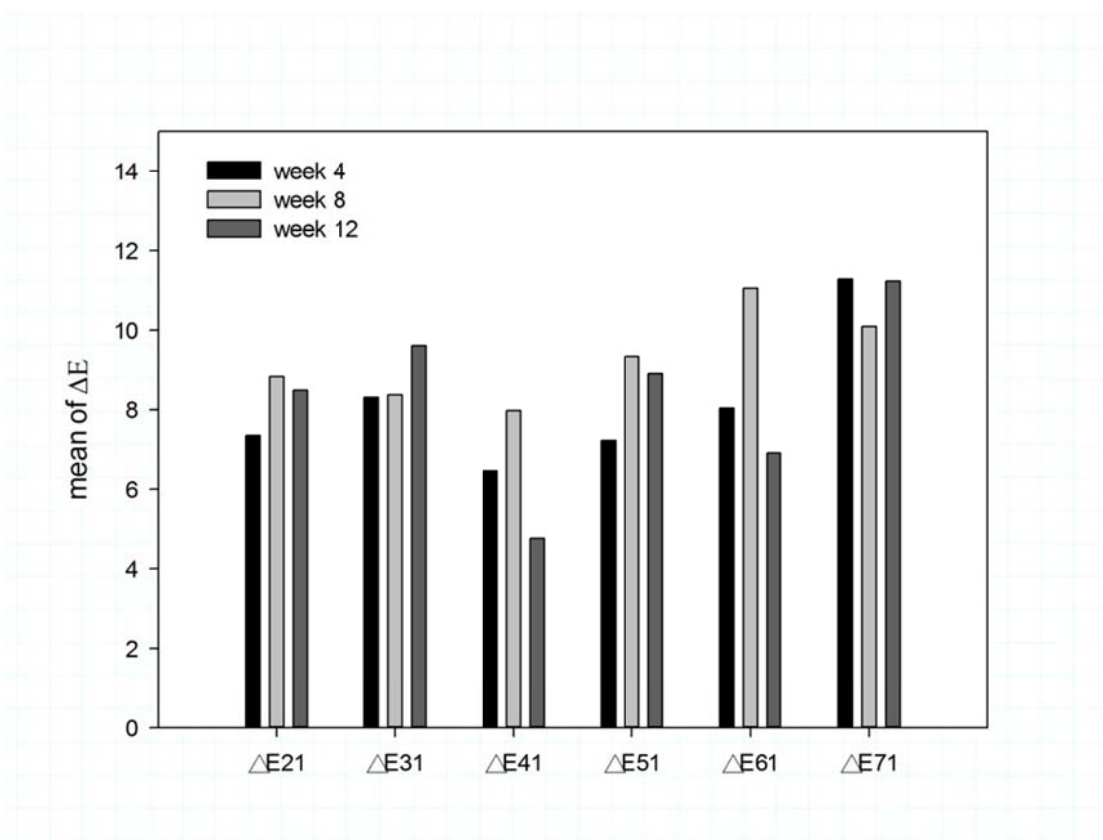


Fig.14 Comparisons on the body coloration (ΔE) of *Petenia splendida* fed on experimental diets with the control

