

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA ASTAXANTHIN TỪ COPEPODA TRONG VIỆC TĂNG CƯỜNG MÀU SẮC Ở CÁ KHOANG CỔ NEMO (*Amphiprion ocellaris*)

EVALUATING THE EFFICACY OF ASTAXANTHIN FROM COPEPODA IN ENHANCING COLORATION OF FALSE CLOWNFISH (*Amphiprion ocellaris*)

**Luong Thị Hậu¹, Nguyễn Thị Nhật Anh², Đặng Trung Thành³,
Đoàn Xuân Nam⁴, Trần Văn Dũng^{*}**

1. Trung tâm Thí nghiệm – Thực hành, Trường Đại học Nha Trang
 2. Học viên cao học ngành Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nha Trang
 3. Khoa Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang
 4. Viện Nuôi trồng Thủy sản, Trường Đại học Nha Trang
- *Tác giả liên hệ: Trần Văn Dũng (Email: dungtv@ntu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 25/09/2023; Ngày phản biện thông qua: 30/10/2023; Ngày duyệt đăng: 05/11/2023

TÓM TẮT

Trong nuôi cá cảnh nói chung, màu sắc đóng một vai trò rất quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến giá trị và sự chấp nhận của thị trường. Mặc dù đã đạt được thành công trong sản xuất giống nhiều loài trong giống cá khoang cổ nhưng màu sắc kém của nguồn cá này so với cá hoang dã là một trong những thách thức lớn hiện nay. Để giải quyết vấn đề này, chúng tôi sử dụng astaxanthin tách chiết từ Copepoda, loài *Pseudodiaptomus annandalei*, bổ sung vào thức ăn nhằm cải thiện màu sắc của cá khoang cổ nemo, *Amphiprion ocellaris*. Năm hàm lượng astaxanthin, 50 – 450 mg/kg thức ăn, và một nghiệm thức đối chứng đã được thử nghiệm. Cá được nuôi trong các bể kính, 60 lít/bể, với mật độ 15 con/bể. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lần lặp trong 75 ngày. Kết quả cho thấy các chỉ số đánh giá hiệu quả cải thiện màu sắc như a^* (xanh lá – đỏ), b^* (xanh dương – vàng), H°_{ab} (tông màu), C^*_{ab} (độ bão hòa màu), ΔE^* (khác biệt màu sắc tổng thể) và hàm lượng carotenoids tích lũy (da và cơ thịt) đạt được tốt hơn cùng với mức tăng của hàm lượng astaxanthin bổ sung ($P < 0,05$). Mức độ đỏ và hàm lượng carotenoids tích lũy trên da cá ở nghiệm thức 450 mg/kg đạt cao nhất, cao hơn lần lượt là 111% và 270% so với đối chứng. Nghiên cứu cung cấp một giải pháp hiệu quả nhằm cải thiện màu sắc của cá khoang cổ nemo, qua đó, góp phần nâng cao chất lượng con giống sản xuất đáp ứng nhu cầu thị trường.

Keywords: Astaxanthin, cá khoang cổ nemo, Copepoda, hàm lượng carotenoid tích lũy, màu sắc.

ABSTRACT

In ornamental fish farming, colouration plays a crucial role in determining the value and market acceptance of the fish. However, captive fish often have inferior colouration compared to their wild counterparts, posing a significant challenge. To address this issue, we conducted a study using astaxanthin extracted from Copepoda, *Pseudodiaptomus annandalei*, as a dietary supplement to enhance the colouration of captive clownfish, *Amphiprion ocellaris*. We tested five levels of astaxanthin supplementation, ranging from 50 - 450 mg/kg of feed, along with a control group. The fish were raised in glass tanks with 60 litres per tank, housing 15 individuals each. Each treatment was replicated three times over 75 days. The results demonstrated that the evaluated color improvement indices, such as a^* (green-red), b^* (blue-yellow), H°_{ab} (hue angle), C^*_{ab} (color saturation), ΔE^* (overall color difference), and the accumulation of carotenoids (in the skin and muscle), showed better outcomes with higher levels of supplemented astaxanthin ($P < 0.05$). The treatment with 450 mg/kg of astaxanthin exhibited the highest levels of redness and carotenoid accumulation on the fish skin, representing a respective increase of 111% and 270% compared to the control group. This study provides an effective solution for enhancing the coloration of clownfish species, thereby contributing to the improvement of breeding stock quality that meets market demands.

Keywords: Astaxanthin, accumulated carotenoid content, colouration, Copepoda, false clownfish.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghề nuôi cá cảnh biển đã thu hút được sự quan tâm của người chơi thủy sinh vật cảnh, các nhà nghiên cứu và bảo tồn trong vài thập kỷ trở lại đây [8]. Cá khoang cổ hay còn gọi là cá hề (giống *Amphiprion*, họ Pomacentridae), với khoảng hơn 30 loài, là nhóm cá được chú ý nhất nhờ khả năng thích nghi cao với điều kiện nuôi, và rất nhiều trong số đó đã được báo cáo sản xuất giống thành công [8, 9]. Cá khoang cổ nemo, *Amphiprion ocellaris*, là loài được ưa chuộng nhất bởi màu sắc đẹp, tập tính sống cộng sinh độc đáo với hải quỳ và hoạt động bơi vui nhộn [8, 11, 25]. Mặc dù đã đạt được thành công trong việc sản xuất giống nhiều loài trong giống cá khoang cổ [8, 9] nhưng một trong những thách thức lớn hiện nay là con giống sản xuất nhân tạo thường có màu sắc kém hơn nhiều so với nguồn cá tự nhiên. Các biểu hiện dễ nhận thấy thường là màu da nhợt nhạt, tối sạm và kém rực rỡ [8, 33], trong khi đó, màu sắc là một trong những tiêu chí quyết định giá trị cũng như khả năng chấp nhận của người tiêu dùng đối với một loài cá cảnh biển [12, 21, 24, 27]. Bất chấp những thành công trong sản xuất giống nhân tạo thời gian qua, màu sắc kém của nguồn cá này là nguyên nhân làm gia tăng trở lại áp lực khai thác lên nguồn lợi tự nhiên, gây cạn kiệt nguồn lợi và phá hủy hệ sinh thái rạn san hô, đặc biệt là khi sử dụng các biện pháp khai thác không bền vững [8, 25]. Do đó, việc tìm kiếm các giải pháp tăng cường màu sắc cho cá khoang cổ nói riêng và cá cảnh biển nói chung là hết sức cần thiết nhằm nâng cao giá trị và phát triển bền vững nghề nuôi thủy sinh vật cảnh biển này.

Màu sắc ở cá rất đa dạng và đảm nhiệm nhiều chức năng quan trọng với hoạt động sống của chúng [28]. Đối với cá cảnh, màu da còn có ý nghĩa tăng cường sự hấp dẫn giúp nâng cao giá trị trên thị trường [8]. Màu sắc hiển thị ở cá bị chi phối bởi nhiều yếu tố từ di truyền, kiểm soát thần kinh, nội tiết đến môi trường và dinh dưỡng [22]. Sự thay đổi màu sắc ở cá có thể tuân theo hai cơ chế, là hình thái và sinh lý, dưới tác động của nhiều yếu tố [28]. Dựa vào những hiểu biết đó, một số giải pháp đã được

