

Efecto de la adición de tres pigmentos carotenoides comerciales (astaxantina, cantaxantina y β -caroteno) en la dieta sobre la coloración de la concha o nácar de juveniles de abulón rojo *Haliotis rufescens*

Effect of commercial carotene pigments (astaxanthin, cantaxanthin and β -carotene) in juvenile abalone *Haliotis rufescens* diets on the color of the shell or nacre

Eréndira Canales-Gómez* Gabriel Correa** María Teresa Viana**

Abstract

With the aim to observe any color effect on the shell or nacre of juvenile red abalone (*Haliotis rufescens*), three diets were formulated adding carotene pigments (astaxanthin, cantaxanthin and β -carotene) and one control diet without pigments. Juvenile abalone ($n = 504$) with a shell length and weight of 5.46 ± 0.87 mm and 0.03 ± 0.16 g, respectively, were utilized. The abalones were randomly distributed in twelve buckets (20 L) connected to a recirculation system under controlled temperature and constant water flow. Each treatment was done in triplicate. After 90 days of experimentation, the organisms fed on diets with inclusion of pigments showed a length growth rate of 53.06 ± 6.91 μ m/day and weight of 1.34 ± 0.24 mg, whereas the juveniles fed with the control diet showed a growth rate of 74.93 ± 14.63 μ m/day and weighed 2.13 ± 0.40 mg. The formation of shell and color recorded resulted in a minor color change compared to the control diet. However, in spite of these changes the supplementation of pigment at this point is not recommended. Nevertheless, more efforts should be made to research the shell color manipulation.

Key words: ABALONE, *HALIOTIS RUFESCENS*, CAROTENE PIGMENTS, FORMULATED DIETS.

Resumen

Con el propósito de observar cambios en la coloración de la concha y nácar de juveniles de abulón rojo (*Haliotis rufescens*), se formularon tres dietas a las que se les agregaron pigmentos carotenoides (astaxantina, cantaxantina y β -caroteno) y una dieta testigo sin pigmentos. Se obtuvieron juveniles de abulón ($n = 504$) de 5.46 ± 0.87 mm y 0.03 ± 0.16 g de longitud promedio de la concha y peso, respectivamente. Los abulones se distribuyeron aleatoriamente en 12 cubetas de 20 L, conectadas a un sistema cerrado de recirculación, con temperatura y flujo constante. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Después de 90 días de experimentación, los organismos alimentados con dietas con inclusión de pigmentos presentaron una tasa de crecimiento en longitud de 53.06 ± 6.91 μ m/día y peso 1.34 ± 0.24 mg, mientras que los abulones de la dieta testigo crecieron a razón de 74.93 ± 14.63 μ m/día y pesaron 2.13 ± 0.40 mg, sin que se observaran diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$) experimentales. La formación de la concha y la coloración se registraron mediante imágenes fotográficas y con ayuda de una paleta de colores se observó un ligero cambio en la coloración de la parte exterior de la concha hacia tonalidades amarillas de los abulones alimentados con dietas que incluían pigmentos, siendo más intensa para aquellos que contenían β -caroteno. Sin embargo, a pesar de estos cambios no se recomienda la incorporación de pigmentos para abulón en ese momento, pero será necesario investigar más sobre la manipulación del color de sus conchas.

Palabras clave: ABULÓN, *HALIOTIS RUFESCENS*, PIGMENTOS CAROTENOIDES, DIETAS BALANCEADAS.

Recibido el 27 de julio de 2009 y aceptado el 10 de mayo de 2010.

*Instituto Tecnológico de Bahía de Banderas, Crucero de Punta Mita s/n, 63734, Bahía de Banderas, Nayarit, México.

**Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, km 107, Carretera Tijuana-Ensenada, 22860, Ensenada, Baja California, México.

Autor para correspondencia: María Teresa Viana, correo e: viana@uabc.edu.mx; Tel.: (646) 1 74 46 01, Correo alternativo: mtviana@hotmail.com

Introduction

Color manipulation is a common practice in feed manufacturing, performed to increase the product's value and its acceptance by consumers.¹ To be able to fulfill customer's needs and considering the expansion of aquaculture in the last few years, diet supplementation of pigment sources (mostly carotenes) on cultured organisms has been greatly encouraged.²

Carotenes are isoprenoid, polyon compounds with 40 carbons, soluble in organic and fat solvents, that give yellow, orange and red color tones.^{2,4} Currently, carotene pigments are used as a source of pigmentation in diets for crustaceous (shrimp and lobster) and in fish, to fix the coloring agent on the muscle of rainbow trout and mostly salmon.⁵⁻⁷

Experiments with color manipulation have been done mainly in mollusk genetics, working mostly with pearl oysters.^{8,9} The abalone (*Haliotis*) is a gastropod mollusk with a shell rich in nacre tonalities. This knowledge has developed a great interest in the culture of pearls for jewelry production.

The selection of pearls is based on the search for colors and their combinations, which go from violet, blue, pink and green, depending on the species of abalone and its feed supplement. However, market oriented research on pigmentation is scarce. It is well known that the color the abalone shell acquires is influenced by genetics as well as by the diet they ingest.¹⁰⁻¹⁴ Different pigments have been registered on the shells of Haliotidae, like pyrroles and chlorophyll,¹⁵ and recently Barnard and De Waal¹⁶ described the presence of by-products of carotene pigments on the shell. These pigments cannot be synthesized by the abalone itself, so they are obtained through the diet from algae decomposition.¹²

There is a unique registration of an experiment with algae where the objective was the color manipulation in Japanese abalone *H. discus hannai* by supplementing phycocyanin type pigments to the diet with favorable results.^{*17} Likewise, during a trial done to substitute algae flour for grape pomace in abalone diets,¹⁸ a change in color was observed on the organisms' shell after two months of the experiment.

