

استخراج اتانولی و جزء گیری حلال-حلال ترکیبات ضد اکسیدانی جلبک سبز (*Enteromorpha intestinalis*)

الهام هاشم دباغیان^۱ مسعود رضائی^{۲*} مهدی طبرسا^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲. استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳. استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۹

چکیده

ترکیبات ثانویه جلبک سبز *Enteromorpha intestinalis* استخراج و خواص ضد اکسیدانی آن مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره خام جلبک با اتانول ۹۶ درصد در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت استخراج و سپس به ترتیب توسط حلال های هگزان، کلروفرم، اتیل استات، بوتانول و آب جزء گیری گردید. بازده استخراج برای عصاره خام ۳/۱۷٪ و برای فراکسیون های بدست آمده بین ۴۰/۸۳-۴/۰۷٪ متغیر بود. عصاره خام و فراکسیون های تهیه شده واجد پتانسیل مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۰/۷۲-۰/۲۲٪)، رادیکال ABTS (۰/۶۲-۰/۲۵٪)، کاهندگی آهن (۰/۸۲-۰/۲۵٪) و ضد اکسیدانی کل (۰/۱۷-۰/۳۴ Abs) بودند که در این میان فراکسیون اتیل استات بیشترین فعالیت ضد اکسیدانی را در کلیه آزمایشات از خود نشان داد. بعلاوه، در بین نمونه های عصاره خام و فراکسیون ها، بوتانول (۲۴ میلی گرم تانیک اسید در گرم عصاره) و اتیل استات (۲۲ میلی گرم تانیک اسید در گرم عصاره) واجد بیشترین میزان ترکیبات فنولی تشخیص داده شدند. به طور کل نتایج مطالعه حاضر نشان داد، که عصاره اتیل استات جلبک *E. intestinalis* واجد ترکیبات زیست فعال عمده بوده و می تواند به عنوان ضد اکسیدان در صنایع غذایی مطرح باشد.

واژگان کلیدی: جلبک های دریایی، *Enteromorpha intestinalis*، ترکیبات فنولی، استخراج، ضد اکسیدان

۱. مقدمه

بیش از ۷۰ درصد سطح کره زمین را محیط های آبی پوشانده است که دارای تنوع زیستی گسترده ای می باشند. در سال های اخیر شمار زیادی از منابع دریایی توسط محققان به منظور یافتن ترکیبات زیست فعال جهت توسعه انواع داروها و غذاهای سالم جدید مورد بررسی قرار گرفته اند (Huimin *et al.*, 2005). در این میان، ماکرو جلبک ها به عنوان گزینه ای مناسب و غنی از متابولیت های زیست فعال بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (Wang *et al.*, 2009; Nahas *et al.*, 2007). جلبک ها با توجه به دارا بودن تنوع گونه ای زیاد، پراکندگی گسترده و اختصاصی بودن بسیاری از ویژگی های فیزیولوژیکی و زیستی دارای اهمیت فوق العاده ای به منظور بررسی های علمی هستند. جلبک های دریایی به عنوان منابع تجدیدپذیر به صورت پرورشی و یا طبیعی مدت زمان زیادی است که در رژیم غذایی مردمان نواحی مختلف کره زمین به ویژه در کشورهای آسیایی مانند چین، ژاپن و کره استفاده می شوند (Wang *et al.*, 2009; Nahas *et al.*, 2007). تنها، میزان تولید جهانی جلبک های دریایی پرورشی در سال ۲۰۱۱ بیش از ۲۱ میلیون تن بوده است. از نظر تغذیه ای، جلبک ها غذاهایی کم کالری، همراه با مقادیر بالای مواد معدنی، فیبرهای غذایی، ویتامین ها، پروتئین ها و اسیدهای چرب چند غیر اشباع می باشند (Kuda *et al.*, 2005; Quiros *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2011). مقادیر این ترکیبات می تواند توسط پارامترهای محیطی نظیر نور، مواد مغذی، شوری و دمای آب تحت تاثیر قرار گیرد (Plaza *et al.*, 2008). اصولاً، جلبک های دریایی همانند دیگر گیاهان فتوسنتز کننده، در معرض نور شدید و غلظت بالای اکسیژن قرار می گیرند که این عوامل باعث تحریک تشکیل رادیکال های آزاد و دیگر عوامل اکسید کننده می شوند. اما عدم وجود خسارات اکسیداتیو در ترکیبات ساختاری آن ها (به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع) و ثبات آن ها در طول نگهداری نشان دهنده این است که سلول های جلبک های دریایی دارای سیستم های محافظت کننده در برابر اکسیداسیون هستند (Nahas *et al.*, 2007). در بین ترکیبات موجود در جلبک ها، ترکیبات ثانویه، به لحاظ

ویژگی های ضد اکسیدانی منحصر به فرد خود در نگهداری و محافظت از مواد غذایی در برابر اکسیداسیون شناخته شده می باشند (Ganesan *et al.*, 2008; Plaza *et al.*, 2008; Balboa *et al.*, 2013). به طور کلی، ضد اکسیدان ها، ترکیباتی هستند که با تبدیل رادیکال های آزاد یا رادیکال های پراکسی به ترکیبات غیر رادیکالی از طریق دادن الکترون، هیدروژن، شلاته کردن فلزات واسطه و حل کردن ترکیبات تولید کننده پراکسیداسیون از اکسایش جلوگیری می کنند (Ruberto *et al.*, 2001). اثرات رادیکال های آزاد فعال مانند $\text{OH}\cdot$ ، O_2^- ، COO^- سیستم های زنده همواره موضوع تحقیقات فراوانی بوده است (Ruberto *et al.*, 2001). این ترکیبات بسیار ناپایدار و فعال هستند و از طریق واکنش های زنجیره ای اثرات مخربی بر سلول های زنده، DNA و غشاهای سلولی دارند که از آن جمله می توان به جهش های منجر به مرگ سلولی یا سرطان، دیابت، عملکرد غیرعادی ریوی، دیستروفی عضلانی، آب مروارید، ورم مفاصل، تصلب شرائین، آسیب های بافتی و بعضی عوارض و اختلالات عصبی مانند آلزایمر اشاره نمود (Ruberto *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2008; Rastian *et al.*, 2007; Chew *et al.*, 2008; Ganesan *et al.*, 2008). تحقیقات نشان داده است که ضد اکسیدان های طبیعی می توانند به عنوان جایگزین برای ضد اکسیدان های مصنوعی به کار روند؛ این ترکیبات نسبت به ضد اکسیدان های مصنوعی معمولاً ضرر کمتری دارند و همچنین ثابت شده است که دارای اثر برابر و یکسانی با اغلب ضد اکسیدان های مصنوعی که اثرشان روی بازدارندگی از اکسیداسیون بافت مورد توجه قرار گرفته است، هستند (Cao *et al.*, 1993). ضد اکسیدان های مورد استفاده در صنایع غذایی باید غیر سمی، موثر در غلظت های کم و ارزان قیمت باشند و در طی فرآوری، کمترین تغییر را در رنگ، بو و طعم ماده ی غذایی ایجاد کنند. اثرات نامطلوب ضد اکسیدان های مصنوعی مانند جهش زایی، ایجاد مسمومیت و سرطان زایی سبب شده است که استفاده از ضد اکسیدان های طبیعی که اثرات محافظتی در برابر بیماری های مزمن، سرطان، دیابت، بیماری های قلبی و عروقی، آلزایمر، آب مروارید و جهش زایی دارند، توصیه شود (Sakanaka *et al.*,)