ứng dụng vào sản xuất nhằm tăng cường màu sắc của cá và đã thu được những kết quả tích cực [19]. Trong đó, bổ sung dinh dưỡng là giải pháp được áp dụng phổ biến hơn cả nhờ đơn giản, hiệu quả và ít tác động tiêu cực đến đối tượng nuôi [6, 14]. Tuy nhiên, vấn đề là cần xác định được loại sắc tố và chế độ bổ sung (hàm lượng và thời gian) thích hợp. Carotenoids đã được sử dụng để tăng cường các màu sắc cam, đỏ và vàng ở nhiều loài cá, tôm [21, 27]. Trong số này, astaxanthin, sắc tố tự nhiên, hiện diện với hàm lượng cao ở các loài vi sinh vật và giáp xác [14], được chứng minh là vượt trội trong việc tăng cường màu sắc nhờ dễ tiêu hóa, hấp thu cùng nhiều lợi ích sức khỏe khác [14, 37]. Đáng chú ý, cá không có khả năng tự tổng hợp các sắc tố kể trên mà phải phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn cung từ thức ăn để đạt được màu sắc đặc trưng [27]. Thiếu hụt sắc tố trong khẩu phần ăn là nguyên nhân chính làm cá bị phai màu, nhợt nhạt hay tối sạm [19]. Bởi nhu cầu tăng cường màu sắc của cá nhằm thỏa mãn thị hiếu của người nuôi, các dạng carotenoids khác nhau, cả tự nhiên và tổng hợp, được sử dụng ngày càng phổ biến [14, 27]. Tuy nhiên, các carotenoids tổng hợp tồn tại nhiều nhược điểm như giá thành cao, hạn chế trong việc tiêu hóa, hấp thu, hiệu quả lên màu, thúc đẩy sức khỏe tổng thể bên cạnh những lo ngại về vấn đề an toàn [34]. Điều này đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu tìm kiếm và ứng dụng các nguồn carotenoids tự nhiên vốn có nhiều lợi ích sức khỏe, bên cạnh màu sắc, với đối tượng nuôi [21, 27].

Nguồn astaxanthin từ giáp xác nói chung, đặc biệt là từ các loài giáp xác chân chèo (Copepoda), đang ngày càng thu hút được sự quan tâm bởi tiềm năng lớn và sẵn có [14]. Tùy theo công nghệ tách chiết, loài, vùng phân bố cụ thể, hàm lượng carotenoids có thể đạt 1.220 mg/kg khối lượng khô (DW), dao động từ 0,14 – 17.200 mg/kg DW [36]. Nằm ở vùng nhiệt đới, Việt Nam có nguồn lợi Copepoda rất lớn, cả thành phần loài và sản lượng [1, 2]. Các loài Copepoda khác nhau, bao gồm *Pseudodiaptomus annandalei*, đã và đang được ứng dụng làm thức ăn sống trong ương nuôi

hiều loài cá biển [3, 17]. Ngoài carotenoids, Copepoda còn rất giàu các thành phần dinh dưỡng thiết yếu như axit béo không no, axit amin, vitamin C, E, và các chất chống oxy hóa [35]. Việc sử dụng Copepoda trong ương nuôi đã giúp nâng cao sinh trưởng, tỷ lệ sống, biến thái, giảm tỷ lệ dị hình và tăng cường màu sắc ở nhiều loài cá biển [20]. Tuy nhiên, việc sử dụng Copepoda tươi sống cũng tiềm ẩn nhiều nguy cơ gây suy giảm chất lượng nước và lây nhiễm mầm bệnh [5]. Đồng thời, con giống sản xuất nhân tạo có thể sử dụng không hiệu quả nguồn thức ăn này nếu không được tập cho ăn và cung cấp thường xuyên [10]. Ngoài ra, ở các giai đoạn sau của quá trình ương nuôi, kích cỡ nhỏ của loại thức ăn này có thể không còn phù hợp với cỡ miệng của nhiều loài cá [20]. Do đó, việc sử dụng Copepoda cho đối tượng nuôi trong nỗ lực tăng cường màu sắc và sức khỏe tổng thể thường gặp nhiều khó khăn. Việc tách chiết sắc tố từ loại giáp xác chân chèo này, dưới dạng bán tinh chất, tương tự cách làm với phụ phẩm chế biến tôm, bổ sung vào thức ăn có nhiều ưu điểm như dễ tiêu hóa, hấp thu, tiện lợi trong sử dụng và bảo quản [33]. Mặc dù vậy, cho đến nay, các nghiên cứu về vấn đề này trên cá biển, đặc biệt là nhóm cá khoang cổ, vẫn còn hết sức hạn chế. Nghiên cứu hiện tại được thực hiện nhằm xác định hàm lượng astaxanthin từ Copepoda thích hợp bổ sung vào thức ăn giúp tăng cường màu sắc da và hàm lượng carotenoids tích lũy ở cá khoang cổ nemo.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Tách chiết astaxanthin

Copepoda, loài *Pseudodiaptomus annandalei*, được thu từ các ao nuôi tại Cam Ranh, Khánh Hòa, sau đó, được vận chuyển về

phòng thí nghiệm, Trường Đại học Nha Trang. Nguyên liệu được rửa sạch, loại bỏ tạp chất, và bảo quản ở nhiệt độ âm 20°C. Dung môi sử dụng để tách chiết astaxanthin là cồn 96% với quy trình tách chiết được thực hiện theo Đặng Trung Thành và ctv. (2022) và Tran et al. (2022) [4, 33]. Theo đó, Copepoda tươi (100 g) được rửa đông, để ráo nước, xay nhuyễn bằng máy xay sinh tố. Tiếp theo, cồn được cho vào cốc với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 3,5/1,0, (v/w). Hỗn hợp được đưa vào lò vi sóng để tách chiết astaxanthin với thời gian 180 giây. Quá trình xử lý vi sóng được thực hiện gián đoạn, cứ 30 giây bật/tắt một lần, với tổng 3 lần chiết được thực hiện để tối ưu hóa hiệu quả [4]. Vải lọc được sử dụng để tách dịch chiết ra khỏi phần bã sau mỗi lần chiết. Dịch chiết gộp của 3 lần được loại bỏ cồn với máy cô quay chân không. Tiếp theo, 50 ml dầu đậu nành được thêm vào và tiếp tục cô để astaxanthin hòa tan vào dầu. Dầu astaxanthin sau đó được rửa sạch bằng nước nóng để loại bỏ cặn protein và tạp chất. Cuối cùng, hỗn hợp dầu chứa astaxanthin được thu và hàm lượng trong mẫu được xác định bằng máy đo UV-Vis ở bước sóng 487 nm. Hàm lượng astaxanthin thu được là 178,65 µg/g Copepoda tươi, và được sử dụng để bổ sung vào thức ăn cho cá.

2. Chuẩn bị thức ăn

Khẩu phần thức ăn cơ bản, bao gồm 55% protein thô và 9% lipid, được xây dựng theo nhu cầu thức ăn cho ương cá biển. Chi tiết thành phần, tỷ lệ, và hàm lượng được trình bày trong Bảng 1. Năm hàm lượng astaxanthin bổ sung gồm 50, 150, 250, 350 và 450 mg/kg thức ăn, và một nghiệm thức đối chứng không bổ sung được thử nghiệm (Bảng 1).

Bảng 1. Công thức và thành phần sinh hóa của thức ăn thí nghiệm

Thành phần (g/kg)	AC0	AC50	AC150	AC250	AC350	AC450
Bột cá Peru	396	396	396	396	396	396
Bột cá Việt Nam	160	160	160	160	160	160
Bột mực	160	160	160	160	160	160
Bột tôm	75	75	75	75	75	75
Bột đậu nành	70	70	70	70	70	70
Cám gạo	10	10	10	10	10	10

Thành phần (g/kg)	AC0	AC50	AC150	AC250	AC350	AC450
Bột gluten ngô	10	10	10	10	10	10
Bột mì	19	18,95	18,85	18,75	18,65	18,55
Casein	70	70	70	70	70	70
Dầu mực	5	5	5	5	5	5
Dầu đậu nành	5	5	5	5	5	5
Vitamin tổng hợp	10	10	10	10	10	10
Polymethylcarbamide	5	5	5	5	5	5
Khoáng tổng hợp	5	5	5	5	5	5
Astaxanthin từ Copepoda	0	0,05	0,15	0,25	0,35	0,45
Thành phần sinh hóa gần đúng (%)						
Protein thô	55,08	55,05	55,11	55,09	54,99	55,13
Lipid thô	9,10	9,12	9,13	9,15	9,17	9,09
Tro	11,17	11,08	11,12	11,15	11,22	11,31
Độ ẩm	10,24	10,17	10,14	10,21	10,24	10,19
Astaxanthin	0,008	0,059	0,161	0,260	0,359	0,462