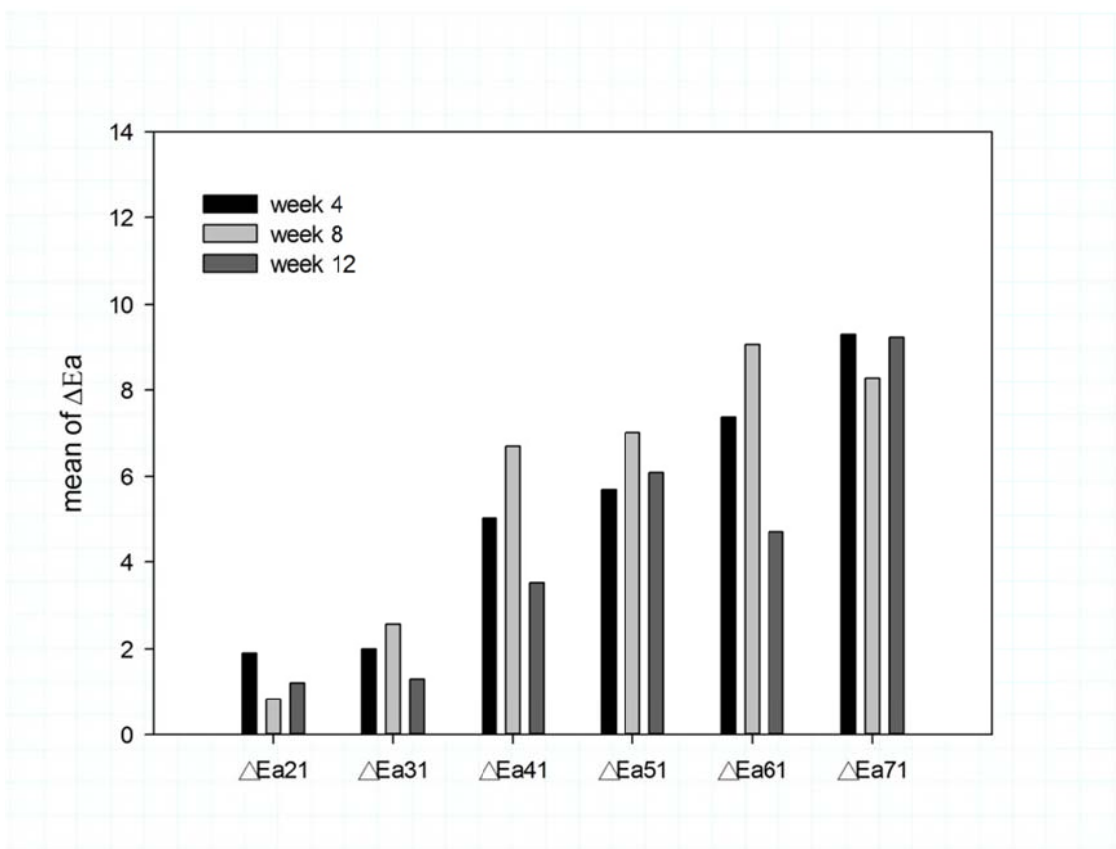


Fig.15 Comparisons on the body coloration redness (ΔE_a) of *Petenia splendida* fed on experimental diets with the control