صورت پودر درآمدند. پودرهای آسیاب شده از الک عبور داده شده و تا زمان انجام آزمایش ها در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد در فریزر نگهداری گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

۲.۲. استخراج عصاره خام

جهت تهیه عصاره خام، پودر آسیاب شده با اتانول ۹۶ درصد به نسبت ۴ به ۱ (اتانول به جلبک) مخلوط و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت غوطه ور شد. سپس، فاز مایع توسط قیف بوختر و کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردید. این مرحله سه بار تکرار شد تا تخلیه کامل پودر جلبکی از رنگدانه صورت گیرد. فاز مایع حاصل، با دستگاه روتاری تغلیظ و سپس با دستگاه آون خلا (ممرت، UF55) و یا خشک کن انجمادی (اپرن، FDCF-12012) خشک شد. عصاره ی به دست آمده در این مرحله عصاره خام (Cr) نام گذاری گردید.

۳.۲. جزء گیری با روش حلال-حلال

به منظور جداسازی ترکیبات بدست آمده، ابتدا عصاره خام خشک شده در آب مقطر معلق و سپس با روش جزء بندی حلال-حلال به ترتیب با استفاده از حلال های آلی هگزان (Hx^1)، کلروفرم (Ch^2)، اتیل استات (Et^3) و بوتانول (But^4) جداسازی ترکیبات صورت پذیرفت. در انتها نیز از آب (DW^5) جهت جداسازی ترکیبات قطبی استفاده شد. تمام اجزای به دست آمده به همراه جزء آبی توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی تغلیظ و سپس توسط دستگاه آون خلا و یا فریز درایر خشک شدند. در انتها، عصاره و اجزای به دست آمده تا زمان انجام آزمایش های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۴.۲. ارزیابی فعالیت ضد اکسیدانی

۱.۴.۲. قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH

تعیین قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد

(2005). همچنین در سال های اخیر مصرف کنندگان تمایل بیشتری برای استفاده از نگهدارنده های طبیعی به جای نگهدارنده های مصنوعی نشان می دهند و این امر باعث شده تا مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گیرد (Sathivel et al., 2007).

در ایران، پیش از این مطالعات مفیدی در رابطه با جلبک های دریایی صورت پذیرفته است که از جمله آن ها می توان به ترکیبات مغذی جلبک های *Ulva pertusa* و *Gracilaria salicornia* (Tabarsa et al., 2012)، بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی متابولیت ثانویه جلبک *E. intestinalis* و تاثیر آن بر پاتوژن های مواد غذایی (خضری احمد آباد و همکاران، ۱۳۹۳)، بکارگیری امواج مایکروویو در استخراج ترکیبات ضد اکسیدانی از جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* (گرمسیری و همکاران، ۱۳۹۳) و استفاده از امواج مایکروویو جهت استحصال ترکیبات ضد اکسداسیونی از جلبک قهوه ای *Sargassum angustifolium* (باباخانی و همکاران، ۱۳۹۱) اشاره نمود. با این وجود، علیرغم پراکنش وسیع جلبک *E. intestinalis* در سواحل جنوبی دریایی خزر، مطالعه ای در خصوص ترکیبات ضد اکسیدانی آن صورت نپذیرفته است. لذا، مطالعه حاضر در پی آن می باشد تا با استفاده از حلال های مختلف نسبت به استخراج و تخلیص مقدماتی ترکیبات ضد اکسیدانی جلبک سبز *E. intestinalis* پردازد.

۲. مواد و روشها

۱.۲. مواد و محلول ها

جلبک سبز *Enteromorpha intestinalis* از سواحل جنوبی دریای خزر شهرستان نور در بهار ۱۳۹۳ و در هنگام صبح جمع آوری شد. پس از چند مرحله شستشو با آب دریا جهت حذف باقیمانده اپی فیت ها، شن، ماسه و نمک از جلبک ها، نمونه های جلبکی دوباره با آب شیرین شستشو شدند و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۴ روز خشک شدند. سپس در یک دستگاه آسیاب تا حد امکان به

³ Ethyl acetate

⁴ Butanol

⁵ Distilled water

^۱ Hexane

² Chloroform

۳.۴.۲. قدرت کاهندگی آهن (FRAP)

جهت سنجش قدرت کاهندگی آهن، ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات 0/1 مولار (pH= 6/6) و ۵۰۰ میکرولیتر از فری سیانید پتاسیم ۱٪ با ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نمونه (۵۰۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس به آن ۵۰۰ میکرولیتر اسید تری کلرو استیک ۱۰٪ اضافه گردید. در ادامه، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در 15000 rpm، سانتریفیوژ شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از لایه رویی محلول برداشته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آهن (III) اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگهداری محلول ها در درمای محیط، جذب نمونه ها توسط دستگاه ELISA Reader در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. در انتها، قدرت کاهندگی آهن بر حسب فعالیت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اسید آسکوربیک بیان شد (Yen and Chen, 1995).