Quy trình sản xuất thức ăn của chúng tôi tuân theo phương pháp của Ebeneazar et al. (2020) và Tran et al. (2022) [13, 33] cùng với một số điều chỉnh nhỏ. Theo đó, các thành phần nguyên liệu protein (bột cá, tôm, mực...) và năng lượng (bột gạo, bột mì...) được cân theo công thức (Bảng 1), nghiền mịn và trộn đều trong máy trộn thực phẩm. Sau khi trộn và thêm nước, hỗn hợp bột thức ăn này được nấu trong nồi áp suất trong khoảng 20 phút. Sau khi nấu và làm nguội bột, hỗn hợp dầu astaxanthin (tương ứng với từng nghiệm thức thí nghiệm) và vitamin tổng hợp được thêm vào và trộn đều. Tiếp theo, hỗn hợp thức ăn được đùn qua máy ép viên có đường kính mắt sàng 2,0 mm. Thức ăn sau đó được sấy khô ở 60°C trong 18 giờ trong lò sấy không khí nóng. Thức ăn này được nghiền vụn, sàng qua mắt lưới để thu được các viên thức ăn có cỡ hạt khoảng 0,8 – 1,0 mm. Cuối cùng, thức ăn được đóng gói trong hộp nhựa kín khí, bọc bằng túi bóng đen và bảo quản trong ngăn đông tủ lạnh (-4°C) sử dụng dần. Các thông số sinh hóa gần đúng của các mẫu thức ăn thí nghiệm, bao gồm hàm lượng protein thô, lipid thô, tro, và độ ẩm được phân tích theo phương pháp của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thức [7], và thông tin chi tiết được trình bày trong Bảng 1.

3. Nguồn cá, hệ thống nuôi và chăm sóc

Nguồn cá: Cá khoang cổ nemo, là nguồn sản xuất giống nhân tạo tại Trại sản xuất giống cá cảnh biển Vĩnh Hòa, được sử dụng cho thí nghiệm. Cá đưa vào thí nghiệm có kích thước đồng đều, chiều dài toàn thân là $3,20 \pm 0,04$ cm và $0,62 \pm 0,05$ g/con. Cá được thả với mật độ 15 con/bể hay 4 lít nước mỗi con. Cá được nuôi trong hệ thống bể trong 7 ngày để làm quen với hệ thống bể thí nghiệm trước khi bắt đầu tính thời gian.

Hệ thống bể: Hệ thống bể nuôi gồm 18 bể kính có thể tích khoảng 60 lít/bể. Nguồn nước biển được bơm, xử lý theo quy trình phổ biến, hiện hành trước khi cấp cho hệ thống thí nghiệm. Nước được cấp vào ở tầng mặt, kiểm soát bằng van để đảm bảo tương đối đồng đều giữa các bể. Nước thoát ra ở đầu đối diện, chảy trực tiếp vào một bể lọc sinh học (500 lít) nằm giữa hệ thống. Tại đây, nước được loại bỏ chất thải rắn nhờ bông lọc và xử lý bởi vi sinh vật sống trên bề mặt giá thể là các hạt nhựa bioball và đá san hô. Nước sau khi xử lý được bơm tuần hoàn trở lại các bể nuôi. Toàn bộ các bể được duy trì chế độ sục khí 24/24 giờ trong suốt thời gian thí nghiệm. Lưu lượng nước cấp vào và thoát ra khỏi bể được giữ ổn định khoảng 1,5 lít/phút/bể. Hệ thống bể thí nghiệm được

đặt dưới mái che, chế độ chiếu sáng tự nhiên.

Chăm sóc và quản lý: Cá được cho ăn với tần suất 4 lần/ngày vào các thời điểm 07h00, 10h00, 13h00 và 16h00. Cá được cho ăn theo nhu cầu, kết hợp với quan sát để điều chỉnh lượng thức ăn hợp lý. Sau 30 phút, lượng thức ăn dư nếu có được siphon vào chậu nhựa trước khi được thu lại bằng pipet nhựa và lưu trữ trong ngăn đông tủ lạnh. Lượng thức ăn này được sấy khô về độ ẩm 10% để tính toán hiệu quả sử dụng thức ăn vào cuối thí nghiệm. Bể nuôi được siphon loại bỏ phân, chất thải 2 lần/ngày (6h30 và 17h00). Nước được thay định kỳ 1 lần/tuần với lượng bằng 30 - 50% tổng thể tích bể. Các thông số môi trường nước được theo dõi và duy trì trong phạm vi thích hợp với sinh trưởng, phát triển của cá khoang cổ nemo. Cụ thể, nhiệt độ dao động từ 27 - 31°C, độ mặn từ 32 - 34‰, pH từ 7,8 - 8,2, hàm lượng oxy hòa tan > 5,0 mg/L, hàm lượng TAN ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) < 1,0 mg/L. Bể nuôi, hoạt động của cá, cá chết nếu có được quan sát và ghi chép hàng ngày để tổng hợp vào cuối thí nghiệm.

4. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn để đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung astaxanthin tách chiết từ Copepoda vào thức ăn lên màu sắc da và hàm lượng carotenoids tích lũy ở cá khoang cổ nemo. Sáu nghiệm thức bổ sung astaxanthin được thử nghiệm, gồm 0 (đối chứng), 50, 150, 250, 350 và 450 mg/kg thức ăn. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lần lặp trong thời gian 75 ngày.

Vào ngày cuối thí nghiệm, toàn bộ số cá trong bể được thu để đo lường các thông số màu sắc da (L^* , a^* , b^* , H_{ab}° , C_{ab}^*) và hàm lượng carotenoids tích lũy (da và cơ thịt) và so sánh giữa các nghiệm thức thí nghiệm. Việc thu mẫu cá được áp dụng với toàn bộ số lượng cá còn sống ở thời điểm kết thúc thí nghiệm. Trước khi thu mẫu, cá được bỏ đói 24 giờ để loại bỏ hết phân, chất thải, và gây mê bằng 0,05% EGME (Ethylene Glycol Monophenyl Ether) trong khoảng thời gian 15 - 20 giây. Cá được thấm khô bằng giấy vệ sinh trước khi tiến hành xác định các thông số màu sắc da. Sau đó, các mẫu cá được bảo quản ở nhiệt độ âm 80°C để thực

hiện các phân tích về hàm lượng carotenoids tích lũy trong phòng thí nghiệm.

5. Phương pháp đánh giá màu sắc cá

Màu sắc của cá được xác định thông qua hai phương pháp gồm đo màu trực tiếp trên da và phân tích hàm lượng carotenoids tổng số tích lũy trong cơ thể cá.

5.1. Cường độ màu sắc da cá

Toàn bộ cá tại thời điểm kết thúc thí nghiệm được đo màu bằng máy đo kỹ thuật số CR-400 (Konica, Japan). Cá được đo màu ở cả hai bên thân, tại vị trí giữa vây lưng mềm và vây hậu môn tiếp giáp với dải giữa màu trắng của cá. Mỗi vị trí được đo ba lần để xác định giá trị trung bình gồm L^* , a^* và b^* của mỗi cá thể. Máy đo CR - 400 được thiết lập để thực hiện các phép đo màu tuyệt đối ở chế độ đo L^* , a^* và b^* (CIE 1976) bằng cách sử dụng đèn chiếu sáng D65 gắn với một ống chiếu sáng bằng thủy tinh (CR-A33F) kết nối với máy tính. Phương pháp đo, chế độ cài đặt và điều kiện đo được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Hệ thống đo màu CR-400 được thiết kế bởi CUE (International Committee on Illumination) sử dụng L^* để đo độ sáng - tối, với phạm vi từ tối (0) tới sáng (100); a^* để đo các sắc tố màu xanh lá tới đỏ, với màu xanh lá cây (a^-) tới màu đỏ (a^+); và b^* để đo các sắc tố màu xanh dương tới vàng, với màu xanh dương (b^-) tới màu vàng (b^+) [16].

