University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 10, No. 1, 2024, pages: 27-41
DOI: 10.22124/janb.2024.26283.1229

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Determination of antioxidant and phytochemical properties of premix extract of brown macroalgae *Padinaaustralis, Sargassum licifolium* and *Stoechospermum marginatum* from Chabahar coast, Southeastern Iran

Paria Akbary
Fisheries Group, Department of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Sistan & Baluchistan, Iran

Received 20 December2023 Revised 12 March 2024 Accepted 15 March 2024

KEYWORDS
Padina australis
Sargassum ilicifolium
Stoechospermum marginatum
Sterol
Antioxidant status

ABSTRACT

Introduction: Macroalgae is one of the most important sources of cheap alternative feed for aquatic animals, which is also rich in nutritional and medicinal properties. Most importantly, they contain a wide range of bioactive agents such as phenols, sterols and flavonoids, many of which are not commonly found in land plants. These bioactives, including phenols and macroalgae extracts containing these compounds, have been investigated as feed additives in aquatic nutrition. Like other organisms, polyphenols have beneficial properties such as antimicrobial and antioxidant properties that improve growth performance, nutrient utilization, immunity, and disease resistance. The aim of this study was to investigate the phytochemical compounds (sterol, phenol and flavonoids) and grinding each of the macroalgae by an electric mill (Moulinex model), antioxidant activity (diphenylpicryl hydrazyl (DPPH)) of premix extracts of brown macroalgae *Padina australis*, *Sargassum ilicifolium* and *Stoechospermum marginatum*.

Materials and methods: Brown macroalgae *Sargassum ilicifolium*, *Nizimuddinia zanardini*, *Cystoseria indica*, *Padina australis* and *Stoechospermum marginatum* were collected from Chabahar shores during low tide in December 2022 and after being transported to the laboratory, they were rinsed with freshwater to remove debris. Then they were dried in the shade and at the room temperature (25 °C). After grinding in a mixer, and turning into powder the algae were combined in a ratio of 1:1:1. Sterol was measured by gas chromatography, while phenol, flavonoids and antioxidant activity were measured by

spectrophotometer. Statistical data analyses were performed using SPSS software and based on One-Way ANOVA test. The normality of the data was checked using the Kolmogorov-Smirnov test and the equality of variances was checked using the Levene test. After determining the significance of the difference between the means, Duncan's multi-range test was used to rank them at the probability level of $p<0.05$.

Results: The results showed that sterol was the predominant sitostanol. The amount of total sterol, cholesterol and delta 5 avenasterol were 368.78 ± 24.12, 10.02 ± 2.12 and 3.54 ± 0.06 mg/100 g of dry matter, respectively. The highest phenolic content (132.46 ± 11.07 mg GAE/g extract), flavonoids (25.51 ± 0.67 mg QE/g extract) and anti-radical activity of DPPH (1967.32 ± 31.07µmol TE/g extract) were observed in ethanolic extract of premix macroalgae. The levels of phenol, flavonoids and antioxidant activity were higher in ethanol, ethanol-aqueous and aqueous extracts, respectively, and showed a significant difference ($p<0.05$).

Conclusion: Overall, sitostanol was the predominant sterol of the macroalgae premix tested, and the ethanolic extract of the macroalgae premix showed the best flavonoid content, phenol, and antioxidant activity that can be recommended as a rich source of sterols and natural antioxidants for the food industry.

*Corresponding author: paria.akbary@gmail.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال دهم، شماره اول، فروردین ۱۴۰۳، صفحات ۴۱-۲۷

DOI:10.22124/janb.2024.26283.1229

"مقاله پژوهشی"

تعیین خاصیت ضد اکسایشی و فیتوشیمیایی عصاره پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای *Padina austrlis*، *Sargassum licifolium* و *Stoechospermum marginatum* سواحل چابهار

پریا اکبری

گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، سیستان و بلوچستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۵