۴.۴.۲. فعالیت ضد اکسیدانی کل (TAC)

جهت اندازه گیری فعالیت ضد اکسیدانی کل عصاره های جلبکی، میزان ۳۰ میکرولیتر از غلظت های نمونه ها (۵۰۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با ۳۰۰ میکرولیتر محلول معرف (شامل نسبت ۱:۱:۱: از سولفات سدیم ۲۸ میلی مولار، مولیدات آمونیوم ۴ میلی مولار و اسید سولفوریک ۰/۶ مولار) در میکروتیوب ها مخلوط شد. میکروتیوب ها حمام آبی (دمای ۹۵ درجه سانتیگراد) به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه ها در دمای اتاق، میزان جذب آن ها توسط دستگاه ELISA Reader (Prieto *et al.*, 1999) در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد.

۵.۴.۲. اندازه گیری مقدار فنول کل

اندازه گیری مقدار فنول کل با استفاده از روش فولین-سیوکالتو که توسط Kahkonen و همکاران (1999) و با اندکی تغییر انجام شد. مقدار ۴۰ میکرولیتر از نمونه ها (۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به ۱۶۰ میکرولیتر آب مقطر به طور اضافه شد. سپس

DPPH، مطابق روش Brand-Williams و همکاران (1995) با اندکی تغییر انجام گرفت. به طور مختصر، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اتانولی 0/1 میلی مولار رادیکال آزاد DPPH در پلیت های ۹۶ عددی با ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ها (۲۰۰-۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، ضد اکسیدان های سنتزی BHT و اسید آسکوربیک (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و آب مقطر به عنوان کنترل مخلوط شد. سپس پلیت حاوی نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفت. جذب نمونه ها، با استفاده از دستگاه ELISA Reader و در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH توسط عصاره ها، مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$RSA \% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

در فرمول فوق RSA، عبارتست از درصد خنثی کنندگی رادیکال های آزاد؛ A₀، جذب کنترل بعد از زمان ۳۰ دقیقه؛ A₁ جذب نمونه بعد از زمان ۳۰ دقیقه.

۲.۴.۲. قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد ABTS

جهت اندازه گیری قدرت مهار کنندگی عصاره های به دست آمده از روش استفاده شد. ابتدا ۱/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۷ میلی مولار ABTS (ترکیب شده با پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار) به درون لوله های آزمایش حاوی ۰/۵ میلی لیتر نمونه (۲۰۰-۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) اضافه شد. سپس محلول حاصل ب مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. در انتها جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. درصد مهار کنندگی رادیکال های آزاد ABTS توسط عصاره ها، مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$RSA \% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

در فرمول فوق RSA، عبارتست از درصد خنثی کنندگی رادیکال های آزاد؛ A₀، جذب کنترل بعد از زمان ۳۰ دقیقه؛ A₁ جذب نمونه بعد از زمان ۳۰ دقیقه.

۳. نتایج

۳.۱. بازده عصاره و فراکسیون های جلبک سبز *E. intestinalis*

در تحقیق حاضر، محلول ۹۶٪ اتانول جهت استخراج عصاره ی جلبک سبز *Enteromorpha intestinalis* استفاده شد و بازده ۳/۱۷٪ برای عصاره خام اتانولی بدست آمد. با استفاده از روش جزء گیری حلال-حلال که جداسازی بر پایه قطبیت های متفاوت حلال ها می باشد، با بکارگیری حلال های هگزان، کلروفرم، اتیل استات، بوتانول و آب، پنج فراکسیون بدست آمد. میزان بازده به دست آمده برای فراکسیون های مختلف در بازه ۴۰/۸۳٪-۴/۰۷٪ محاسبه گردید. در بین فراکسیون ها، بالاترین بازده مربوط به هگزان بود و بعد از آن به ترتیب، فراکسیون های بوتانول، کلروفرم، اتیل استات و آب قرار داشتند ($p < 0.05$) (جدول ۱).

۱۰۰ میکرولیتر محلول معرف فولین سیوکالتو (۰/۱ M) و ۵۰۰ میکرولیتر محلول سدیم کربنات ۱۲/۵٪ (w/v) به نمونه ها اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب نمونه ها در طول موج ۷۵۰ nm با دستگاه ELIZA Reader خوانده شد. در انتها، نتایج بر حسب میلی گرم تانیک اسید بر گرم عصاره بیان گردید.

۵.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تمامی تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 صورت پذیرفت. جهت تشخیص وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار بین نمونه ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد و برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن استفاده گردید. جهت بررسی همبستگی بین ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز از نرم افزار Excel استفاده شد. تمامی آزمایشات نیز در سه تکرار انجام شد.

جدول ۱. بازده عصاره خام و فراکسیون های مختلف جلبک *E. intestinalis*. حروف ناهمسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می باشد.

نمونه	عصاره خام (Cr)	هگزان (Hx)	کلر فرم (Ch)	اتیل استات (Et)	بوتانول (But)	آب (DW)
بازده (%)	۳/۱۷	۴۰/۸۳ ^a	۹/۲۵ ^c	۷/۴۸ ^d	۱۳/۱۳ ^b	۴/۰۷ ^e

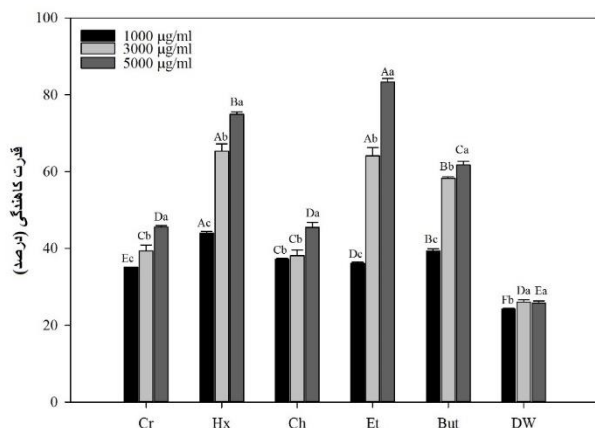
و یا ترکیبات خالص شده حاصل از آنها به عنوان مهارکننده رادیکال آزاد و یا دهنده الکترون استفاده می شود. قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH[•] توسط عصاره خام جلبک *E. intestinalis* و فراکسیون های آن در شکل ۲ نمایش داده شده است. میزان مهار رادیکال های آزاد در عصاره خام بین ۳۵٪-۵۵٪ درصد تعیین شد و همانگونه که نتایج نشان می دهد جزء گیری از عصاره خام توانسته است فراکسیون هایی با قدرت های متفاوت مهار کنندگی رادیکال آزاد در اختیار قرار دهد. در فراکسیون ها، محدوده ۲۲٪-۲۲٪ جهت مهار رادیکال آزاد DPPH[•] مشاهده شد که در این میان بالاترین درصد مهار کنندگی را فراکسیون اتیل استات دارا بود ($p < 0.05$). پتانسیل فراکسیون اتیل استات در مهار رادیکال های DPPH[•] در حداکثر غلظت قابل مقایسه با پتانسیل مهار کنندگی اسید آسکوربیک و بوتیل