Để đánh giá tác động của astaxanthin bổ sung lên màu da của cá khoang cổ nemo, giá trị màu sắc tổng thể trung bình (L^* , a^* , b^*) của cá ở nhóm xử lý được so sánh với nhóm đối chứng. Dữ liệu so sánh là sự khác biệt về màu sắc tổng thể (ΔE^*), xác định bởi Ủy ban Chiếu sáng Quốc tế (CIE 1976), được áp dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về đo lường và so sánh màu sắc thực phẩm. Theo đó, giá trị ΔE^* giữa nhóm cá đối chứng (L_1^* , a_1^* , b_1^*) và nhóm xử lý (L_2^* , a_2^* , b_2^*) được tính theo công thức $\Delta E^* = [(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]^{1/2}$. Bên cạnh đó, các thông số đo lường màu sắc khác gồm góc độ màu hay tông màu (hue angle, H_{ab}°) và độ bão hòa hay độ tinh khiết của màu (chroma, C_{ab}^*) của mỗi cá thể cũng được sử dụng để đánh giá màu sắc giữa các nghiệm thức. Các giá trị H_{ab}°

và C_{ab}^* được xác định theo công thức lần lượt là $H_{ab}^0 = \arctan(b^*/a^*)$ và $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ [32].

5.2. Hàm lượng carotenoids tích lũy trong cơ thể cá

Hàm lượng carotenoids tổng số trong cơ thể cá (da và cơ thịt) và hàm lượng astaxanthin trong mẫu Copepoda và thức ăn sau khi chế biến được xác định bằng máy đo quang phổ UV-Vis (UV-visible spectrophotometer) theo phương pháp mô tả bởi Ramamoorthy et al. (2010) [26] cùng một số điều chỉnh nhỏ. Một cách ngắn gọn, các mẫu thu thập phục vụ phân tích gồm: da (0,25 g/mẫu, được thu thập từ cả hai bên thân cá), cơ thịt (0,25 g/mẫu, phần cơ thịt cá sau khi đã tách da), và thức ăn (1,0 g/mẫu). Các mẫu được nghiền trong axeton (20 ml) có chứa 1,5 g Na_2SO_4 khan bằng thiết bị đồng hóa mẫu (Ultra-turrax®, IKA, Đức). Sau đó, mẫu được lọc bằng giấy lọc, và quá trình này được lặp lại 3 lần cho đến khi dịch lọc trở nên không màu. Dịch lọc sau đó được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 7 phút để thu phần nổi ở phía trên và giữ ở nhiệt độ 4°C. Độ hấp thụ của dịch chiết chứa carotenoids được đo bằng máy đo quang phổ (Biochrom Ltd, Cambridge, Anh). Kết quả được biểu thị bằng số microgam carotenoids (hoặc astaxanthin) trên một gam mẫu ($\mu\text{g/g}$) và được tính bằng công thức sau.

Hàm lượng carotenoids tổng số (TAC) ($\mu\text{g/g}$) = $A \times V \times D \times 10^4 / (W \times E_{1\text{cm}}^{1\%})$

Trong đó: A là độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 450 nm; V là tổng thể tích của dịch chiết (ml); D là tỷ lệ pha loãng; W là khối lượng của mẫu (g); và $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ là hệ số sắc tố quang của dầu (dung môi dầu đậu nành có hệ số E là 2.145).

Hàm lượng astaxanthin trong mẫu Copepoda (Mục II.1) và mẫu thức ăn sau khi chế biến (Bảng 1) cũng được xác định theo công thức trên, tuy nhiên, độ hấp thụ (A) của dung dịch chứa astaxanthin được đo ở bước sóng 487 nm.

6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu sau khi thu được tính toán trên phần mềm Microsoft Excel 2021. Trước khi phân tích thống kê, dữ liệu được kiểm tra phân phối chuẩn và tính đồng nhất phương sai trên

phần mềm SPSS 22.0. Tiếp theo, phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (oneway – ANOVA) và phép kiểm định Duncan được sử dụng để phân tích, so sánh kết quả trung bình giữa các nghiệm thức. Sự khác biệt thống kê được xác định ở mức ý nghĩa $P < 0,05$. Dữ liệu được trình bày dưới dạng Trung bình \pm Sai số chuẩn (SE).

III. KẾT QUẢ

1. Kết quả

1.1. Màu sắc da cá

1.1.1. Chỉ số L^* , a^* và b^*

Các thông số đo lường màu sắc da cá khoang cổ nemo ở các mức bổ sung astaxanthin khác nhau được minh họa trên Hình 1. Nhìn chung, hàm lượng astaxanthin bổ sung vào thức ăn có tác động đáng kể lên màu sắc da cá, cụ thể như sau:

Chỉ tiêu a^* (xanh lá – đỏ):

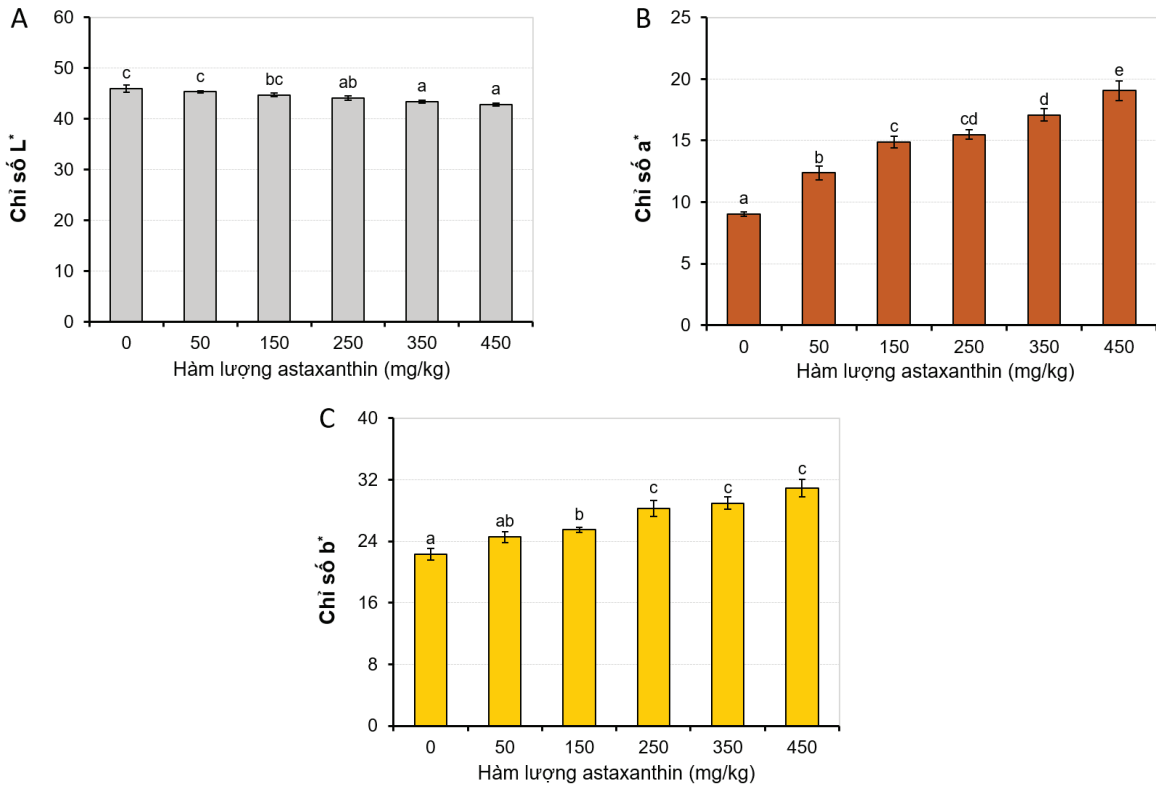
Kết quả cho thấy giá trị a^* ở các nghiệm thức bổ sung tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng astaxanthin trong thức ăn, và đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (Hình 1B). Giá a^* cao nhất đạt được ở mức bổ sung 450 mg/kg thức ăn ($19,06 \pm 0,79$), tiếp theo là mức bổ sung 350 và 250 mg/kg (lần lượt là $17,09 \pm 0,52$ và $15,49 \pm 0,39$), và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng ($9,03 \pm 0,20$; $P < 0,05$; Hình 1B). Việc bổ sung astaxanthin ở mức cao nhất, 450 mg/kg thức ăn, đã tăng cường màu sắc cam – đỏ của da cá lên tới 111% so với nghiệm thức đối chứng.