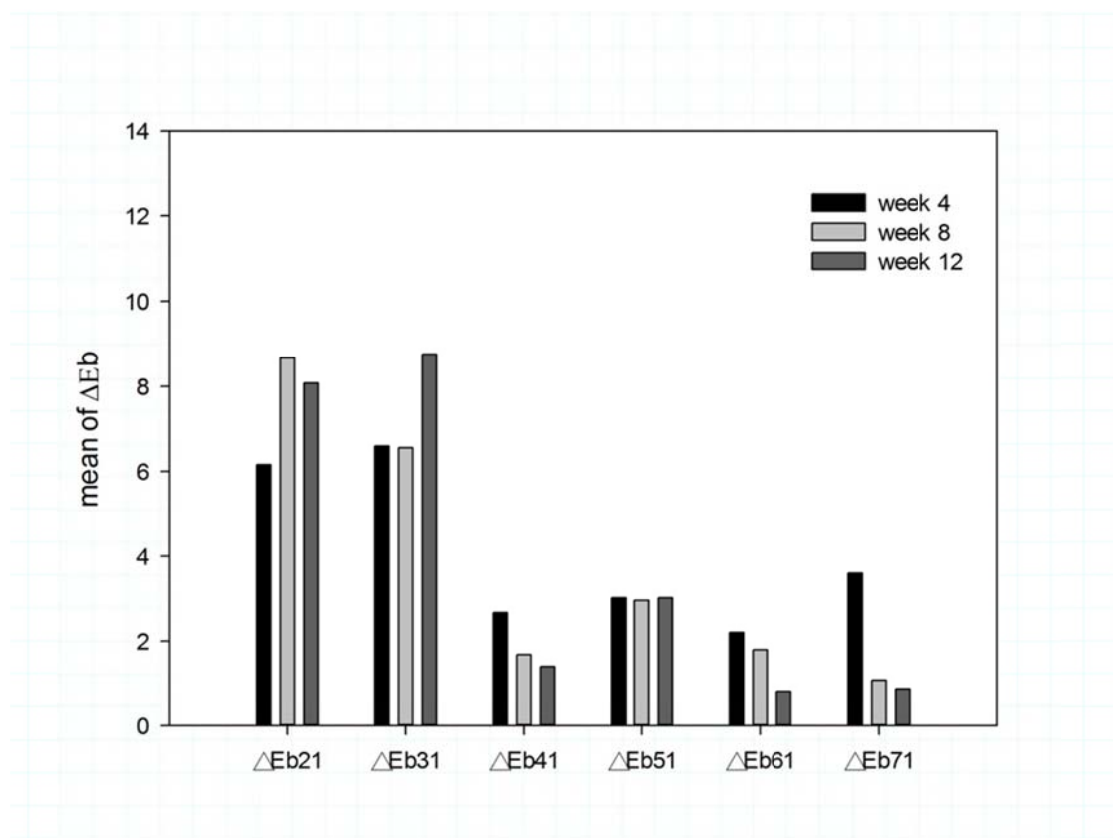


Fig.16 Comparisons on the body coloration yellowness (ΔEb) of *Petenia splendida* fed on experimental diets with the control