Based on the former data and considering that the abalone pearl culture is a high profitable activity that is expanding in Mexico as well as in other countries,^{19,20} the possibility of developing a balanced diet that would have an effect on the abalone shell and nacre color was proposed. In this context, the present study evaluated the effect of adding three commercial carotene pigments to abalone diets on the color of the shell and nacre of red abalone *Haliotis rufescens* juveniles.

Introducción

La manipulación del color en la industria alimentaria es una práctica extendida que tiene como propósito incrementar el valor del producto y su aceptación por los consumidores finales.¹ Para atender las necesidades del mercado y con la expansión de la acuicultura en los últimos años, se ha estimulado el interés por la aplicación de fuentes pigmentarias (carotenoides, principalmente) en organismos cultivados.²

Los carotenoides son compuestos polienos isoprenoides de 40 carbonos, solubles en lípidos y disolventes orgánicos, que presentan tonalidades amarillas, naranjas y rojas.^{2,4} Actualmente los carotenoides se utilizan como fuente de pigmentación en la dieta de crustáceos (camarón y langosta) y en peces, en la fijación del colorante en el músculo de la trucha arcoiris y principalmente en salmón.⁵⁻⁷

En el grupo de los moluscos, las experiencias con manipulación de color han sucedido principalmente en el área de la genética y están dirigidas a ostras perleras, en su mayoría.^{8,9} Específicamente, el abulón (*Haliotis*) es un molusco gasterópodo que presenta una concha rica en tonalidades nacaradas, lo que ha dado lugar a un gran interés por el desarrollo del cultivo de perlas para la explotación de la joyería.

La selección de las perlas se basa en la búsqueda de colores y sus combinaciones que van desde color violeta, azul, rosa y verde, dependiendo de la especie de abulón y alimentación. Sin embargo, los trabajos de investigación sobre la pigmentación con fines comerciales son escasos. Se sabe que el color que adquiere la concha del abulón está influido tanto por la genética como por la dieta que éstos ingieren.¹⁰⁻¹⁴ Se han registrado distintos pigmentos en las conchas de los haliótidos, como los pirroles y clorofilas,¹⁵ y recientemente Barnard y De Waal¹⁶ describieron la presencia de derivados de pigmentos carotenoides en la concha. Estos pigmentos no pueden ser sintetizados por el abulón, por lo que son adquiridos de la dieta mediante descomposición algal.¹²

Se cuenta con un registro único de algas de un experimento cuyo objetivo fue la manipulación de color en abulón japonés *H. discus hannai* mediante la adición de pigmentos tipo ficocianinas a la dieta, con resultados favorables.^{*17} Asimismo, en un ensayo dirigido a sustituir la harina de alga por harina de mosto de uva en abulón,¹⁸ se observó un cambio de coloración de la concha de los organismos tras dos meses de experimentación.

Con base en tales antecedentes y teniendo en cuenta que la perlicultura en abulón es una actividad

*Lina-Blue Dainippon Ink and Chemicals Inc, Tokio, Japón.

Material and methods

Diet composition

Three isoproteic and isocaloric diets (Table 1) were prepared based on the species requirements,^{21,22} in which different carotene* pigments were added: astaxanthin, diet A; β -carotene, diet B; and cantaxanthin, diet C. A semi commercial control diet (D) with no pigments added was used as shown in Table 1. All ingredients were combined in a high yield noodle mixer,** adding 40% water to obtain a homogeneous meal. With a noodle mill,*** the strips were cut to a length of 6 mm, dried in an oven with a 60°C hot air flow for 24 hours and kept at 4°C.

Proximal analysis

All analysis were done in triplicate in accordance with the AOAC.²³ In summary, crude protein was determined by the micro Kjeldahl method, crude fat by Soxhlet, moisture on a constant dry matter base (60°C for 24 hours), ashes by burning (500°C for six hours) and the nitrogen-free extract (NFE) by subtracting.

The gross energy content was calculated theoretically by using the average gross energy value for carbohydrates (4.1 kcal/g), fat (9.5 kcal/g) and protein (5.6 kcal/g), suggested by Tacon.²⁴

Experimental procedure

The study was conducted using 504 red abalone juveniles (*H. rufescens*), with an average shell length of 5.46 ± 0.87 mm and a weight of 0.03 ± 0.16 g. Each experimental unit included a 20 L black plastic container (ABS) with a 1×1 mm plastic mesh covering the bottom end, all of which is described as a growth chamber in a previous study.²² Within each growth chamber 42 abalones were randomly distributed; each experimental unit was part of a water recirculation system (8 L/h) constantly kept at a temperature of $17 \pm 1^\circ\text{C}$. Each treatment was done in triplicate with a random location in the system. A photoperiod of 12L:12D was kept during all the experiment. Feed was offered *ad libitum* daily at around 18:00 h during 90 days. The leftover food was withdrawn after 12 hours. Using the electronic Vernier (± 0.01 mm) and the analytical balance (± 0.1 mg) monthly biometrics were performed to measure growth. Shell color and development were registered with microphotographs taken from the stereoscopic microscope and contrasted with the Adobe® Photoshop® extended CS3 version, image processor software.* A color palette was created based on the shell color of all the treatments. The white-green tonalities corresponded to the interval

altamente lucrativa que se encuentra en expansión tanto en México como en otros países,¹⁹⁻²⁰ se planteó la posibilidad de desarrollar un alimento balanceado que tuviera incidencia en la coloración de la concha y nácar de los organismos; en este contexto, en el presente estudio se evaluó el efecto de la inclusión de tres pigmentos carotenoides de uso comercial en dietas para abulón, sobre la coloración de la concha y nácar de juveniles de abulón rojo *Haliotis rufescens*.