Chỉ tiêu b^* (xanh dương - vàng):

Giá trị b^* đạt được cũng có sự gia tăng tuyến tính với hàm lượng astaxanthin bổ sung vào thức ăn. Trong đó, các giá trị cao nhất cùng đạt được ở các mức bổ sung từ 250 – 450 mg/kg thức ăn (dao động từ 28,26 – 30,94) trong khi giá trị ở nghiệm thức đối chứng chỉ đạt 22,31 ($P < 0,05$). Mức độ cải thiện màu vàng trên da cá ở nhóm bổ sung 250 – 450 mg/kg được ước tính cao hơn 26,7 – 38,7% so với đối chứng ($P < 0,05$; Hình 1C).

Chỉ tiêu L^* (tối - sáng):

Giá trị L^* thu được cho thấy xu hướng khác với giá trị a^* và b^* . Nhìn chung, giá trị L^* có xu hướng giảm dần cùng với mức tăng



Hình 1. Chỉ số L* (A), chỉ số a* (B), và chỉ số b* (C) của cá khoang cỡ nemo được cho ăn thức ăn có hàm lượng astaxanthin khác nhau.

Các ký tự chữ cái khác nhau trên các cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

của hàm lượng astaxanthin bổ sung. Giá trị L^* của nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung 50 mg/kg thức ăn đạt cao nhất (lần lượt là $45,96 \pm 0,66$ và $45,34 \pm 0,20$), tiếp theo là các mức bổ sung 150 – 250 mg/kg (từ $44,06 - 44,72$) và thấp nhất ở nghiệm thức 350 – 450 mg/kg thức ăn (từ $42,81 - 43,41$; $P < 0,05$; Hình 1A). Điều này cho thấy rằng việc tăng hàm lượng astaxanthin bổ sung vào thức ăn cho cá một mặt giúp tăng màu đỏ - vàng nhưng mặt khác lại làm da cá trở nên tối màu hơn so với đối chứng.

1.1.2. Chỉ số Hue, Chroma và khác biệt màu sắc

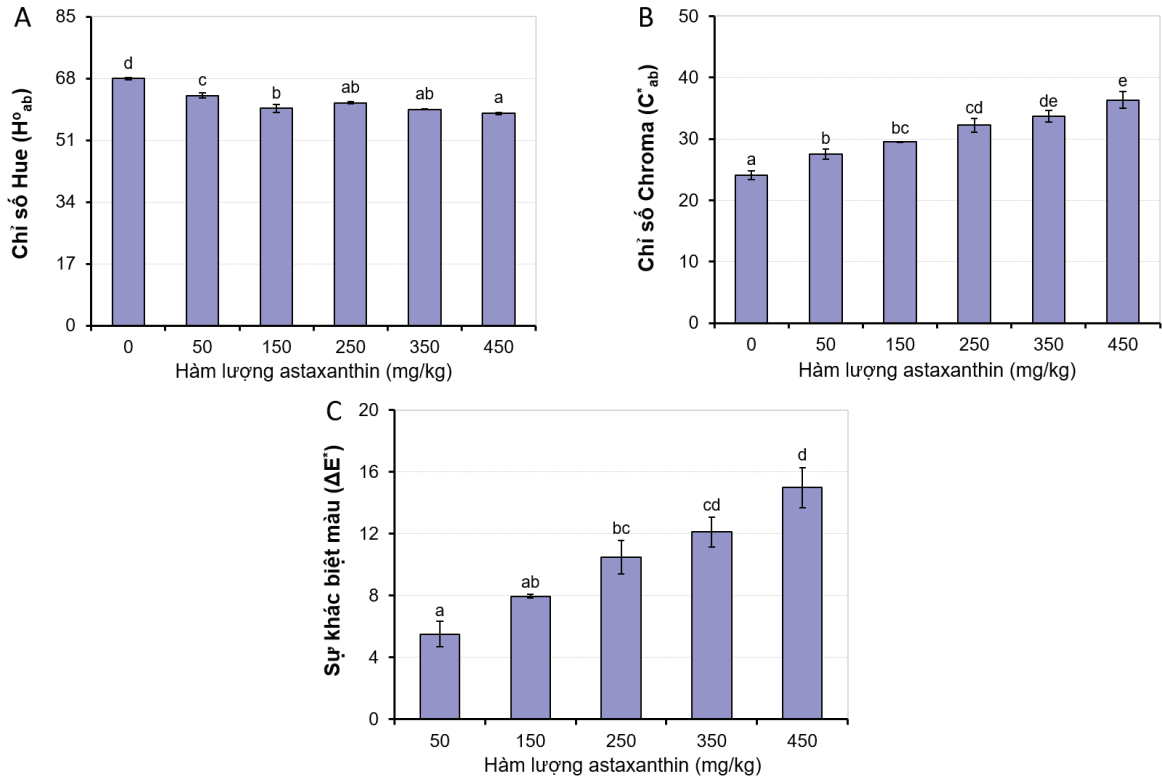
Các giá trị đo lường màu sắc còn lại gồm Hue, Chroma và sự khác biệt màu (ΔE^*) cũng thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức thí nghiệm (Hình 2).

Nhìn chung, giá trị tông màu (H^o_{ab}) có xu hướng giảm dần trong khi độ bão hòa màu (C^*_{ab}) lại tăng dần cùng với mức tăng của hàm

lượng astaxanthin bổ sung. Cụ thể, giá trị H^o_{ab} đạt được cao nhất ở đối chứng trong khi thấp nhất ở các mức bổ sung 250 – 450 mg/kg thức ăn (lần lượt là 67,0 so với $58,36 - 61,25$) ($P < 0,05$; Hình 2A). Ngược lại, giá trị C^*_{ab} đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 350 – 450 mg/kg thức ăn và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng (lần lượt là $33,63 - 36,34$ so với 24,07) ($P < 0,05$; Hình 2B).

Giá trị ΔE^* , thước đo sự khác biệt về màu sắc giữa nghiệm thức bổ sung và đối chứng, cũng cho thấy sự khác biệt đáng kể. Hàm lượng astaxanthin bổ sung càng tăng, sự khác biệt màu sắc tổng thể của da cá so với đối chứng càng rõ rệt. Giá trị ΔE^* đạt được cao nhất ở nghiệm thức 450 mg/kg trong khi thấp nhất ở mức bổ sung 50 mg/kg thức ăn, lần lượt là $15,00 \pm 1,29$ so với $5,51 \pm 0,82$ ($P < 0,05$; Hình 2C).

Tóm lại, sự kết hợp giữa các chỉ tiêu đo lường màu sắc da cá, bao gồm L^* , a^* , b^* , H^o_{ab} ,



Hình 2. Góc màu H°_{ab} (A), độ bão hòa màu C^*_{ab} (B), và sự khác biệt màu sắc ΔE^* (C) của cá khoang cổ nemo được cho ăn thức ăn có hàm lượng astaxanthin khác nhau.

Các ký tự chữ cái khác nhau trên các cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

C^*_{ab} và ΔE^* , đã cho thấy tác động tích cực của việc bổ sung astaxanthin vào chế độ cho ăn đối với sự tăng cường màu sắc da của cá khoang cổ nemo. Trong đó, hiệu suất màu sắc gia tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng astaxanthin bổ sung, và giá trị tốt nhất được xác định ở mức bổ sung 450 mg/kg thức ăn. Điều này đã khẳng định tiềm năng của nguồn astaxanthin tách chiết từ Copepoda trong việc cải thiện màu sắc ở loài cá cảnh biển này.