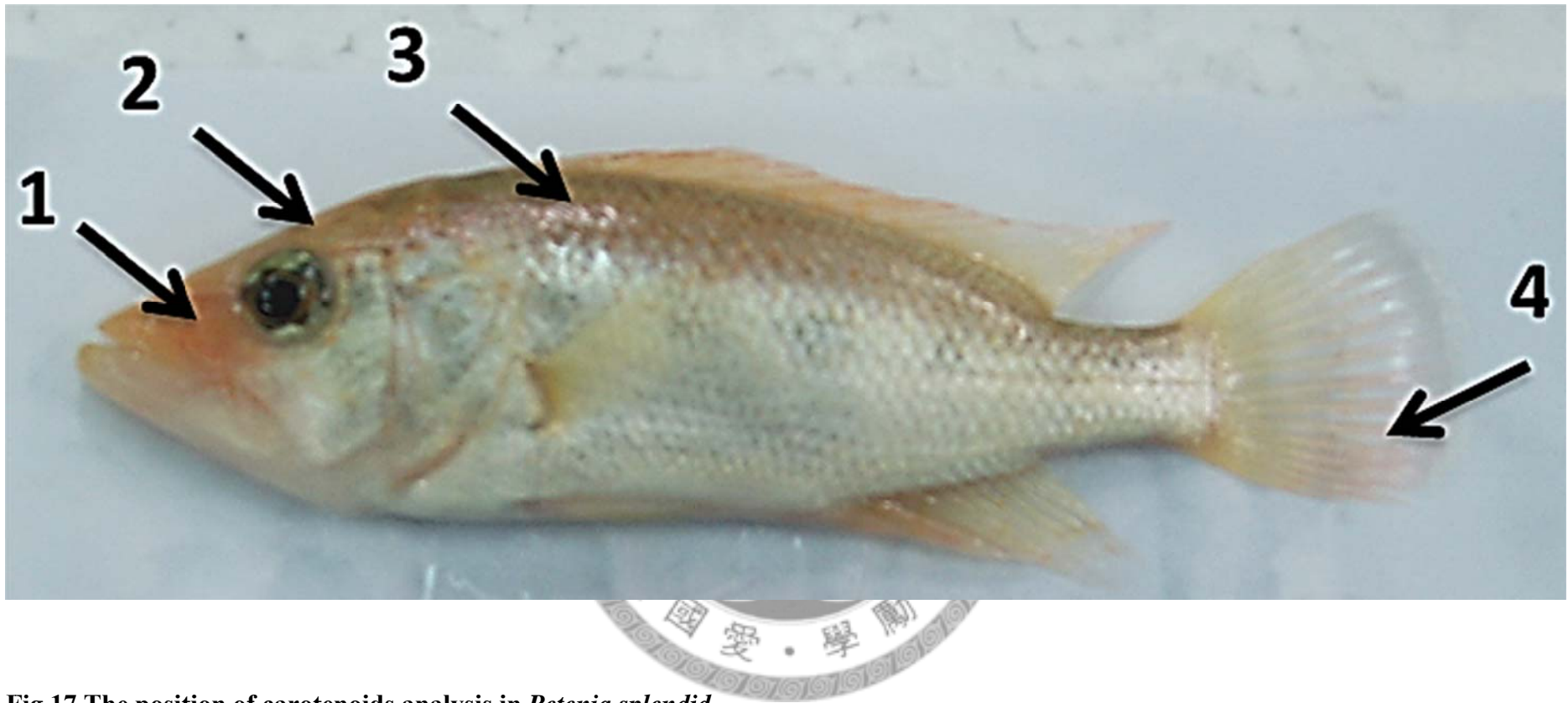


Fig.17 The position of carotenoids analysis in *Petenia splendid*

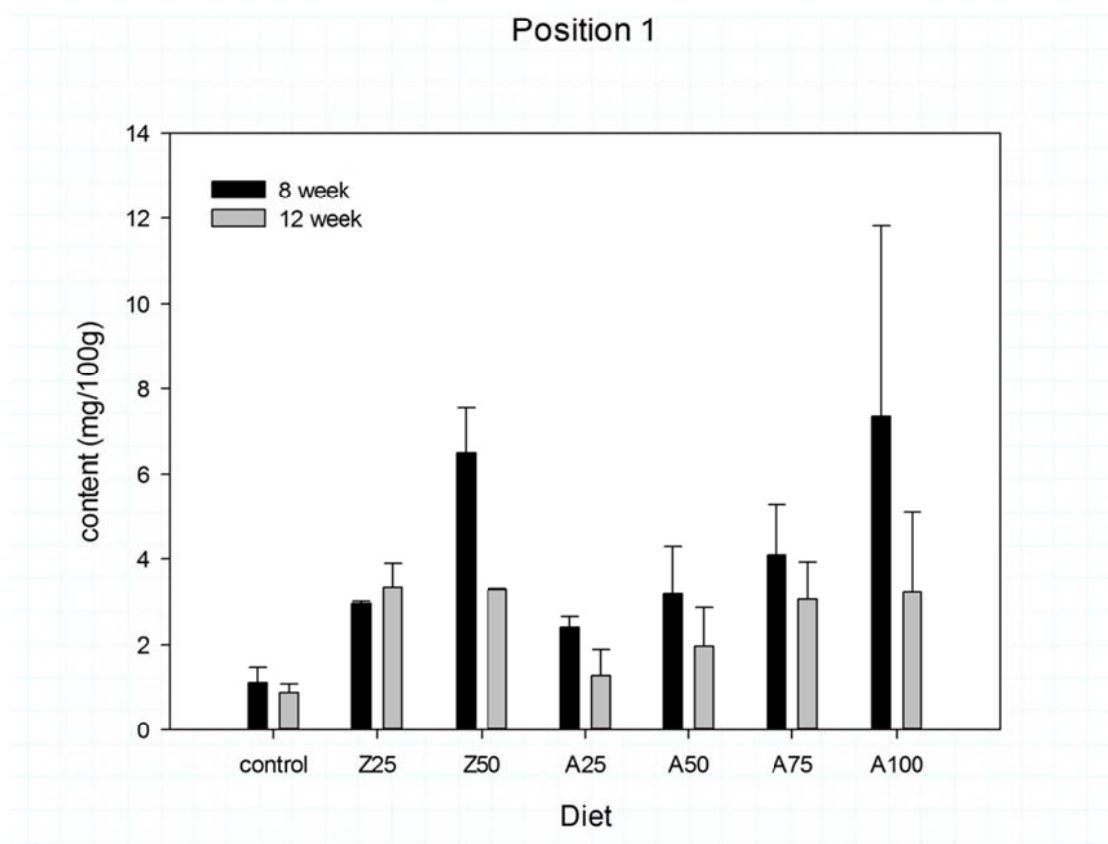


Fig.18 The integument carotenoids content of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the cheek (position 1)