Material y métodos

Elaboración de dietas

Se formularon tres dietas isoproteínicas e isocalóricas (Cuadro 1) de acuerdo con los requerimientos de la especie,^{21,22} a las cuales se les añadieron distintos pigmentos carotenoides:* astaxantina, dieta A; β -caroteno, dieta B; y canthaxantina, dieta C. Como testigo se utilizó una dieta semicomercial (D) sin pigmentos adicionados, como se muestra en el Cuadro 1. Todos los ingredientes se combinaron en un mezclador de alto rendimiento** hasta producir una pasta homogénea al agregar 40% de agua. La pasta se pasó a través de un molino para hacer tallarines.*** Las tiras cortadas a 6 mm de longitud se secaron en un horno con flujo de aire caliente a 60°C durante 24 horas y se guardaron a 4°C.

Análisis proximal

Todos los análisis se realizaron por triplicado y de acuerdo con lo establecido por la AOAC.²³ En resumen, la proteína cruda se determinó mediante el método micro Kjeldahl, grasa cruda por Soxhlet y humedad a peso seco constante (60°C por 24 horas). Las cenizas por calcinación (500°C por seis horas) y el extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó por diferencia.

El contenido de energía bruta se calculó teóricamente utilizando los valores de energía bruta promedio para carbohidratos (4.1 kcal/g), lípidos (9.5 kcal/g) y proteínas (5.6 kcal/g), recomendados por Tacon.²⁴

Procedimiento experimental

Se utilizaron 504 juveniles de abulón rojo (*H. rufescens*) de 5.46 ± 0.87 mm de longitud promedio de la concha y 0.03 ± 0.16 g de peso. Cada unidad experimental estuvo conformada por una cubeta plástica de 20 L, dentro de ésta se mantuvo suspendido un contenedor cilíndrico de plástico negro (ABS), revestido en

*DSM Carophyll pink; β -Carotene y Carophyll red, Suiza.

**Robot Coupe R8T, Jackson MS, Estados Unidos de América.

***Rosito Bisani, Los Ángeles, Estados Unidos de América.

Cuadro 1
INGREDIENTES (% PESO SECO), COMPOSICIÓN PROXIMAL Y CONTENIDO ENERGÉTICO DE LAS
DIETAS UTILIZADAS EN ESTE EXPERIMENTO
INGREDIENTS (% DRY MATTER), PROXIMAL COMPOSITION AND ENERGY CONTENT OF THE
EXPERIMENTAL DIETS

<i>Ingredients</i>	<i>Treatments</i>			
	<i>Diet A</i>	<i>Diet B</i>	<i>Diet C</i>	<i>Diet D</i>
<i>Pigment</i>	<i>Carophyll pink™</i>	<i>Rovimix β-Carotene™</i>	<i>Carophyll red™</i>	
Fish meal	10	10	10	35
Tuna silage	2	2	2	0
Soybean meal	15	15	15	15
Corn meal	12	12	12	12
Alfalfa meal	17	17	17	15
<i>Macrocystis</i> meal	6.34	6.34	6.34	0
Cornstarch	23	23	23	4.43
Gelatine	6	6	6	6
Vitamin premix	1.7	1.7	1.7	12.5
Mineral premix	3.3	3.3	3.3	0
Choline	0.11	0.11	0.11	0
DL-Methionine	0.23	0.23	0.23	0
BHT	0.086	0.086	0.086	0.04
Sodium benzoate	0.23	0.23	0.23	0.001
Pigment	3	3	3	0
<i>Proximal analysis</i>				
Crude protein (%)	31.6 ± 0.96	28.0 ± 0.88	30.33 ± 0.51	46.99 ± 1.37
Total fat (%)	7.94 ± 0.31	11.64 ± 1.0	7.2 ± 0.42	7.68 ± 0.22
Ashes (%)	11.46 ± 0.17	12.1 ± 0.10	11.73 ± 0.11	13.73 ± 0.19
Nitrogen free extract	49	51.94	50.74	31.12
Gross energy (kcal/g)	4.53	4.8	4.46	4.63
Protein/energy ratio	69.71	58.28	67.96	101.33

between the digital colors TRUMATCH®** 13-g2 and TRUMATCH® 17-e3; while the yellow tones manifested between TRUMATCH® 10-a7 and TRUMATCH® 11-e1; the red tones were between the TRUMATCH® 50-a2 and the TRUMATCH® 3-e4. The change in color attributed to the addition of carotene to the diet was interpreted when zones, bands, or color attachments were present in the yellow-red tone range on the growth area.

Statistical analysis

The tests were performed under a random experimental design where each treatment had three replicates using growth as the variable. To determine

su parte inferior por una malla de plástico de 1 × 1 mm, descrita como cámara de crecimiento en un trabajo anterior.²² En cada cámara de crecimiento se distribuyeron aleatoriamente 42 abulones; cada unidad experimental formó parte de un sistema cerrado de recirculación de agua (8 L/h), el cual se mantuvo a 17 ± 1°C en forma constante. Cada tratamiento se realizó por triplicado y su ubicación en el sistema fue aleatoria. Durante todo el experimento se mantuvo un fotoperiodo de 12:12 L:O. El alimento fue suministrado diariamente a saciedad alrededor de las 18:00 h durante 90 días. Después de 12 h se retiró todo el alimento que no fue consumido. Se realizaron biometrías mensuales para determinar el crecimiento mediante el uso de Vernier electrónico (± 0.01 mm)

the possible growth differences between the different experimental treatments and the control, a non parametric, Kruskal-Wallis, one way Anova was performed.