1.2. Hàm lượng carotenoids tổng số tích lũy

1.2.1. Trên da

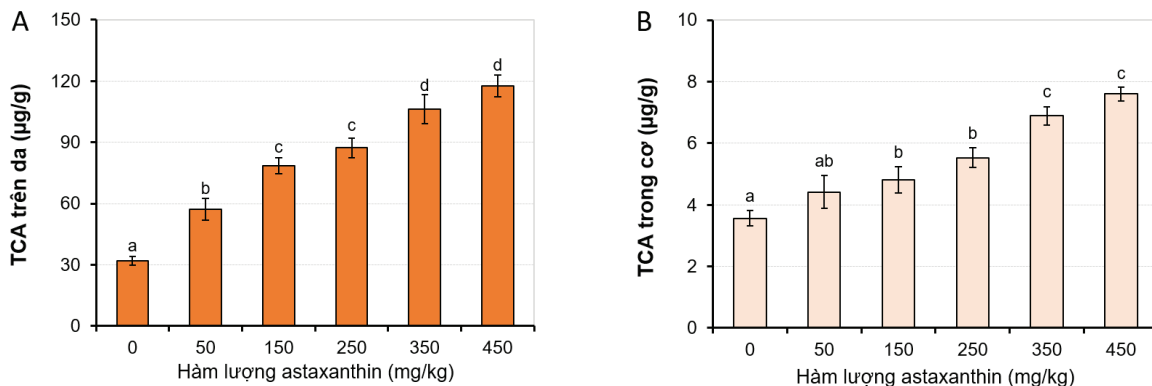
Hàm lượng carotenoids tổng số tích lũy trên da cá khoang cổ nemo ở các chế độ cho ăn khác nhau được minh họa trên Hình 3A. Kết quả cho thấy hàm lượng carotenoids có sự gia tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng astaxanthin bổ sung. Các giá trị cao nhất cùng đạt được ở mức bổ sung 350 – 450 mg/kg thức ăn (106,26 – 117,70 $\mu\text{g/g}$), tiếp theo là các mức 150 – 250 mg/kg

(78,52 – 87,31 $\mu\text{g/g}$) và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng (31,87 $\mu\text{g/g}$; $P < 0,05$; Hình 3A). Đáng chú ý, hàm lượng carotenoids tổng số tích lũy trên da cá ở mức bổ sung 450 mg/kg thức ăn được xác định là cao hơn 2,7 lần so với đối chứng.

1.2.2. Trong cơ thịt cá

Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận với hàm lượng carotenoids tích lũy trong cơ thịt cá. Kết quả cho thấy lượng carotenoids tích lũy trong cơ thịt cũng tăng tuyến tính với các mức astaxanthin bổ sung. Giá trị lớn nhất đạt được ở mức bổ sung 350 - 450 mg/kg thức ăn là 6,89 – 7,60 $\mu\text{g/g}$ trong khi giá trị thấp nhất được tìm thấy ở nghiệm thức đối chứng chỉ 3,56 $\mu\text{g/g}$ ($P < 0,05$; Hình 3B). Hàm lượng carotenoids tích lũy trong cơ thịt cá ở mức bổ sung 450 mg/kg cao hơn 1,4 lần so với đối chứng.

Từ các phân tích ở trên, có thể thấy rằng việc bổ sung astaxanthin vào thức ăn đã dẫn đến sự tăng cường hàm lượng carotenoids tổng



Hình 3. Hàm lượng carotenoids tổng số (µg/g) tích lũy trên da (A) và trong cơ thịt (B) của cá khoang cổ nemo được cho ăn thức ăn có hàm lượng astaxanthin khác nhau.

Các ký tự chữ cái khác nhau trên các cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$).

số tích lũy trên da và trong cơ thịt cá. Đồng thời, có thể nhận thấy nguồn astaxanthin từ thức ăn vào cơ thể cá chủ yếu được tích lũy trên da, dao động từ 57,21 – 117,70 µg/g trong khi con số này ở hai bộ phận còn lại dao động lần lượt từ 4,42 – 7,60 µg/g và 16,62 – 32,16 µg/g. Trong phạm vi được khảo sát, mức bổ sung từ 350 mg/kg thức ăn là phù hợp với cá khoang cổ nemo.

2. Thảo luận

Mục tiêu của việc bổ sung carotenoids vào khẩu phần ăn là tăng cường màu sắc của cá trong tự hoặc tốt hơn so với nguồn khai thác từ tự nhiên nhằm thỏa mãn nhu cầu thị trường. Bởi khả năng hạn chế trong cảm thụ màu sắc của mắt người, nhiều phương pháp đo màu trực tiếp và gián tiếp được sử dụng để đánh giá hiệu quả lên màu. Phân tích so màu bằng máy đo màu hoặc máy đo quang phổ là phương pháp tiêu chuẩn để đánh giá màu da cá cũng như đo lường màu sắc thực phẩm một cách khách quan [32]. Phương pháp này cung cấp dữ liệu màu theo các giá trị trong không gian màu $CIE L^*a^*b^*$ hoặc $L^*C^*h^*$. Trong đó, L^* biểu thị độ sáng – tối, a^* biểu thị trục xanh lá cây – đỏ, b^* biểu thị trục xanh dương – vàng, H^o_{ab} thể hiện góc độ màu hay tông màu, C^*_{ab} thể hiện độ bão hòa màu hay độ tinh khiết của màu, và ΔE^* chỉ sự khác biệt tổng thể màu sắc giữa hai đối tượng được so sánh [16]. Bên cạnh đó, hàm lượng carotenoids tổng số tích lũy, bao gồm trên da, trong cơ thịt, trứng, hay toàn thân

cũng là những chỉ tiêu quan trọng đánh giá khả năng tiêu hóa, hấp thu và tích lũy của các sắc tố bổ sung trong cơ thể cá [14]. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung nguồn astaxanthin tách chiết từ Copepoda đã cải thiện rõ rệt màu sắc của cá khoang cổ nemo, cả màu da (a^* , b^* , H^o_{ab} và C^*_{ab}) và hàm lượng carotenoids tích lũy trong cơ thể (Hình 1, 2 và 3). Các giá trị tối ưu của cả hai nhóm chỉ tiêu này nhìn chung đều đạt được ở mức bổ sung từ 350 – 450 mg/kg thức ăn và giữa chúng không có sự khác biệt đáng kể ($P > 0,05$), ngoại trừ chỉ số a^* ($P < 0,05$; Hình 1B). Tuy nhiên, bởi màu da, đặc biệt là màu đỏ (độ lớn của giá trị a^*), là tiêu chí quan trọng nhất trong đánh giá màu sắc của cá khoang cổ nemo nên hàm lượng bổ sung ở mức 450 mg/kg thức ăn được xác định là phù hợp nhất.

Các nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận tác động tích cực của việc bổ sung astaxanthin, cả tự nhiên và nhân tạo, đối với màu sắc của cá khoang cổ nemo. Chỉ số a^* trong nghiên cứu này đạt $19,06 \pm 0,79$, cao hơn so với kết quả từ một số báo cáo trước, như $11,47 \pm 0,73$ khi bổ sung nhựa dầu ớt ở mức 20 g/kg [13], hay $16,18 \pm 0,59$ khi được bổ sung bột khoai lang nghệ 250 g/kg [24]. Bằng cách bổ sung astaxanthin tự nhiên, Díaz-Jiménez et al. (2021) cũng thu được giá trị a^* cao, dao động từ 34 – 41 [12]. Điều này cho thấy hiệu quả cải thiện màu sắc (cam – đỏ, giá trị a^*) trên da cá khoang cổ nemo có sự khác nhau theo nguồn carotenoids sử dụng, hàm lượng và thời gian

bổ sung, kích cỡ cá cũng như các điều kiện nuôi khác [12, 15, 37]. Đồng thời, khả năng cải thiện màu sắc ở loài cá này cũng đạt được tốt hơn khi sử dụng astaxanthin so với các nguồn carotenoids khác. Điều này đã được báo cáo trong một số nghiên cứu trước đây khi so sánh hiệu quả của astaxanthin với β -caroten và canthaxanthin [37], astaxanthin với lutein [12], hay astaxanthin với zeaxanthin [30]. Trên một số loài cá khác, astaxanthin cũng được chứng minh là có khả năng chuyển hóa và tích lũy hiệu quả hơn các carotenoids khác giúp tăng cường màu sắc cũng như hàm lượng carotenoids tích lũy cả trong da, cơ thịt, trứng và toàn thân [14, 19, 34].