۲.۳. قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH[•]

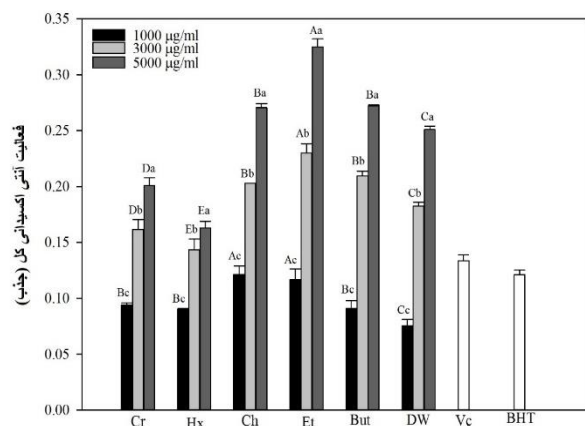
در این مطالعه روش سنجش قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH[•] جهت سنجش فعالیت ضد اکسیدانی عصاره خام و فراکسیون های به دست آمده از جلبک *E. intestinalis* به کار گرفته شده است. این روش بر پایه کاهش رادیکال های آزاد DPPH[•] به عنوان یک رادیکال آزاد پایدار، استوار می باشد. رادیکال های آزاد DPPH[•] به دلیل دارا بودن الکترون منفرد، واجد رنگ بنفش بوده و حداکثر جذب نوری در طول موج ۵۱۷ نانومتر را دارا هستند. هرچه الکترون های منفرد رادیکال آزاد DPPH[•] در حضور یک دهنده هیدروژن مثل یک ضد اکسیدان مهار کننده رادیکال آزاد جفت می شوند، میزان جذب کاهش میابد و در نتیجه رنگ محلول زرد می شود (Blois, 1985). این واکنش به طور وسیعی برای بررسی توانایی عصاره های گیاهی و فراکسیون ها

۳.۳. قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS

در این آزمایش، نمونه های عصاره و فراکسیون‌ها به رادیکال آزاد $2,2\text{-azino-bis(3-)}\text{ABTS}^+$ اضافه (ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) شد که در نتیجه رنگ سبز-آبی آن پس از کاهش به ABTS دچار تغییر گردید.

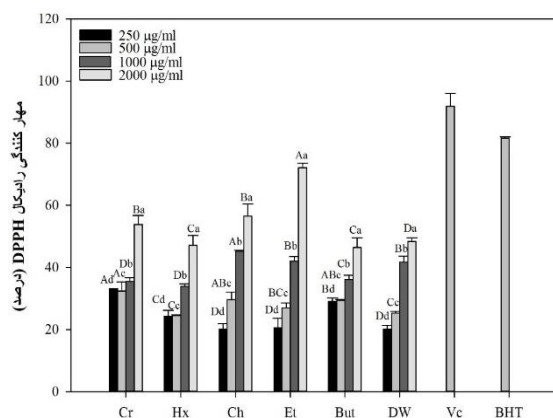


شکل ۳. قدرت کاهندگی آهن (FRAP) عصاره خام (Cr) و فراکسیون های مختلف هگزان (Hx)، کلروفورم (Ch)، اتیل استات (Et)، بوتانول (But) و آب (DW) در جلبک *E. intestinalis* نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می باشد.

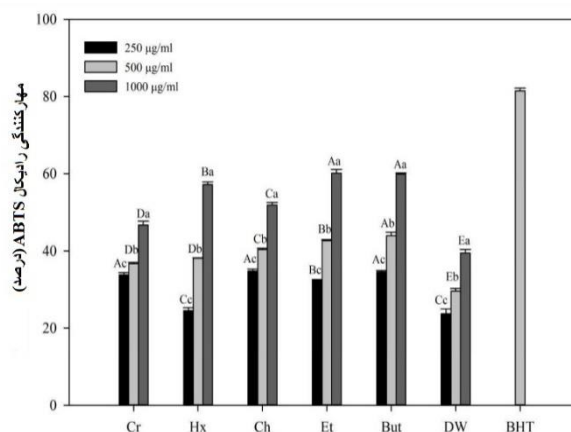


شکل ۴. فعالیت ضد اکسیدانی کل توسط عصاره خام (Cr) و فراکسیون های مختلف هگزان (Hx)، کلروفورم (Ch)، اتیل استات (Et)، بوتانول (But) و آب (DW) در جلبک *E. intestinalis* نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می باشد.

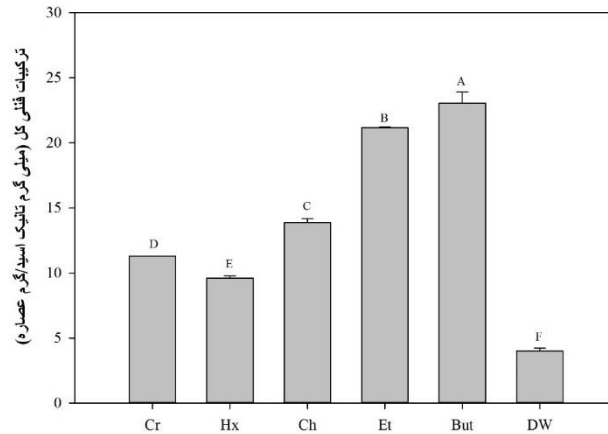
هیدروکسی تولوئن بود. همچنین میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد در فراکسیون اتیل استات وابسته به غلظت بود و با رشد غلظت افزایش معنی دار پیدا کرد ($p < 0.05$). بر این اساس می توان نتیجه گرفت که فراکسیون اتیل استات مهارکننده خوبی برای رادیکال های آزاد DPPH می باشد.