A chi-square goodness of fit test ($\alpha = 0.05$ and g.l. = 1) was used for each treatment to determine any significant differences resulting from adding carotenes. The data was turned into percentage to cover the experiment's demands. The SigmaStat 3.1®²⁵ statistical test was used.

Results

The proximate composition of the experimental diets is shown in Table 1. The diets containing pigments had a very similar percentage of crude protein, fat, and gross energy (28.0% to 31.6%, 11.46 to 12.1% and 4.94 kcal/-g to 5.3 kcal/-g⁻¹, respectively), but less than the control diet, which was a semi commercial food (46.9%).

Considering growth, after 90 days of the study, the organisms fed with diets containing pigments had a growth rate (shell length) of 53.06 ± 6.91 $\mu\text{m}/\text{day}$ and an increase in weight of 1.34 ± 0.24 mg/day, while the abalones fed the control diet grew significantly more at a rate of 74.93 ± 14.63 $\mu\text{m}/\text{day}$ and 2.13 ± 0.040 mg/day. Considering shell color, significant differences were found between the shells with and without a change of color in each treatment ($X^2_A = 36$, $X^2_B = 30.91$, $X^2_C = 42.51$, $X^2_D = 53.87$). In the treatments where carotenes were added, the percentage of shells that showed a change of color was statistically higher ($A = 0.80$, $B = 0.78$, $C = 0.83$) than that of the shells with no change of color ($A = 0.20$, $B = 0.22$, $C = 0.17$). In the control diet (D), the highest percentage (0.87) resulted in those shells which did not show coloring due to the addition of pigments. Generally, the changes of shell color began in a similar way in all the treatments, where all organisms showed a change of color (from red to white with green areas) indistinctive of the treatment.

During most of the experiment, the new acquired color remained on the outer part of the shell. However, towards the end, some changes in tone began to appear (yellow) on the organisms fed with diets supplemented with pigments. Altogether, the abalones fed with diet B (β -carotene) showed the most intense yellow coloration compared to those from the other treatments. The organisms fed with diets A and C (astaxanthin and cantaxanthin) showed a yellow colored area combined with green tones on the central, upper part of the shell (Figure 1). Considering the nacre, no color change was observed. However, the photographic records from all the treatments show that the aragonite growth extended

y balanza analítica (± 0.1 mg). La formación y el color de la concha se registraron mediante microfotografías tomadas del microscopio estereoscópico, que fueron contrastadas con el software de procesamiento de imágenes* Adobe® Photoshop® versión CS3 Extended. Se elaboró una paleta de colores en base a la coloración de las conchas de todos los tratamientos. Las tonalidades blancas-verdes correspondieron al intervalo comprendido entre los colores digitales TRUMATCH®** 13-g2 y TRUMATCH® 17-e3; mientras que las amarillas se presentaron entre TRUMATCH® 10-a7 y TRUMATCH® 11-e1; los tonos rojizos estuvieron entre los colores TRUMATCH® 50-a2 y TRUMATCH® 3-e4. El cambio en la coloración atribuido a la adición de carotenos en la dieta fue interpretado cuando hubo presencia de zonas, bandas o agregados de color dentro de la gama de tonalidades amarillo-rojizas en el área de crecimiento.

Análisis estadístico

Las pruebas se realizaron bajo un diseño experimental al azar y cada uno de los tratamientos contaba con tres réplicas en donde la variable era el crecimiento. Para determinar las probables diferencias de crecimiento entre los diferentes tratamientos experimentales y testigo, se utilizó un Andeva, de una vía, no paramétrico de Kruskal-Wallis

Para determinar si hubo cambios significativos en la coloración de las conchas como resultado de la adición de carotenos, se utilizó una prueba de bondad de ajuste Ji cuadrada con modelo de homogeneidad ($\alpha = 0.05$ y g.l. = 1) para cada tratamiento. Los datos fueron transformados a porcentajes para cumplir con los requisitos de la prueba. Se empleó el programa estadístico Sigma-Stat 3.1®²⁵

Resultados

La composición proximal de las dietas experimentales se puede observar en el Cuadro 1. Las dietas con pigmentos presentaron una composición muy similar en cuanto a porcentaje de proteína cruda, lípidos y contenido de energía bruta (28.0% a 31.6%, 11.46 a 12.1% y 4.94 kcal/-g a 5.3 kcal/-g⁻¹, respectivamente), pero menor que la dieta testigo, que es de uso semicomercial (46.9%).

Respecto al crecimiento, tras 90 días de experimentación, los organismos alimentados con dietas con inclusión de pigmentos presentaron una tasa de crecimiento (longitud de la concha) de 53.06 ± 6.91 $\mu\text{m}/\text{día}$ y peso de 1.34 ± 0.24 mg/día, mientras que los

*® 2010 Adobe Systems Incorporated.

**®Copyright 1990-2010, TRUMATCH, Water Mill, Nueva York, Estados Unidos de América.

to the oldest areas of the shell, increasing the shine and iridescence of the parts which initially showed red tones (Figure 2).