چکیده

درشت‌جلبک‌ها یکی از مهمترین منابع خوراک ارزان جایگزین برای آبزیان، غنی از خواص مغذی و دارویی هستند. این زیست فعال‌ها از جمله فنل‌ها و عصاره‌های درشت‌جلبکی حاوی این ترکیبات به‌عنوان افزودنی‌های خوراک در تغذیه آبزیان بررسی شده‌اند. تحقیق حاضر با هدف بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی (استرول، فنل و فلاونوئید) و فعالیت ضداکسایشی (دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل) عصاره پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای *Padina australis*، *Sargassum ilicifolium* و *Stoechospermum marginatum* انجام شد. این درشت‌جلبک‌ها از سواحل چابهار هنگام جزر جمع‌آوری و پس از حمل به آزمایشگاه، با آب شیرین چندین بار شستشو داده شدند تا موجودات اپی‌فیت و گل و لای آن کاملاً از بین رفت. سپس در سایه و در دمای اتاق (۲۵°C) خشک شدند. پس از آسیاب کردن هر یک از درشت‌جلبک‌ها توسط آسیاب برقی (مدل مولینکس)، به نسبت ۱:۱:۱ با هم ترکیب و به صورت پودر در آمد. استرول با دستگاه کروماتوگرافی گازی و فنل، فلاونوئید و فعالیت ضداکسایشی با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که استرول غالب سیتوستانول بود. بیشترین مقدار محتوای فنلی، فلاونوئید و فعالیت ضد رادیکالی دی فنیل پیکریل هیدرازیل در عصاره اتانولی پرمیکس درشت‌جلبک‌ها مشاهده شد. میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت ضداکسایشی به‌ترتیب در عصاره اتانولی، اتانولی-آبی و آبی بیشتر بود و اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نشان دادند ($p<0/05$). در کل، سیتوستانول، استرول غالب پرمیکس درشت‌جلبک‌های مورد آزمایش بود و عصاره اتانولی پرمیکس درشت‌جلبک‌ها بهترین محتوای فلاونوئیدی، فنل و فعالیت ضداکسایشی را نشان داد که می‌تواند به‌عنوان منابع غنی از استرول و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای صنایع غذایی و دارویی توصیه شود.

کلمات کلیدی

Sargassum licifolium

Padina austrlis

Stoechospermum marginatum

استرول

وضعیت ضداکسایشی

نویسنده مسئول: paria.akbary@gmail.com

مقدمه

درشت‌جلبک‌ها یکی از مهمترین منابع خوراک ارزان جایگزین برای آبزیان، غنی از خواص مغذی و دارویی هستند. آن‌ها حاوی طیف وسیعی از عوامل زیست‌فعال مانند فنل‌ها، استرول‌ها و فلاونوئیدها هستند و بسیاری از آن‌ها معمولاً در گیاهان خشکی یافت نمی‌شوند (Akbary and Aminikhoei, 2018). این زیست‌فعال‌ها از جمله فنل‌ها و عصاره‌های درشت‌جلبکی حاوی این ترکیبات به‌عنوان افزودنی‌های خوراک در تغذیه آبزیان بررسی شده‌اند. پلی‌فنل‌ها خواص مفیدی مانند ضدمیکروبی (Mirza et al. 2004; Holdtand Kraan, 2011; Andrade et al. 2013) و ضداکسایشی (Mirza et al. 2004; Andrade et al. 2013) دارند که عملکرد رشد، استفاده از مواد مغذی، ایمنی و مقاومت به بیماری‌ها را بهبود می‌بخشد (Mirza et al. 2004; Liu et al. 2007).

ترکیبات فنلی متابولیت‌های تولیدی ثانویه هستند که از طریق مسیرهای اسید شیکیمیک[1] و فنیل پروپانوئید تولید می‌شوند (Salmanian et al. 2013). مولکول‌های فنولی به‌طور گسترده از طریق جلبک‌های دریایی عمدتاً برای اهداف محافظتی، ساختاری، و بوم‌شناختی منتشر می‌شوند. این ترکیبات فنلی شامل دسته‌های گسترده‌ای از ترکیبات ساده مثل اسیدهای فنولیک آزاد و استر-باند گرفته تا پلیمرهای بسیار پیچیده مثل لیگنین‌ها و تانن‌های متراکم هستند (Shimada et al. 1992; Natrah et al. 2015) که گروه‌های پلی‌فنلی (مثل فلوروگلوسینول‌ها و فلوروتانین‌ها) و گروه‌های مولکولی غیرقطبی (مثل توکوفرول‌ها، استرول‌ها، پیگمنت‌ها و تریترپن‌ها) را دربر می‌گیرند. درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای دارای فنول‌های بیشتری نسبت به انواع قرمز و سبـز هستند (کمتر از g/kg DW ۱۰-۱۴۰) (Holdt and Kraan, 2011). معمولاً این ترکیبات برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش زمان ماندگاری استفاده می‌شوند (Sanghyun et al. 2003).