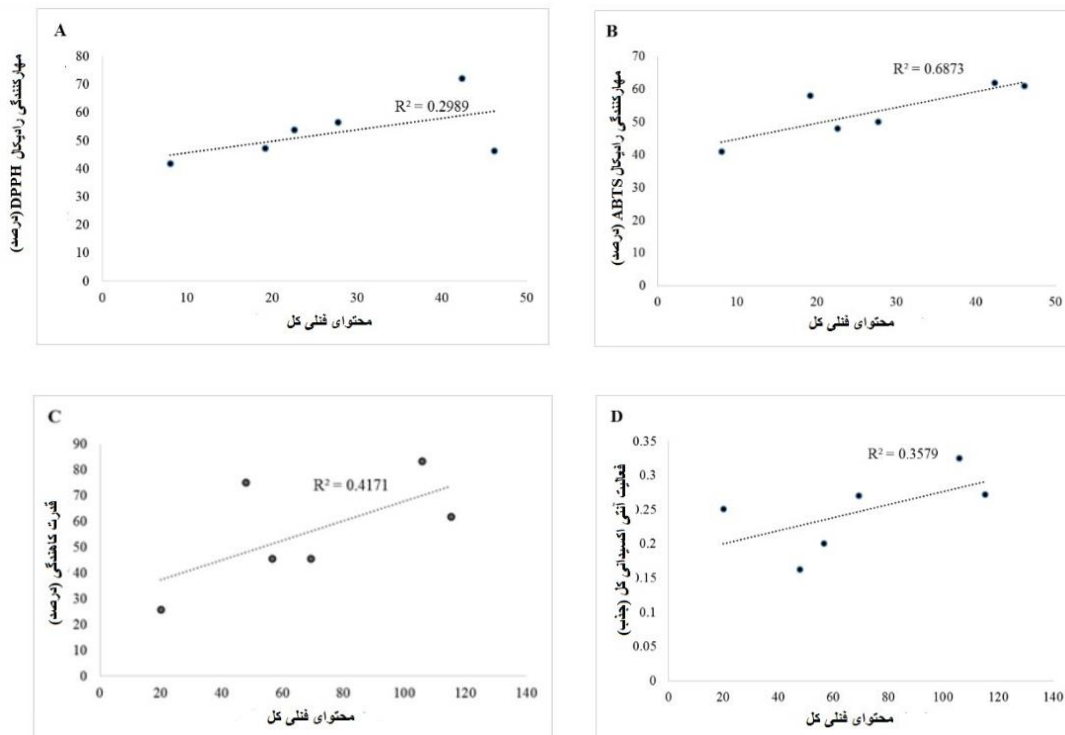
شکل ۱. فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH وسط عصاره خام (Cr) و فراکسیون های مختلف هگزان (Hx)، کلروفورم (Ch)، اتیل استات (Et)، بوتانول (But) و آب (DW) در جلبک *E. intestinalis*. حروف ناهمسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۲. فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد ABTS توسط عصاره خام (Cr) و فراکسیون های مختلف هگزان (Hx)، کلروفورم (Ch)، اتیل استات (Et)، بوتانول (But) و آب (DW) در جلبک *E. intestinalis*. حروف ناهمسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۵. مقدار ترکیبات فنولی کل وسط عصاره خام (Cr) و فراکسیون های مختلف هگزان (Hx)، کلروفورم (Ch)، اتیل استات (Et)، بوتانول (But) و آب (DW) در جلبک *E. intestinalis*. حروف ناهمسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین داده ها در سطح ۹۵ درصد ($p < 0.05$) می باشد.



شکل ۶. همبستگی بین میزان ترکیبات فنولیک و فعالیت های ضد اکسیدانی عصاره خام و فراکسیون های جلبک *E. intestinalis*.

ABTS را کاهش دهند. در بین نمونه های آزمایش شده، عصاره های اتیل استات و بوتانول بیشترین عصاره آبی کمترین پتانسیل را در کاهش رادیکال های آزاد ABTS از خود نشان دادند ($p < 0.05$). در تمامی نمونه ها میزان کاهش رادیکال های آزاد ABTS دارای رابطه مستقیم با غلظت نمونه های مورد آزمایش بود و با افزایش غلظت افزایش یافت.

به طور کلی گفته شده است که روش سنجش قدرت کاهش رادیکال آزاد ABTS به دلیل قابلیت استفاده از این رادیکال در هر دو محیط آبی و آبی و همچنین زمان واکنش کوتاه تر بر استفاده از رادیکال آزاد DPPH ارجحیت دارد (Kim et al., 2002). همانطور که در شکل ۲ نمایش داده شده است، کلیه نمونه ها در غلظت های ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانستند در سطوح مختلف ۲۵٪ تا ۶۲٪ رادیکال آزاد

۴. بحث و نتیجه گیری

به علت پیچیدگی و تنوع ترکیبات موجود در جلبک های دریایی، جزءگیری و پیرو آن آنالیز فراکسیون های به دست آمده، روشی موثر جهت یافتن ترکیبات زیست فعال با پتانسیل زیستی می باشد (Yesilada et al., 2000). لذا در مطالعه حاضر، پس از استخراج کل محتوای ترکیبات ثانویه جلبک سبز *E. intestinalis*، اقدام به جداسازی ترکیبات به دست آمده به کمک حلال های مختلف گردید. بازده استخراج در این پژوهش (۳/۱۷٪) مطابق با مقادیر گزارش شده در دیگر انواع جلبک های دریایی در محدوده ی ۱۲/۷-۲/۹٪ بود (Ganesan et al., 2009; Ye et al., 2008). این تفاوت های قابل ملاحظه در میزان عصاره های بدست آمده از جلبک های دریایی مختلف ممکن است در نتیجه تفاوت های گونه ای و شرایط متنوع استخراج از قبیل نوسانات در حلال ها، دما و زمان استخراج باشد.