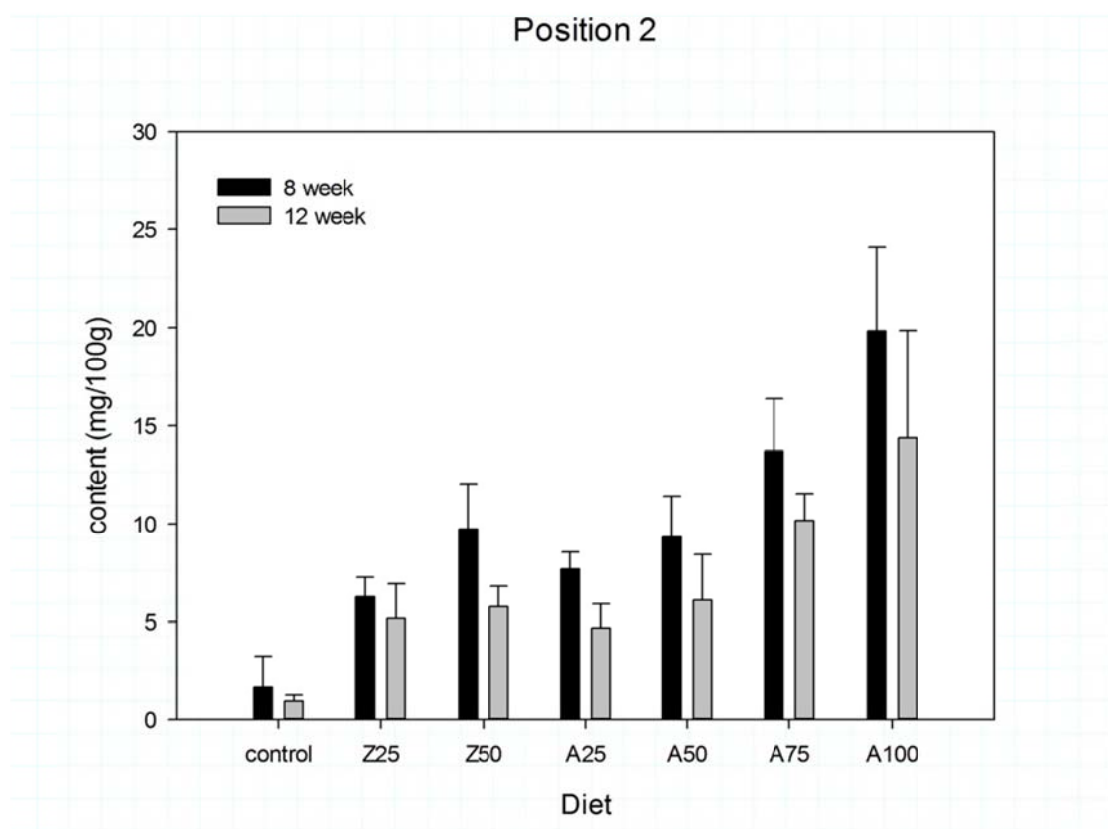


Fig.19 The integument carotenoids content of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the head (position 2)

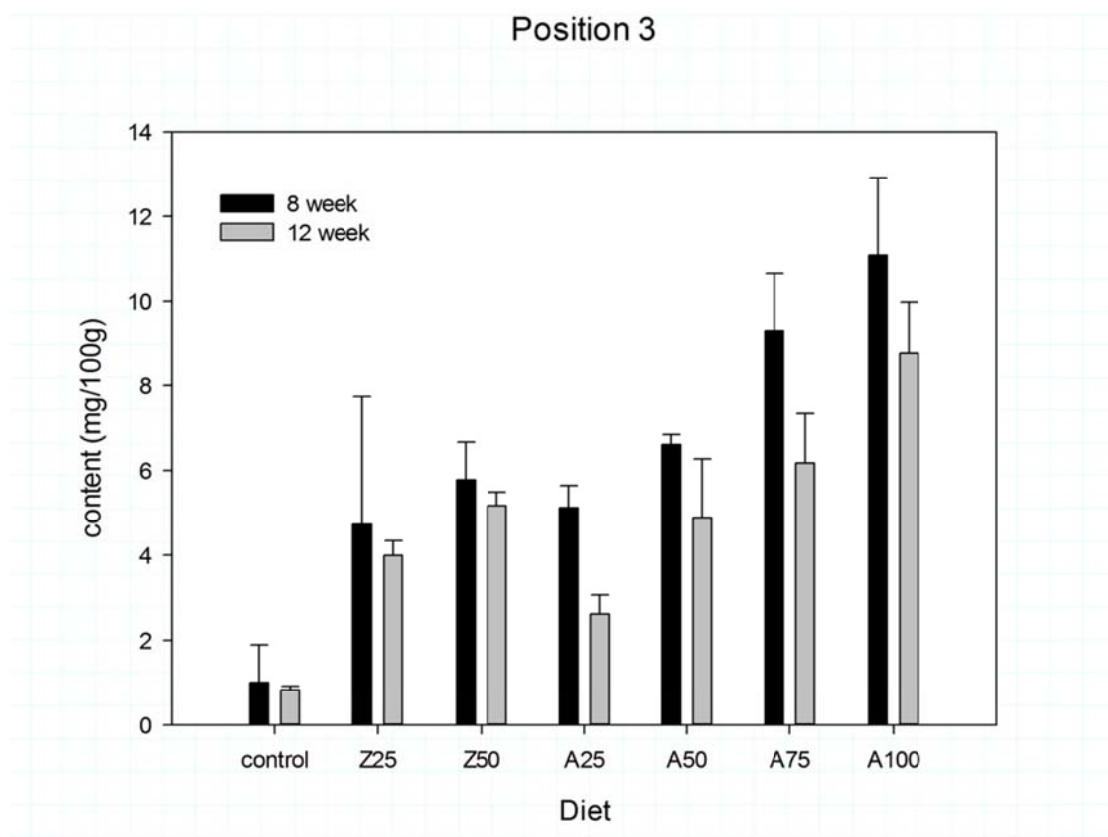


Fig.20 The integument carotenoids content of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the dorsal skin (position 3)