Discussion

In accordance with other authors' research, the growth of the organisms in this study depended on the protein content of the diet; ^{21,22} therefore, the control diet resulted in a better growth than the one occurring with the experimental diets. It is well known that a higher protein intake than the one ingested from a natural food source significantly accelerates the organisms' growth, reported between 10% and 25% depending on the type of available algae.²¹ Comparing the experimental diets with the control having a higher protein percentage was not deliberate, as the variable to be measured in this study was the color given by the presence or absence of pigment and not the growth variation; however, it was important to acknowledge its presence. Nevertheless, in the present study all the experimental groups showed enough growth for the change in color to be observed and thus evaluate the effect of adding pigments.

Apparently, the results indicate that the pigments added to the diets were only partially assimilated. The initial change in color (from red to white or green) resulted from the change of diet (from native food *Navicula inserta* to a balanced diet) as has been previously reported^{10,11} and also conforms to that described by Leighton.²⁶ Likewise, the pearly colors observed in all treatments are similar to what Howorth has reported.²⁷ However, near the end of the study (day 90), the appearance of colored areas and bands with yellow tones on the shell of the organisms fed with diets supplemented with carotenes suggests a partial, and, discontinuous assimilation of the pigment. As Olsen¹¹ reports, this is similar to what happens to abalones in their natural habitat, where, during the first three months of the increase in number of red algae, they show a gradual coloring (from orange to pink) until the appearance of strong, red, dietary bands, even five months after the highest affluence of these algae.

As mentioned before, abalones are unable of synthesizing carotenes so they obtain them from algae decay.¹² Ben-Amotz and Yishai²⁸ and Minguez-Mosquera *et al.*²⁹ point out differences between the molecular formula of natural and synthetic β -carotene (cis and trans, respectively). They even mention that the synthetic pigment is ten times less active than the natural one. These traits may be associated with the difficulty the mollusk has to absorb, transport and metabolize synthetic pigments, explaining the partial color and tone shown by the organisms of this experiment.

abalones de la dieta testigo crecieron significativamente más a razón de $74.93 \pm 14.63 \mu\text{m}/\text{día}$ y $2.13 \pm 0.40 \text{ mg}/\text{día}$. En cuanto a la coloración de la concha, se encontraron diferencias significativas entre las conchas con y sin cambios de coloración en cada tratamiento ($X^2_A = 36$; $X^2_B = 30.91$, $X^2_C = 42.51$, $X^2_D = 53.87$) siendo estadísticamente mayores los porcentajes de las conchas que cambiaron ($A = 0.80$, $B = 0.78$, $C = 0.83$) respecto a las que no ($A = 0.20$, $B = 0.22$, $C = 0.17$) en los tratamientos con inclusión de carotenos. En el tratamiento testigo (D) el porcentaje mayor (0.87) correspondió a aquellas conchas que no presentaron coloraciones atribuidas a los pigmentos. Los cambios en la coloración iniciaron de manera similar en todos los tratamientos, observándose en todos los organismos un cambio en la pigmentación (de color rojo a blanco con áreas verdes), indistintamente, del tratamiento.

La nueva coloración adquirida permaneció en la mayor parte del experimento en la parte externa; sin embargo, hacia el final de éste, comenzaron a destacarse algunos cambios (tonalidades amarillas) en los organismos alimentados con las dietas adicionadas con pigmentos. De manera general, los abalones alimentados con la dieta B (β -caroteno) presentaron la coloración amarilla de manera más intensa que los de los otros tratamientos. Los organismos de las dietas A y C (astaxantina y cantaxantina) mostraron una zona coloreada amarilla en la parte central superior de la concha, combinada con tonalidades verdes (Figura 1). En cuanto al nácar, no se observó ningún cambio en la coloración; sin embargo, los registros fotográficos muestran para todos los tratamientos que el crecimiento de la aragonita se extendió hacia las partes más antiguas de la concha, volviendo más brillante y tornasol la parte que inicialmente presentaba tonos rojizos (Figura 2).

Discusión

El crecimiento de los organismos estuvo en función de la concentración de proteína, lo cual coincide con otros autores, ^{21,22} hecho por el cual la dieta testigo resultó en mejor crecimiento que las dietas experimentales. Se sabe que la ingestión de mayor cantidad de proteína a la ingerida de manera natural en su dieta acelera significativamente su crecimiento, contenido que se notifica de 10% a 25%, dependiendo del tipo de alga disponible.²¹ La razón por la cual se compararon las dietas experimentales contra una testigo con mayor concentración de proteína fue casual y porque la variable a medir era la coloración a través de la presencia o ausencia de pigmento y no pretendía medir la variación de crecimiento, mas sí era importante demostrar la presencia de éste. No obstante, en el presente trabajo todos los grupos

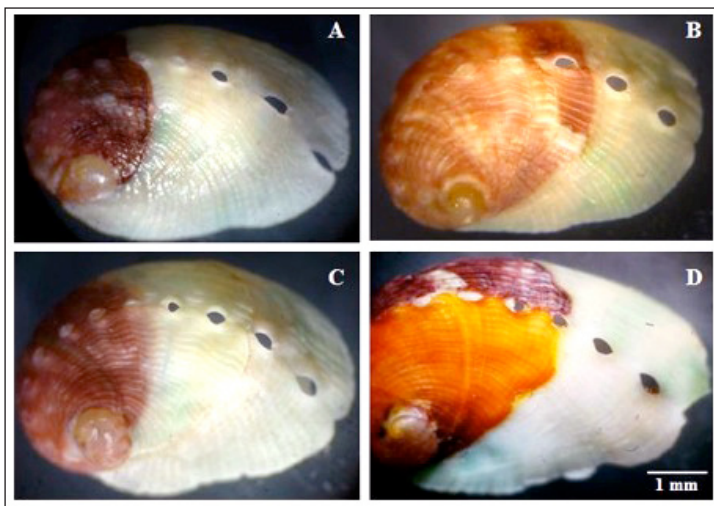


Figura 1. Coloración de la calcita de juveniles de abulón rojo *H. rufescens* alimentados con dietas con pigmentos (A = astaxantina, B = β -caroteno, C = cantaxantina) y dieta testigo (D) durante 90 días.