به دلیل وجود ترکیبات مختلف ضد اکسیدانی در نمونه های حاصل از بافت های زیستی، اندازه گیری همه ترکیبات ضد اکسیدانی موجود در آنها به طور جداگانه مشکل است. بنابراین، در سال های اخیر جهت نشان دادن و اندازه گیری فعالیت ضد اکسیدانی این قبیل نمونه ها، روش های آزمایشی متفاوتی توسعه یافته اند که از جمله آنها می توان به فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ABTS، پتانسیل کاهندگی آهن و فعالیت ضد اکسیدانی کل اشاره نمود (Prabhakar et al., 2006; Wangenstein et al., 2006).

در این مطالعه، همانطور که گفته شد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در فراکسیون اتیل استات از بقیه فراکسیون ها بیشتر و قابل مقایسه با آن در ضد اکسیدان های طبیعی بود که از میوه جات، سبزیجات و گیاهان دارویی استخراج شده است (۷۸/۳-۶۵/۹٪ در غلظت های ۰/۱-۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر) (Afloyan et al., 2008; Prasad et al., 2009; Shyu et al., 2009). البته، میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH در برخی از مطالعات بسیار ناچیز گزارش شده است. به طور مثال، در تحقیق Ganesan و همکاران (2008)، بیشترین

مقدار فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH برای جلبک های *Euchema kappaphycus*، *Acanthophora spicifera*، *Gracilaria edulis* به ترتیب مربوط به عصاره خام (۱۱/۹۰٪)، فراکسیون پترولیم اتر (۵/۲۰٪)، پترولیم اتر (۱۲٪)، فراکسیون اتیل استات (۲/۳۳٪)، فراکسیون آبی (۲/۱۷٪) و فراکسیون دی کلرو متان (۲/۷۹٪) بود.

اندازه گیری پتانسیل مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS نیز نتایج مشابهی را نشان داد و حاکی از فعالیت حداکثری فراکسیون اتیل استات در مقایسه با سایر فراکسیون ها بود. البته، نتایج مطالعات پیشین بر روی گونه های جلبکی *Scytosiphon lomentaria* و *Agarum cribrosum*، *Chorda filum* و *Desmarestia viridis* نیز نشان داد که استفاده از حلال های مختلف می تواند عصاره هایی با پتانسیل های گوناگون در کاهش رادیکال های آزاد ABTS به دست دهد (Cho et al., 2013).

در ارتباط با قدرت کاهندگی آهن نیز، نتایجی تقریباً مشابه در مورد عصاره جلبک *E. compressa* و فراکسیون های حاصل از آن با روش جزء بندی حلال-حلال مشاهده شد که در آن، فراکسیون کلروفرم (۱۵۸/۳٪) قدرت کاهندگی آهن قوی تری را نسبت به فراکسیون هگزان (۹۸/۳٪)، اتیل استات (۸۸/۵٪) و فراکسیون آبی (۵۲/۶٪) نشان داد (Cho et al., 2010). کاهنده ها می توانند با دادن یک اتم هیدروژن و شکستن زنجیره های رادیکال آزاد، اثر ضد اکسیدانی خود را اعمال کنند (Gordon et al., 1990; Qi et al., 2005). به طور کلی، قدرت کاهندگی ترکیبات، شاخص قابل توجهی جهت بیان پتانسیل ضد اکسیدانی آن ها به شمار می رود (Meir et al., 1995). این روش بر مبنای افزایش جذب واکنش بنا شده است. افزایش در جذب، افزایش در فعالیت ضد اکسیدانی را نشان میدهد. در این روش، ترکیبات ضد اکسیدانی در حضور پتاسیم فری سیانید، تری کلرو استیک اسید و فریک کلراید، تشکیل یک کمپلکس رنگی می دهند که جذب آن در طول موج ۷۰۰ nm اندازه گیری می شود. افزایش جذب مخلوط واکنش، قدرت کاهندگی نمونه مورد آزمایش را نشان می دهد (Jayaprakash et al., 2001). عقیده بر این است که ارتباطی بین فعالیت ضد

اکسیدانی *Gracilaria edulis* نیز بیشترین مقدار فعالیت ضد عصاره پترولیوم اثر و کمترین مقدار در عصاره متانولی مشاهده شد. در مورد جلبک *Acanthophora spicifera* نیز بیشترین مقدار مربوط به فراکسیون اتیل استات و کمترین مقدار مربوط به فراکسیون پترولیوم اثر بود. فعالیت های بالاتر در فراکسیون ها ممکن است در اثر دخالت دیگر ترکیبات موجود در عصاره خام باشد و همچنین گزارش شده است که حلال های به کار برده شده برای استخراج، تاثیر بسیار زیادی بر روی خصوصیات شیمیایی دارد (Yuan et al., 2005).

میزان ترکیبات فنولی عصاره های تهیه شده در مطالعه حاضر در محدوده ۶/۷ تا ۵۱/۰ میلی گرم در گرم عصاره بود که مطابق با گزارشات پیشین می باشد (Cho et al., 2010; Lim et al., 2002). مواد ضد اکسیدانی در جلبک ها دارای ماهیت های متفاوتی هستند بطوری که ویتامین E (آلفاتوکوفرول) و کاروتنوئیدها در بخش محلول در چربی و ترکیبات فنولی در بخش محلول در آب شاخص هستند (Plaza et al., 2008). تحقیقات نشان داده است که جلبک های دریایی منبعی غنی از ضد اکسیدان های طبیعی همانند فنول ها می باشند که نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون چربی ایفا می کنند (Wang and Waller, 2006). این ترکیبات می توانند شروع اکسیداسیون چربی و تجزیه هیدروپروکسیدها را در محصولات غذایی به تاخیر بیاورند. ترکیبات فنولی موجود در جلبک ها دارای تفاوت هایی از نظر ساختار و تعداد گروه های هیدروکسیل می باشند که منجر به تفاوت در فعالیت های ضد اکسیدانی آنها می شود. میزان فعالیت ضد اکسیدانی این ترکیبات فنولی در مواد غذایی مختلف بسته به قطبیت و خصوصیات مولکولی، متفاوت است (Maqsood and Benjakul, 2010). فعالیت های ضد اکسیدانی ترکیبات فنولی از طریق مکانیسم های مختلفی مثل جذب رادیکال های آزاد، مهار کردن انواع اکسیژن یگانه، بازدارندگی آنزیم های اکسید کننده و شلاته کردن فلزات واسطه انجام می شود (Maqsood and Benjakul, 2010). گفته شده است که فعالیت ضد اکسیدانی عصاره های به دست آمده از جلبک های دریایی می تواند در ارتباط مستقیمی با مقدار کل ترکیبات فنولی آن ها