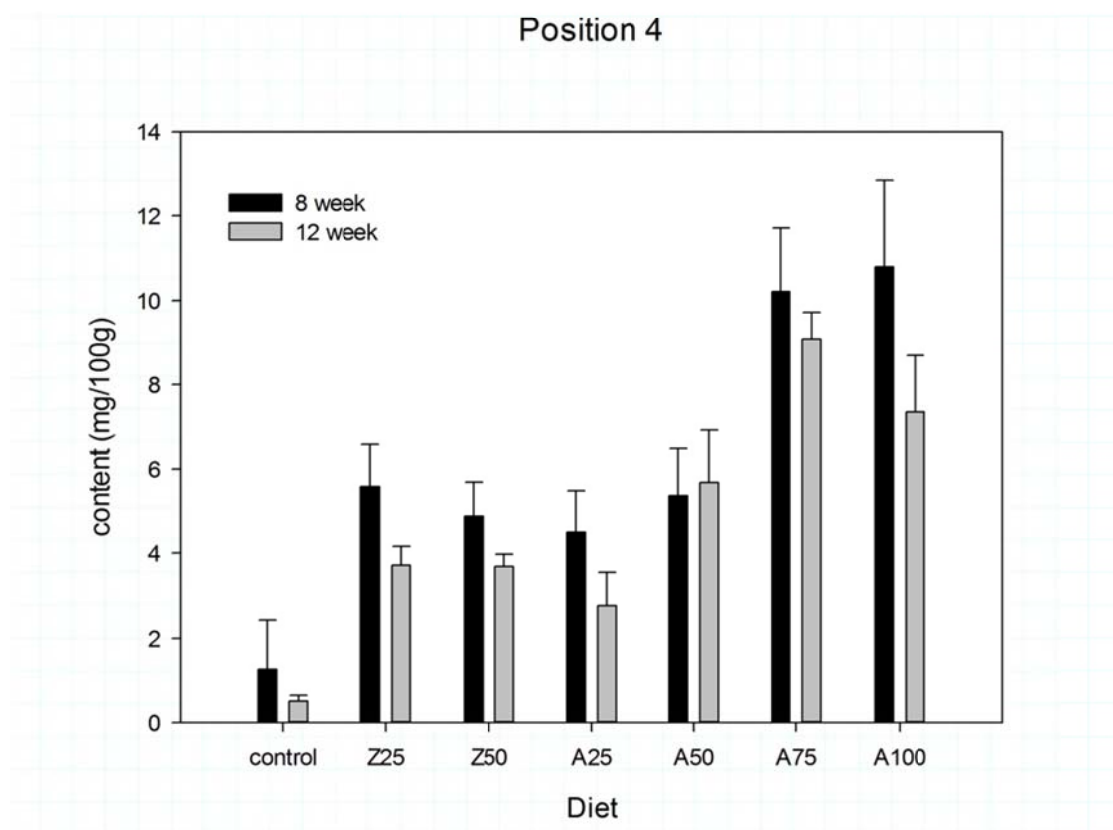


Fig.21 The integument carotenoids content of *Petenia splendida* fed on experimental diets in the caudal fin (position 4)