Figura 1. Calcite coloring of red abalone juveniles *H. rufescens* fed with diets supplemented with pigments (A = astaxanthin, B = β -carotene, C = cantaxanthin) and a control diet (D) during 90 days.

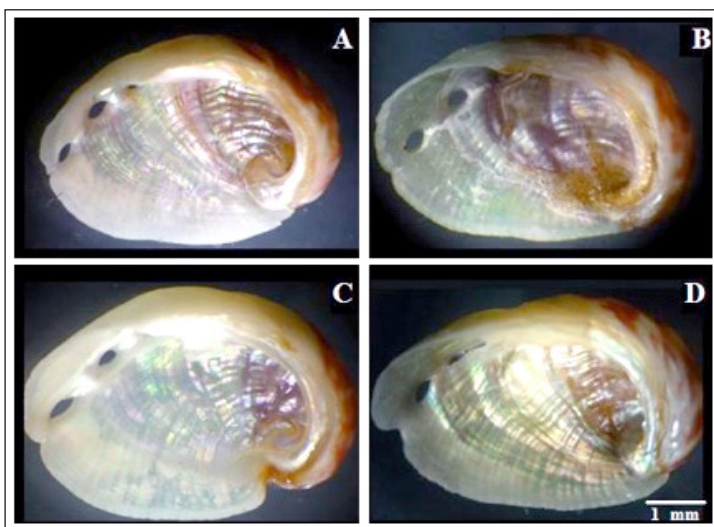


Figura 2. Coloración de la aragonita (nácar) de juveniles de abulón rojo *H. rufescens* alimentados con dietas con pigmentos (A = astaxantina, B = β -caroteno, C = cantaxantina) y dieta testigo (D) por 90 días.

Figure 2. Aragonite (nacre) coloring of red abalone juveniles *H. rufescens* fed with diets supplemented with pigments (A = astaxanthin, B = β -carotene, C = cantaxanthin) and a control diet (D) during 90 days.

Furthermore, it has been suggested that carotene absorption and transport is reduced with a low fat intake.²⁹ Thus, in further experiments, it would be convenient to increase the lipid content of the diets in order to observe if this increment favors the shell pigmentation even when it has been demonstrated that the abalone has a low capability of using fats.³⁰ In the short term, the pigments used in this study have shown excellent results on the color of other species, like tilapia, salmon, rainbow trout and shrimp.^{5-7,30} However, considering that those species color their tissues and the abalone colors its shell they also differ in having a different metabolic process and growth rate. Nava-Guerrero *et al.*¹⁸ report that the water-soluble pigments known as anthocyanins found in grapes may have a color effect on the abalone shell. These phenolic molecules are highly reactive and produce color depending on the pH.

Even after their breakdown, these substances continue their reactive activity (co-pigmentation, condensation and cycloaddition) and the color prevails

experimentales mostraron suficiente crecimiento para observar el cambio de coloración y así evaluar el efecto en la adición de pigmentos.

Los resultados obtenidos indican que aparentemente los pigmentos adicionados a las dietas fueron parcialmente asimilados. El cambio inicial de color (de rojo a blanco o verde) se debe al cambio de dieta que tuvieron los organismos (de alimento vivo *Navicula inserta* a dieta balanceada) como se ha documentado previamente¹⁰⁻¹¹ y corresponde a lo descrito por Leighton.²⁶ De igual manera, las coloraciones nacaradas observadas en todos los tratamientos son similares a lo señalado por Howorth.²⁷ No obstante, la aparición de zonas coloreadas y bandas con tonalidades amarillas en la concha de los organismos alimentados con dietas adicionadas con carotenos, próxima a la culminación del experimento (90 días) supone una asimilación parcial, gradual y discontinua del pigmento, como ocurre con los abalones en estado natural, los cuales, de acuerdo con Olsen,¹¹ pueden mostrar una coloración gradual

with only slight variations.³¹ The characteristics of the anthocyanin pigments include an easy assimilation as opposed to carotenes (long chain molecules, double links, conjugated system, hydrophobicity, and degree of sensitivity to heat and acids, among others).^{3,4} Thus, it would be of great interest to assess the effect of the use of grape pomace versus carotene pigments like those used in the present study.

On the other hand, Horiguchi *et al.*¹⁷ reported that after eight weeks of treatment, phycocyanins added to balanced diets had an effect over the shells external color and nacre of the Japanese abalone *H. discus hannai*. Both phycocyanins and carotenes are used as dyes; however, in Japan they are mostly used in frozen foods, alcoholic beverages and tobacco gums.^{32,33} Unlike carotenes, phycocyanins are chromoproteins (phycolibiproteins), and even if in both of them, the molecular structures work as secondary, photosynthetic pigments, phycocyanins are highly stable and water-soluble;³⁴ this favors their supplementation in diets overcoming carotenes due to the latter's fat solubility. This explains why phycocyanins are best digested by mollusks. Under these circumstances, and with no previous reports of the kind, the experiments were done using the pigment doses suggested for commercial fish diets,³⁵ which were most probably not enough to achieve the desired color, thus making it necessary in the future, to experiment with different levels of carotene and phycocyanin pigments in abalone diets.