اکسیدانی و قدرت کاهندگی وجود دارد (Chandini et al., 2008). روش های مختلفی برای اندازه گیری قدرت و میزان کارآمدی یک ضد اکسیدان توسعه یافته اند. این روش ها مبتنی بر سیستم های دفاعی ضد اکسیدان ها بوده که پاکسازی انواع اکسیژن فعال، رادیکال های هیدروکسیل، کاهش رادیکال پروکسیل لیپیدی و یا فعالیت شلاته کنندگی آهن می باشد. اثر ضد اکسیدان ها در رابطه با میزان کاهنده ها بوده، موادی که به پایان رساننده واکنش های زنجیره ای رادیکال های آزاد می باشند (Wang et al., 2009). شاخص FRAP به میزان قابل توجهی برای اندازه گیری فعالیت ضد اکسیدانی به کار می رود در این تست حضور کاهنده ها در حلال باعث کاهش کمپلکس Fe^{3+} فری سیانید به شکل فرس Fe^{2+} می گردد و میزان Fe^{2+} از طریق جذب در ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری می شود (Ganesan et al., 2011).

در بررسی ای که Ganesan و همکاران (2011) بر سه گونه جلبک سبز *Enteromorpha* داشتند، عصاره متانول و استون بیشترین و عصاره آبی دارای کمترین میزان کاهندگی آهن بوده و در گونه *E. linza* عصاره استون بالاترین فعالیت کاهندگی را دارا بود. این خواص کاهندگی به حضور کاهنده ها بستگی دارد که منجر به شکست زنجیره اکسایش رادیکال آزاد می شود که به واسطه اهدای یک اتم هیدروژن است که منجر به تشکیل محصولات پایدار و پایان واکنش های رادیکال های آزاد می شود. این کاهنده ها با پیش سازهای خاص از پراکسیدها واکنش داده و از تشکیل پراکسید جلوگیری می کنند. ترکیباتی مانند پلی ساکارید ها، پروتئین ها یا پپتیدها در عصاره ها می توانند در فعالیت شلاته کنندگی فلزات نقش داشته باشند (Wang et al., 2009).

در یک مطالعه که بر روی گونه های مختلف جلبکی صورت گرفت، نتایج حاصل از سنجش قابلیت ضد اکسیدانی کل عصاره ها در جلبک های مختلف متفاوت گزارش گردید (Ganesan et al., 2008). در این تحقیق، بیشترین مقدار فعالیت ضد اکسیدانی کل گزارش شده برای جلبک *Euchema kappaphycus* مربوط به فراکسیون پترولیوم اثر و کمترین مقدار مربوط به فراکسیون بوتانول بود. در جلبک

به سایر فراکسیون ها در تمامی آزمایشات مهار رادیکال‌های آزاد DPPH, ABTS, کاهندگی آهن و ضد اکسیدانی کل را دارا بود. یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره استخراج شده از جلبک *E. intestinalis* واجد فعالیت ضد اکسیدانی قابل توجهی بوده و می تواند پس از انجام مطالعات تکمیلی در سیستم های غذایی به عنوان یک ضد اکسیدان طبیعی و ترکیب عملکردی مورد استفاده قرار گیرد. آزمایشات همچنین بیانگر آن است که جداسازی ترکیبات موثره عصاره خام این جلبک به کمک روش حلال-حلال نیز می تواند در دستیابی به خلوص بالاتر آن ها کمک شایانی نماید.

در انتها نیز باید بیان داشت که همبستگی بالایی بین محتوای ترکیبات فنولی فراکسیون های مختلف و فعالیت ضد اکسیدانی آن ها مشاهده نگردید که این خود می تواند احتمال حضور ترکیبات وابسته به کلروفیل مانند فتوفورید به عنوان عامل ضد اکسیدان را مطرح نماید. لذا در مطالعه آتی در پی آن خواهیم بود تا با تخلیص بیشتر عصاره اتیل استات با استفاده از کروماتوگرافی ستونی نسبت به دستیابی به زیرفراکسیون هایی خالص تر و هموزن تر اقدام نماییم.

باشد (Ganesan et al., 2008; Ye et al., 2009). فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد تا کنون، مطالعات متعددی همبستگی نزدیک بین فعالیت ضد اکسیدانی و میزان ترکیبات فنولی نشان داده اند (Duan et al., 2007; Pan et al., 2008; Li et al., 2009). البته، همسو با نتایج بدست آمده در مطالعه پیش رو، تحقیقات Lim و همکاران (2002) نیز فعالیت ضد اکسیدانی عصاره های استخراج شده از جلبک *S. siliquastrum* را مستقیماً با مقدار کل ترکیبات فنولی آن ها مرتبط ندانست. همچنین، عصاره‌ی استخراج شده از خیار دریایی *Cucumaria frondosa* نیز ارتباط کمی ($R^2=0.13$) را بین فعالیت ضد اکسیدانی و مقدار کل ترکیبات فنولی نشان داد (Mamelona et al., 2007). فنول ها، عواملی مهم در مهار رادیکال های آزاد DPPH بوده اما در برخی از گونه ها کاروتنوئید ها، اسیدهای چرب غیر اشباع و بعضی از ترکیبات با وزن مولکولی پایین مثل پلی ساکاریدها، پروتئین، پپتید و رنگدانه ها ممکن است در مهار این رادیکال آزاد دخالت داشته باشند (Souza et al., 2011). بطور کلی نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که فراکسیون اتیل استات فعالیت ضد اکسیدانی قابل توجهی را نسبت

References

- Adel, M., Abedian Amiri, A., Zorriehzakra, J., Nematollahi, A., Angeles Esteban, M., 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). *Fish and Shellfish Immunology* 45: 841-847.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture* 13, 265-272.
- Babalola, T. & Adebayo, M., 2007. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by *Heterobranchius longifilis* fingerlings. *Journal of fisheries international* 2, 60-64.
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A., Smullen, R. P. & Sargent, J. R., 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition* 132, 222-230.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Henderson, R. J., Dick, J. R. & Crampton, V. O., 2003. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of Nutrition* 133, 2793-2801.
- Bourauoi, L., Sanchez-Gurmaches, J., Cruz-Garcia, L., Gutierrez, J., Benedito-Palos, L., Perez-Sanchez, J., Navarro, I., 2011. Effect of dietary fish meal and fish oil replacement on lipogenic and lipoprotein lipase activities and plasma insulin in Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 17(1), 54-63.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Caballero, M., Izquierdo, M., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. & Rosenlund, G., 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325-340.
- Cahu, C., Infante, J. Z. & Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227,