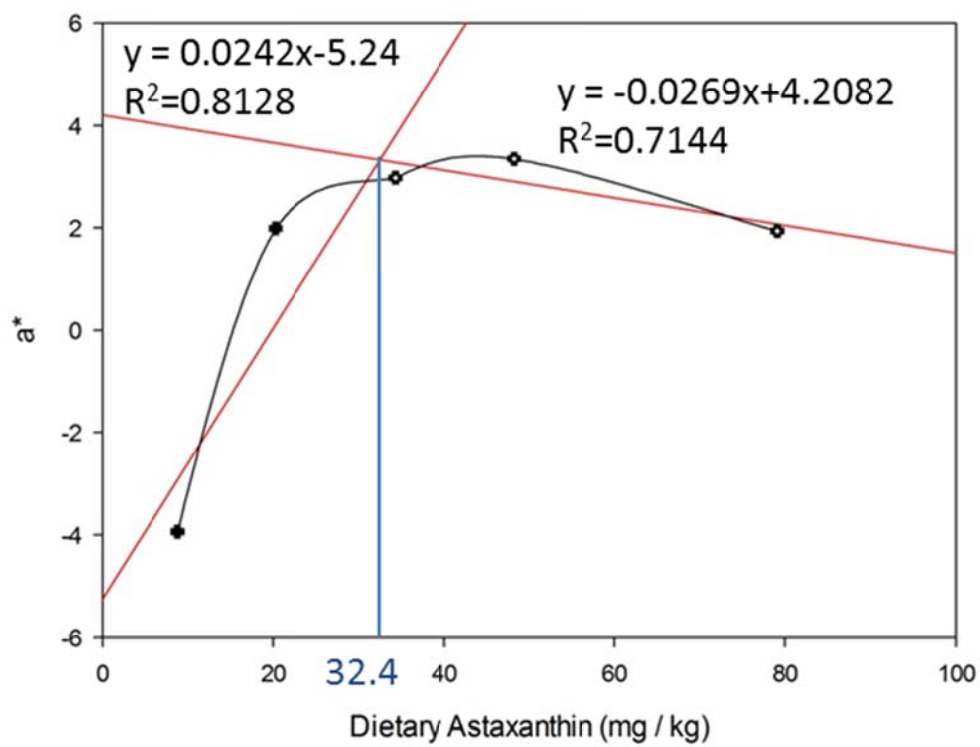


Fig.22 Broken-line analysis in integument color a*value (redness) of *Petenia splendida* fed on experimental diets contain astaxanthin

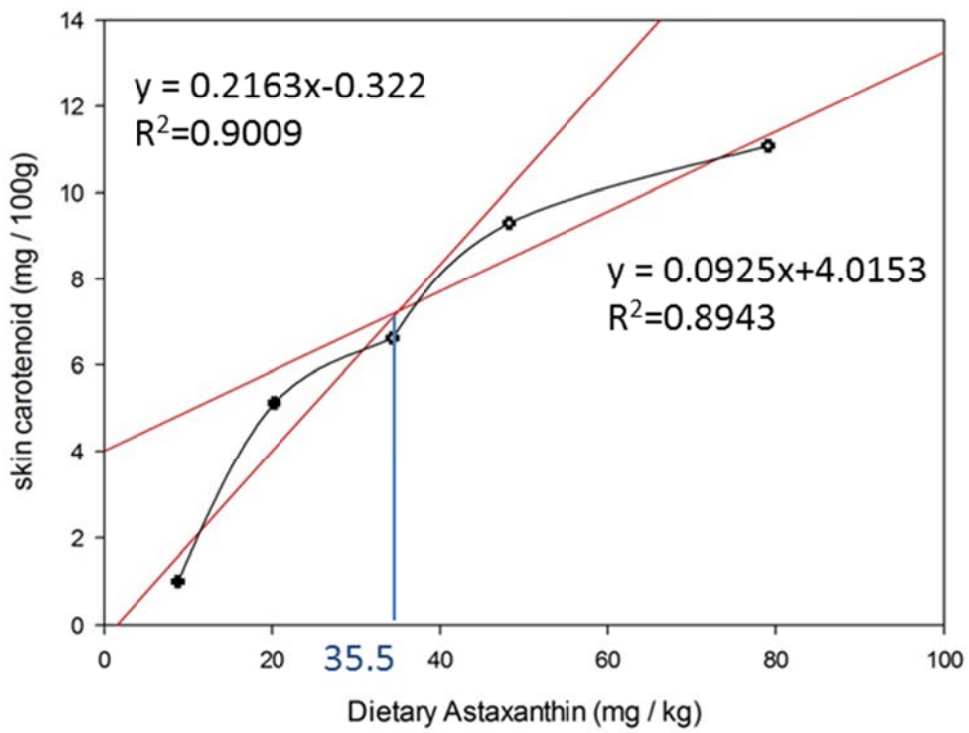


Fig.23 Broken-line analysis in integument carotenoids content of *Petenia splendida* fed on experimental diets contain astaxanthin