This is the first experiment performed in Mexico with a commercial abalone species and one of the few in the world concerning the use of pigments to color the shell and nacre. Mainly, the results of this study show a change in the color tone of the shell due to the supplementation of carotene pigments in balanced diets for abalone. It is further suggested to study the effect of carotene, measuring color patterns, and using different pigment concentrations, during a minimum of six months.

Referencias

1. CLYDESDALE FM. Color as a factor in food choice. *Crit Rev Fd Sci Nut* 1993; 33:83-101.
2. SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION. Opinion on the use of canthaxanthin in feeding stuffs for salmon and trout, laying hens, and other poultry. May 3rd, Brussels: SCAN, 2002.
3. PETERSON WJ. The carotenoid pigments: Occurrence, properties, methods of determination, and metabolism by the hen. Kansas: Technical Bulletin Kansas Agricultural Experiment Station, 1939: 74.
4. ARMSOTRONG GA, HEARST JE. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 1996; 10: 228-237.

(de naranja a rosa) durante los primeros tres meses del incremento en la abundancia de algas rojas, hasta la aparición de bandas alimentarias de color rojo intenso, incluso cinco meses después de la abundancia máxima de estas algas.

Como ya se mencionó anteriormente, los abulones son incapaces de sintetizar carotenoides, por lo que éstos los adquieren aquéllos de la descomposición de algas.¹² Ben-Amotz y Yishai²⁸ y Mínguez-Mosquera *et al.*²⁹ señalan diferencias en la forma molecular del β -caroteno natural y sintético (cis y trans, respectivamente), incluso mencionan que el pigmento sintético es diez veces menos activo que el natural. Estas características se pueden atribuir a una dificultad del molusco para absorber, transportar y metabolizar el pigmento sintético, lo cual puede explicar la coloración parcial y la tonalidad presentada por los organismos de este experimento.

De igual manera, se ha sugerido que la absorción y transporte de carotenoides se reduce cuando el consumo de grasas es bajo,²⁹ por lo que en experimentos posteriores, sería conveniente incrementar el porcentaje de lípidos en la dieta, para observar si su aumento favorece la pigmentación en la concha, aun cuando se ha demostrado que el abulón posee poca capacidad de utilización de aceites.³⁰ Los pigmentos utilizados en este trabajo mostraron excelentes resultados a corto plazo en la coloración de otras especies, como la tilapia, salmón, trucha arcoiris y camarón.^{5-7,30} Sin embargo, aparte de que esas especies colorean sus tejidos y el abulón su concha, estos últimos difieren en la velocidad de sus procesos metabólicos y tasa de crecimiento. Nava-Guerrero *et al.*¹⁸ comentan que los pigmentos hidrosolubles conocidos como antocianinas encontrados en la uva pueden dar resultados en la coloración de la concha del abulón. Estas moléculas (fenólicas) son altamente reactivas y colorean en función del pH.

Aun después de su descomposición, los productos continúan reaccionando (copigmentación, condensación y cicloadición), y el color perdura con ligeras variantes.³¹ Las características de los pigmentos antocianos suponen una fácil asimilación en contraste con las propias de los carotenos (cadena larga, dobles enlaces, fenómenos de conjugación hidrofobicidad, grado de sensibilidad al calor y acidez, entre otros),³⁴ por lo que será de gran interés medir el efecto del uso de harina de mosto de uva en relación con los alimentados con dietas conteniendo carotenos, como los del presente trabajo.

Por otra parte, Horiguchi *et al.*¹⁷ notifican que en ocho semanas de experimentación, la ficocianina adicionada a dietas balanceadas incidió en la coloración externa y en el nácar de la concha del abulón japonés *H. discus hannai*. Las ficocianinas, al igual que los carotenos, se utilizan como colorantes;

5. TORRISEN OJ, HARDY RW, SHEARER KD. Pigmentation of salmonids carotenoids deposition and metabolism. CRC. Crit Rev Aquat Sci 1989; 1:209-225.
6. CASTRO-CAMPOS E, MENA LG. "25 Pigmentos Carotenoides – Rol nutricional en especies salmonídeas y fuentes de pigmentación", en Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas. AQUILA – Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para América Latina y el Caribe. Roma Italia: FAO, 1994; 269.
7. ÁLVAREZ-CAPOTE JS. Sustitución de harina de pescado por harina de soya e inclusión de aditivos en el alimento a fin de mejorar la engorda del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. (tesis doctoral). La Paz, BCS: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), 2007.
8. WADA KT, KOMARU A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker). Aquaculture 1996; 142: 25-32.
9. BRAKE J, EVANS F, LANGDON C. Evidence for genetic control of pigmentation of shell and mantle edge in selected families of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 2004; 229: 89-98.
10. LEIGHTON DL. Observations on the effect of diet on shell coloration in the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. Veliger 1961; 4: 29-31.
11. OLSEN D. Banding patterns of *Haliotis rufescens* as indicators of botanical and animal succession. Biol Bull 1968; 134: 139-147.
12. ROBERTSON R. Archaeogastropod biology and the systematics of the genus *Tricolia* (Trochacea: Tricoliidae) in the Indo-West-Pacific. Monogr Mar Mollusca 1985; 3: 1-103.
13. TAJIMA M, IKEMORI M, ARASAKI S. Abalone pigments originated from algal food - I. Chromatographic analysis of pigments in the shell of the abalone fed with green algae. Bull Jpn Soc Sci Fish 1980; 46: 445-450.
14. LINDBERG DR, PEARSE JS. Experimental manipulation of shell color and morphology of the limpets *Lottia asmi* (Middendorff) and *Lottia digitalis* (Rathke) (Mollusca : Patellogastropoda). J Exp Mar Biol Ecol 1990; 140: 173-185.
15. COMFORT A. The pigmentation of molluscan shells. Biol Rev 1951; 26: 285-301.
16. BARNARD W, DE WAAL D. Raman investigation of pigmentary molecules in the moluscan biogenic matrix. J Raman Spectrosc 2006; 37: 342-352.
17. HORIGUCHI Y, KIMURA S, UBINO R. [Pigmentation of the nacre of abalone on artificial diets supplemented with natural pigments] (en japonés con resumen en inglés). Tsue, Mie, Japan: Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University, 1987; 14: 101-111.
18. NAVA-GUERRERO R, VÁSQUEZ-PELÁEZ C, VIANA MT. Sustitución de la harina de *Macrocystis pyrifera* por harina de mosto de uva en alimentos balanceados para abulón azul (*Haliotis fulgens*). Cienc Marinas 2004; 30: 227-234.
19. FANKBONER PV. Pearl culture in abalone. INFOFISH Int 1991; 4: 52-55.
20. GONZÁLEZ-SAN MARTÍN A. Cultivo de perlas mabe: la