Đáng chú ý, trong nghiên cứu hiện tại, ở hầu hết các chỉ tiêu đánh giá, kết quả có xu hướng cao hơn cùng với mức tăng của hàm lượng astaxanthin bổ sung vào thức ăn, nhất là chỉ tiêu a^* . Tuy nhiên, việc chưa xác định được mức bổ sung mà ở đó các chỉ tiêu đo lường kể trên có xu hướng giảm là hạn chế trong nghiên cứu hiện tại, và phạm vi khảo sát 0 – 450 mg/kg thức ăn có thể là chưa đủ rộng để đánh giá tác động đầy đủ của astaxanthin lên màu sắc của cá khoang cổ nemo. Các nghiên cứu trước đây cũng trên loài cá này cho thấy hàm lượng khảo sát dao động khá lớn, từ 20 – 15.000 mg/kg thức ăn, tùy theo nguồn carotenoids sử dụng [12, 14, 29]. Trong đó, một số nghiên cứu nhận thấy việc tăng cao hàm lượng carotenoids bổ sung, ở một mức nào đó, không giúp cải thiện, thậm chí còn làm giảm hiệu quả tăng cường màu sắc ở loài cá này. Díaz-Jiménez et al. (2021) báo cáo rằng giá trị a^* và hàm lượng carotenoids tích lũy của cá có xu hướng giảm cùng với sự tăng lên của các mức astaxanthin bổ sung. Cụ thể, trong phạm vi từ 5 – 15 g/kg thức ăn, hai chỉ số kể trên giảm lần lượt từ 41 xuống 34, và từ 15 xuống 9 $\mu\text{g/g}$ [12]. Quan sát tương tự cũng được ghi nhận trên cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss* khi bổ sung tảo xoắn *Spirulina platensis* ở mức 2,5% so với 10% [31]. Sự dư thừa astaxanthin trong khẩu phần ăn được cho là có thể ảnh hưởng tiêu cực đến quá trình trao đổi chất dẫn đến giảm hiệu quả cải thiện màu sắc ở cá, đồng thời, tăng cường

đào thải lượng không được hấp thụ ra môi trường [12].

Tác động của việc bổ sung astaxanthin vào khẩu phần ăn lên chỉ số b^* ở cá khoang cổ nemo cũng tương tự như chỉ số a^* , tuy nhiên, chỉ số độ sáng L^* lại cho thấy xu hướng ngược lại. Theo đó, giá trị của L^* có khuynh hướng giảm dần tương ứng với các mức tăng của hàm lượng astaxanthin bổ sung, cao nhất ở mức 0 – 50 mg/kg và thấp nhất ở mức 350 – 450 mg/kg thức ăn (Hình 1A). Điều này cho thấy rằng sự lắng đọng astaxanthin, bên cạnh tăng màu đỏ và vàng, lại làm giảm độ sáng của da cá. Một số nghiên cứu trước đây cũng từng đề cập đến vấn đề này. Cụ thể, việc bổ sung carotenoids giúp tăng màu đỏ và vàng nhưng lại gây tác dụng phụ làm tối màu da ở các loài cá vẹt đỏ *Vieja melanurus* ♀ × *Amphilophus citrinellus* ♂, cá đĩa *Symphysodon* spp., cá tráp đỏ *Pagrus pagrus* và cá hồi vân *Oncorhynchus mykiss* [18, 23, 29, 38]. Như vậy, có thể thấy rằng vẫn còn nhiều vấn đề cần làm rõ liên quan đến tác động của astaxanthin bổ sung lên cá khoang cổ nemo, tập trung vào các cơ chế chuyển hóa, hấp thu, đặc biệt là con đường chuyển hóa từ astaxanthin bổ sung thành các sản phẩm trung gian như zeaxanthin và canthaxanthin tích lũy trong cơ thể loài cá này. Bên cạnh đó, với vị trí là một trong những chất chống oxy hóa mạnh nhất trong tự nhiên [14], các nghiên cứu tiếp theo nên nhấn mạnh tác động của việc bổ sung sắc tố này lên các nhóm enzyme chuyển hóa, enzyme chống oxy hóa, enzyme liên quan đến phản ứng miễn dịch và chống căng thẳng ở loài cá này. Đồng thời, như đã phân tích ở trên, phạm vi nghiên cứu cũng cần được mở rộng, từ 500 mg/kg thức ăn trở lên, nhằm đánh giá đầy đủ tác động của astaxanthin bổ sung vào khẩu phần ăn lên hiệu quả cải thiện màu sắc ở loài cá cảnh biển rất được ưa chuộng này.

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Việc bổ sung astaxanthin tách chiết từ Copepoda, loài *Pseudodiaptomus annandalei*, vào thức ăn đã cải thiện màu sắc của cá khoang cổ nemo sản xuất nhân tạo. Nhìn chung, cả chỉ số a^* (chỉ số thể hiện màu đỏ) và hàm lượng carotenoids tích lũy trên da cá đều tăng tỷ lệ

thuận với hàm lượng astaxanthin bổ sung. Trong đó, các giá trị tốt nhất của cả hai chỉ tiêu này đều đạt được ở mức bổ sung 450 mg/kg thức ăn, cao hơn lần lượt là 111% và 270% so với đối chứng.

Các nghiên cứu tiếp theo nên khảo sát tác động của hàm lượng astaxanthin bổ sung ở phạm vi rộng hơn, từ 0 – 1.000 mg/kg thức ăn, nhằm xác định được điểm tối ưu. Bên cạnh đó, các chỉ tiêu đánh giá hiệu quả của việc bổ sung astaxanthin đối với sức khỏe tổng thể của loài

cá này cũng cần thiết được đề cập.

Lời cảm ơn

Bài báo được tài trợ kinh phí thông qua đề tài nghiên cứu KH&CN cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo (Mã số B2022-TSN-08). Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến Bộ GD&ĐT, Trường Đại học Nha Trang và Trại sản xuất giống cá cảnh biển Vĩnh Hòa đã hỗ trợ kinh phí, thời gian và cơ sở vật chất cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt:

1. Nguyễn Văn Khôi (2001), *Động vật chí Việt Nam, Tập 9, Phân lớp Chân chèo - Copepoda biển*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 385 trang.
2. Nguyễn Văn Khôi (2005), *Định loại Động vật vật phù du thường gặp trong ao nuôi tôm cá nước lợ ven biển Việt Nam*, Trung tâm Quốc gia Quan trắc và Cảnh báo môi trường biển, 145 trang.
3. Đoàn Xuân Nam (2022), *Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học sinh trưởng, sinh sản và nuôi sinh khối Copepoda Pseudodiaptomus annandalei (Sewell, 1919) trong điều kiện biến đổi khí hậu*, Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Nha Trang, 127 trang.
4. Đặng Trung Thành, Trần Văn Dũng, Lương Thị Hậu, Trần Thị Hoàng Quyên (2022), “Nghiên cứu điều kiện tách chiết và bảo quản Astaxanthin từ vỏ tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei* Boone, 1931)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thủy sản*, số 4, trang 51-59.