- 245-258.
- Carey MC, Duane WC., 1994. Enterohepatic circulation. In: Arias IM, Boyer N, Fausto N, Jackoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, editors. The liver: biology and pathobiology New York (NY): Raven Press. p. 719-738.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M., Bergot, P. & Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155, 149-164.
- Craig, R.S and D.M. Gatlin III., 1997. Growth and body composition of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) fed diets containing lecithin and supplemental choline. *Aquaculture* 151, 259-267.
- Crespo, N. & Esteve-Garcia, E., 2003. Polyunsaturated fatty acids reduce insulin and very low density lipoprotein levels in broiler chickens. *Poultry science* 82, 1134-1139.
- D'Abramo, L. R., Bordner, C. E. & Conklin, D. E., 1982. Relationship between dietary phosphatidylcholine and serum cholesterol in the lobster (*Homarus* sp.). *Marine Biology* 67(2), 231-235.
- FAO, 2012. The state of World Fisheries and Aquaculture. *World Review of Fisheries and Aquaculture*.
- Fontagné, S., I. Geurden, A. M. Escaffre and P. Bergot., 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 16, 213-223.
- Fontagné, S., Pruszyński, T., Corraze, A.M., Bergot, P., 1999. Effect of coconut oil and tricaprylin vs triolein on survival, growth and fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 161, 213-223.
- Fontagne, S., Burtaine, L., Corraze, G. & Bergot, P., 2000. Effects of dietary medium-chain triacylglycerols (tricaprylin and tricaproin) and phospholipid supply on survival, growth and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 190, 289-303.
- Freed, L. M., York, C. M., Hamosh, M., Sturman, J. A. and Hamosh, P., 1986. Bile salt-stimulated lipase in non-primate milk: longitudinal variation and lipase characteristics in cat and dog milk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 878, 209-215.
- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Domezain, A., Domezain, J. & Sanz, A., 2008. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 149, 420-425.
- Geurden, I., N. Charlon, D. Marion and Bergot, P., 1997. Influence of purified soybean phospholipids on early development of common carp. *Aquaculture International* 5, 137-149.
- Geurden, I., Radünz-Neto, J., Bergot, P., 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 131, 303-314.
- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Cahu, C.L., 2005. Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass (*Dicentrarchus abrax*) development. *Lipids* 40, 1-10.
- Hamza, N., Mhetli, M., Khemis, I. B., Cahu, C. & Kestemont, P., 2008. Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Aquaculture* 275, 274-282.
- Hung, S.S.O., Berge, G.M., Storebakken, T., 1997. Growth and digestibility of soya lecithin and choline chloride in juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* 3, 141-144.
- Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 59-69.
- Izquierdo, M., Tandler, A., Salhi, M. & Kolkovski, S., 2001. Influence of dietary polar lipids' quantity and quality of ingestion and assimilation of labelled fatty acids by larval gilthead seabream. *Aquaculture Nutrition* 7, 153-160.
- Jones, D., Hancock, J., Harmon, D. and Walker, C., 1992. Effects of exogenous emulsifiers and fat sources on nutrient digestibility, serum lipids, and growth performance in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 70, 3473-3482.
- Kanazawa, A., 1983. Effect of phospholipids on aquatic animals. *Feed Oil Abst* 18: 1-5.
- Kanazawa, A., S. Teshima, S. Inamori, T. Iwashita and Nagao, A., 1981. Effects of phospholipids on survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ* 30, 301-309.
- Kasper, C. S. & Brown, P. B., 2003. Growth improved in juvenile Nile tilapia fed phosphatidylcholine. *North American journal of Aquaculture* 65, 39-43.
- Li, X.-F., Liu, W.-B., Jiang, Y.-Y., Zhu, H. & Ge, X.-P., 2010. Effects of dietary protein and lipid levels in practical diets on growth performance and body composition of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. *Aquaculture* 303, 65-70.
- Liu, J., Caballero, M. J., Izquierdo, M., El-sayed ali, T., Hernández-cruz, C., Valencia, A. & Fernández-palacios, H., 2002. Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fisheries science* 68, 1165-1172.
- Ng, W. K., Tocher, D. R. & Bell, J. G., 2007. The use of palm oil in aquaculture feeds for salmonid species. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 394-399.

- Olesen, N. Jand Jorgensen, P. E. V., 1986. Quantification of serum immunoglobulin in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) under various environmental conditions. *Diseases of Aquatic organisms* 1, pp: 183-189.
- Opsahl-Ferstad, H.-G., Rudi, H., Ruyter, B. & Refstie, S., 2003. Biotechnological approaches to modify rapeseed oil composition for applications in aquaculture. *Plant Science* 165, 349-357.
- Saito, H. & Ishihara, K., 1997. Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74, 1531-1536.
- Salhi, M., C.M. Hernandez-Cruz, M. Bessonart, M.S. Izquierdo and Fernandez-Palacios, H., 1999. Effect of different dietary polar lipid levels on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179: 253-263.
- Sargent, J., Mcevoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. & Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217-229.
- Seiliez, I., J.S. Bruant, J. Zambonino-Infante, S. Kaushik and Bergot, P., 2006. Effect of dietary phospholipid level on the development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae fed a compound diet. *Aquaculture Nutrition* 12: 372-378.
- Sotudeh, E., Abedian Kenari, A., Habibi Rezaei, M. 2011. Effects of Dietary Phosphatidylcholine on Growth Parameters, Liver Fatty acid Composition of Caspian Salmon (*Salmo trutta caspius*) Alevin. *Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources*. 64: 41-53. (in Persian)
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J. & Bell, J. G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280, 21-34.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E. & NG, W. K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1, 10-57.
- Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., Gabaudan, J. & Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 225, 371-386.
- Yamamoto, T., Suzuki, N., Furuita, H., Sugita, T., Tanaka, N. & Goto, T., 2007. Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science* 73, 123-131.