sin embargo, se emplean principalmente en comida congelada, bebidas alcohólicas y gomas de tabaco, y son utilizadas casi en su totalidad en Japón.^{32,33} A diferencia de los carotenos, las ficocianinas son cromoproteínas (ficobiliproteínas) y no obstante que la estructura molecular de ambos (carotenos y ficocianinas) comparten funciones como pigmento fotosintético secundario, las ficocianinas son altamente estables y solubles en soluciones acuosas,³⁴ lo cual favorece su inclusión en dietas, poniendo en desventaja a los carotenos por su liposolubilidad; ello explica que las ficocianinas las asimilen mejor los moluscos. En este contexto, debido a la falta de antecedentes en experimentos de esta índole, se experimentó con la dosis comercial recomendada para dietas de peces,³⁵ la cual pudo haber sido insuficiente para lograr la coloración esperada, por lo que será necesario experimentar con distintos niveles de los pigmentos en la dieta, tanto con carotenoides como con ficocianinas.

El experimento aquí descrito es el primero que se desarrolla con una especie de abulón comercial en México, y de los pocos trabajos que existen en el mundo sobre uso de pigmentos para la coloración de la concha/nácar. Los presentes resultados muestran, en general, un cambio en la tonalidad de la coloración de la concha en los tratamientos experimentales, atribuible a la adición de carotenos a dietas balanceadas para abulón. Se sugiere estudiar su efecto a través de medir patrones de coloración a distintas concentraciones de los pigmentos y durante seis meses, como tiempo mínimo, de experimentación para observar un posible patrón de coloración.

historia de uno de los proyectos más queridos de Roberto Angelini. Periódico El Mercurio, Sección Economía y Negocios. [Serie en línea: 2008 marzo 16] [Citado: 2008 octubre 27]. Disponible en: <http://diario.elmercurio.cl/detalle/index.asp?id=%7B0988484f-1441-4b11-8439-d96f15df8a63%7D>

21. FLEMING AE, VAN BARNEVELD RJ, HONE PW. The development of artificial diets for abalone. A review and future directions. Aquaculture 1996; 140: 5 – 53.
22. GOMEZ-MONTES L, GARCIA-ESQUIVEL Z, D'ABRAMO LR, SHIMADA AC, VÁSQUEZ-PELÁEZ C, VIANA MT. Effect of dietary protein:energy ratio on intake, growth and metabolism of juvenile green abalone *Haliotis fulgens*. Aquaculture 2003; 220: 769-780.
23. AOAC. Official methods of analysis. Washington DC: Association of Official Analytical Chemist, 1990: 1094.
24. TACON AJ. Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados. São Paulo Brasil: FAO, 1989.
25. SIGMA STAT 3.1. Richmond CA, USA: Systat Software Inc, 2004.
26. LEIGHTON DL. The biology and culture of the California Abalone Pittsburgh, Pennsylvania: Dorrance Publishing Co, 2000:216.

27. HOWORTH P. The abalone book. Happy Camp, CA, USA: Naturegraph Publishers. 1978.
28. BEN-AMOTZ A, YISHAI L. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all- trans beta-carotene in human serum. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 729-734.
29. MÍNGUEZ-MOSQUERA MI, PÉREZ-GÁLVEZ A, HORNERO-MÉNDEZ D, JAREN-GALÁN M. "Carotenoides" en Los aceites y grasas: composición y propiedades. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros, 2006.
30. DURAZO-BELTRAN E, VIANA MT, D'ABRAMO LR, TORO-VAZQUEZ JF. Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture* 2003; 224:257-270.
31. CASSASA F, CATANIA CD. Piranoantocianos, nuevos pigmentos en los vinos tintos. Aspectos científicos e implicaciones tecnológicas. *Rev Enología* 2006; 3:1-23.
32. HERRERA A, BOUSSIBA S, NAPOLEONE V, HOHLBERG A. Recovery of c-phycoerythrin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J of Appl Phycol* 1989; 1: 325-331.
33. PRASANNA R, SOOD A, SURESH A, NAYAK S, KAUSHIK BD. Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Bot Hung* 2007; 49: 185-210.
34. EL-BAKY HHA. Over production of phycoerythrin pigment in blue green algae *Spirulina* sp. and its inhibitory effect on growth of erlich ascites carcinoma cells. *J Med Sci* 2003; 3: 314-324.
35. HARDY RW, BARROWS FT. "Diet formulation and manufacture" In *Fish Nutrition*. San Diego, CA: Elsevier Science, 2002.