Tiếng Anh:

5. Ajiboye, O.O., Yakubu, A.F., Adams, T.E., Olaji, E.D., and Nwogu, N.A. (2011), “A review of the use of copepods in marine fish larviculture”, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, pp. 225-246.
6. Amaya, E., Nickell, D. (2015), Using feed to enhance the color quality of fish and crustaceans, In: *Feed and feeding practices in aquaculture*, pp. 269-298.
7. AOAC (2006), *Official methods of analysis, 18th ed.*, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
8. Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M.P., Holt, G.J. (2017), *Marine ornamental species aquaculture*, Wiley Blackwell, 712 pages.
9. Chen, J.Y, Zeng, C., Jerry, D.R., and Cobcroft, J.M. (2020), “Recent advances of marine ornamental fish larviculture: broodstock reproduction, live prey and feeding regimes, and comparison between demersal and pelagic spawners”, *Reviews in Aquaculture* 12(3), pp. 1518-1541.
10. Chesney, E.J. (2005), Copepods as live prey: a review of factors that influence the feeding success of marine fish larvae, In: Lee, C.S., O’Byrne, P.J., and Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in aquaculture*, John Wiley & Sons, pp. 133-150.
11. Da Silva, C.R.B., Hoepner, C.M., Mercader, M., Laudet, V., da Silva, K.B. (2022), The impact of popular film on the conservation of iconic species: Anemonefishes in the aquarium trade, In: Laudet, V., and Ravasi, T. (Eds.), *Evolution, development and ecology of anemonefishes: model organisms for marine*

- science, CRC Press, p. 223.
12. Díaz-Jiménez, L., Hernández-Vergara, M.P., Pérez-Rostro, C.I., and Olvera-Novoa, M.Á. (2021), “The effect of two carotenoid sources, background colour and light spectrum on the body pigmentation of the clownfish *Amphiprion ocellaris*”, *Aquaculture Research*, 52(7), pp. 3052-3061.
 13. Ebeneezar, S., Prabu, D.L., Chandrasekar, S., Tejpal, C., Madhu, K., Sayooj, P., and Vijayagopal, P. (2020), “Evaluation of dietary oleoresins on the enhancement of skin coloration and growth in the marine ornamental clown fish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830)”, *Aquaculture*, 529, pp. 735728.
 14. Elbahnaswy, S. and Elshopakey, G.E. (2023), “Recent progress in practical applications of a potential carotenoid astaxanthin in aquaculture industry: a review”, *Fish Physiology and Biochemistry*, pp. 1-30.
 15. Ho, A.L., O’Shea, S.K., and Pomeroy, H.F. (2013), “Dietary esterified astaxanthin effects on color, carotenoid concentrations, and compositions of clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*, skin”, *Aquaculture International*, 21(2), pp. 361-374.
 16. Hunter, R.S., and Harold, R.W. (1987), *The measurement of appearance*, the 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, p. 411.
 17. Hwang, J.S., Kumar, R., Hsieh, C.W., Kuo, A.Y., Souissi, S., Hsu, M.H., Wu, J.T., Liu, W.C., Wang, C.F., and Chen, Q.C. (2010), “Patterns of zooplankton distribution along the marine, estuarine and riverine portions of the Danshuei ecosystem in northern Taiwan”, *Zoological Studies*, 49(3), pp. 335-352.
 18. Kalinowski, C.T., Robaina, L.E., Izquierdo, M.S. (2011), “Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, lipid composition and post-mortem skin colouration of red porgy *Pagrus pagrus*”, *Aquaculture International*, 19(5), pp. 811-823.
 19. Lau, C.C., Nor, S.A.M., Tan, M.P., Yeong, Y.S., Wong, L.L., de Peer, Y.V., Sorgeloos, P. and Danish-Daniel, M. (2023), “Pigmentation enhancement techniques during ornamental fish production”, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, pp. 1-22.
 20. Lee, C.S., O’Byrne, P.J., and Marcus, N.H. (Eds.) (2008), *Copepods in aquaculture*, John Wiley and Sons, 270 pages.
 21. Lim, K.C., Yusoff, F.M., Shariff, M., Kamarudin, M.S. (2018), “Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals”, *Reviews in Aquaculture*, 10, pp. 738–773.
 22. Luo, M., Lu, G., Yin, H., Wang, L., Atuganile, M., Dong, Z. (2021), “Fish pigmentation and coloration: Molecular mechanisms and aquaculture perspectives”, *Reviews in Aquaculture*, 13(4), pp. 2395-2412.
 23. Micah, A.D., Wen, B., Wang, Q., Zhang, Y., Yusuf, A., Thierry, N.N.B., Tokpanou, O.S., Onimisi, M.M., Adeyemi, S.O., Gao, J.Z., and Chen, Z.Z. (2022), “Effect of dietary astaxanthin on growth, body color, biochemical parameters and transcriptome profiling of juvenile blood parrotfish (*Vieja melanurus* ♀ × *Amphilophus citrinellus* ♂)”, *Aquaculture Reports*, 24, pp. 101142.
 24. Nhan, H.T., Minh, T.X., Liew, H.J., Hien, T.T.T., and Jha, R. (2019), “Effects of natural dietary carotenoids on skin coloration of false Clownfish (*Amphiprion ocellaris* Cuvier, 1830)”, *Aquaculture Nutrition*, 25(3), pp. 662-668.
 25. Pouil, S., Tlusty, M.F., Rhyne, A.L., and Metian, M. (2019), “Aquaculture of marine ornamental fish: overview of the production trends and the role of academia in research progress”, *Reviews in Aquaculture*, 12(2), pp. 1217-1230.
 26. Ramamoorthy, K., Bhuvanewari, S., Sankar, G., and Sakkaravarthi, K. (2010), “Proximate composition and carotenoid content of natural carotenoid sources and its colour enhancement on marine ornamental

- fish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830)", *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6), pp. 545-550.
27. Sathyaruban, S., Uluwaduge, D.I., Yohi, S., and Kuganathan, S. (2021), "Potential natural carotenoid sources for the colouration of ornamental fish: a review", *Aquaculture International*, 22, pp. 1507-1528.
 28. Sköld, H.N., Aspengren, S., Cheney, K.L., Wallin, M. (2016), "Fish chromatophores - from molecular motors to animal behavior", *International Review of Cell and Molecular Biology*, 321, pp. 171-219.
 29. Song, X., Wang, L., Li, X., Chen, Z.Z., Liang, G., Leng, X. (2016), "Dietary astaxanthin improved the body pigmentation and antioxidant function but not the growth of discus fish (*Symphysodon* spp.)", *Aquaculture Research*, 48(4), pp. 1359-1367.
 30. Tanaka, Y., Yamamoto, A., Kamata, T., Simpson, K.L. (1992), "Biochemical study on the carotenoids in the anemonefish, *Amphiprion* spp.", *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University*, 41, pp. 1-8.
 31. Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., Yeganeh, S. (2013), "The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(2), pp. 194-202.
 32. Tomasevic, I., Tomovic, V., Milovanovic, B., Lorenzo, J., Đorpevic, V., Karabasil, N., Djekic, I. (2019), "Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties", *Meat Science*, 148, pp. 5-12.
 33. Tran, V.D., Dang, T.T., Cao, T.T.T., Hua, T.N., Pham, Q.H. (2022), Natural astaxanthin extracted from shrimp waste for pigment improvement in the Orange clownfish, *Amphiprion percula*", *Aquaculture Research*, 53(11), pp. 4190-4198.
 34. Trichet, V.V., and Amaya, E. (2022), Astaxanthin use as carotenoid source and its benefits in feeds, In: Davis, A. (Ed.), *Feed and feeding practices in aquaculture*, Woodhead Publishing UK, pp. 309-335.
 35. Van Der Meer, T., Olsen, R. E., Hamre, K., and Fyhn, H. J. (2008), "Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish", *Aquaculture*, 274(2-4), pp. 375-397.
 36. Vilgrain, L., Maps, F., Basedow, S., Trudnowska, E., Madoui, M. A., Niehoff, B., and Ayata, S. D. (2023), "Copepods' true colors: astaxanthin pigmentation as an indicator of fitness", *Ecosphere*, 14(6), p. 4489.
 37. Yasir, I., and Qin, J.G. (2010), "Effect of dietary carotenoids on skin color and pigments of false clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier", *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(3), pp. 308-318.
 38. Zhao, W., Guo, Y.C., Huai, M.Y., Li, L., Man, C., Pelletier, W., Wei, H.L., Yao, R., Niu, J. (2022), "Comparison of the retention rates of synthetic and natural astaxanthin in feeds and their effects on pigmentation, growth, and health in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Antioxidants*, 11, p. 2473.