فلاونوئیدها از ترکیبات پلی‌فنلی با وزن مولکولی کم و دارای اسکلت دی فنیل پروپان ($C_6C_3C_6$) گروه بزرگی از این متابولیت‌های ثانوی هستند که تقریباً در همه گیاهان وجود دارند و معمولاً در ۶ زیر گروه اصلی فلاونول‌ها، فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، فلاونون‌ها، فلاوانول‌ها و آنتوسیانیدین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند (Santos-Sánchez et al. 2019). تعداد و موقعیت فنلی، فعالیت ضداکسایشی این ترکیبات گروه‌های OH– را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

رادیکال‌های آزاد در تداوم حیات موجودات زنده دارای نقش‌های مثبت و منفی زیادی هستند. برای مثال، ROS رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن باعث اکسایش مولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند که این مسئله باعث آسیب‌های گسترده به یاخته و مرگ آن می‌شود (Shi et al. 2005; Santos-Sánchez et al. 2019). همچنین، از نقش‌های مثبت رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توان به راه‌اندازی مسیرهای علامت‌دهی یاخته، بیان ژن و تنظیم فعالیت گوانیلات سیکلاز در یاخته‌ها اشاره کرد. از طرف دیگر، گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن به‌صورت کاملاً مشخص خواص فیزیکی-شیمیایی و ایمنی‌شناختی سوپراکسید دیسموتاز را تحت تأثیر قرار داده و باعث افزایش صدمات اکسایشی در یاخته‌ها می‌شوند (Nazari et al. 2013). هیدروپراکسیدها از جمله مهمترین فرآورده‌های اکسایشی خودبه‌خودی لیپیدها بوده که فاقد طعم و بو هستند، ولی فرآورده‌های حاصل از تجزیه آن‌ها مانند آلدئیدها و کتون‌ها می‌توانند تأثیر زیادی روی طعم و بوی مواد غذایی داشته باشند. از این‌رو، معمولاً برای تأخیر و یا مهار اکسایش موادغذایی از ضد اکسایش‌ها استفاده می‌شود. با اضافه کردن آن‌ها، کیفیت ماده غذایی حفظ شده و طول عمر نگهداری آن‌ها نیز افزایش می‌یابد. کاربـرد ضد اکسایش‌های صناعی در بعضی از کشورها به دلیل اثرات نامطلوبی که روی سلامتی افراد می‌گذارند، محدود شده است. امروزه ضد اکسایش‌های طبیعی که از گیاهان به دست می‌آیند، به خاطر خواص ضداکسایشی و اثرات مفید آن‌ها روی سلامتی انسان به‌طورگسترده بررسی شده‌اند (Nazari et al. 2013; Santos-Sánchez et al. 2019).

[1] Shikimic

گونه‌های مختلف درشت‌جلبک‌ها حاوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی متنوعی هستند و اغلب بین محتوای این ترکیبات و خاصیت ضداکسایشی این گونه‌ها رابطه‌ای مستقیم وجود دارد. بنابراین، سنجش کمی ترکیبات ذکر شده، راه خوبی برای برآورد ظرفیت ضداکسایشی آن‌هاست (Santos-Sánchez et al. 2019). همچنین، در بسیاری از روش‌های عصاره‌گیری از حلال‌هایی استفاده می‌شود که از نظر میزان قطبیت متفاوت هستند. بنابراین، انتخاب حلال مناسب باید برحسب قطبیت و تنوع ترکیبات شیمیایی مورد مطالعه و نیز غلظت ماده استخراج‌شده انجام شود (Akbary et al. 2021).

پرورش موفقیت‌آمیز و مداوم آبزیان بستگی به مصرف غذاهای مناسب از لحاظ ارزش غذایی، سازگاری با محیط زیست و صرفه‌جویی اقتصادی دارد. تهیه غذا یکی از مهم‌ترین بخش‌ها در پرورش آبزیان به‌شمار می‌آید، به طوری که معمولاً ۵۰ تا ۷۰٪ از کل هزینه‌های لازم برای کارگاه‌های پرورش آبزیان را بخش تغذیه و غذای آن‌ها تشکیل می‌دهد. در حال حاضر صنعت جهانی تولید خوراک آبزیان پرورشی توسعه چشم‌گیری یافته و تنوع گسترده‌ای از خوراک‌های تخصصی در دسترس است (Akbary and Aminikhoei, 2018). جیره‌های غذایی باید با توجه به اصول علمی و نیازهای غذایی اختصاصی هر یک از گونه‌های پرورشی و میزان تراکم آبزیان تنظیم شود و باید نیازهای تغذیه‌ای هر آبزی با توجه به گونه آن در نظر گرفته شود (Afshar Mazandaran, 2010). در مجموع، برای داشتن یک کارگاه پرورشی موفق، باید از غذاهایی با کیفیت و دارای اجزای تشکیل‌دهنده مناسب دوره پرورشی استفاده شود تا رشد به نحو مطلوبی روی دهد (Mohammadi et al., 2020).

در ایران با وجود ۱۸۰۰ کیلومتر سواحل جنوب و بخشی از ۹۰۰ کیلومتر سواحل شمالی، استعداد بالقوه‌ای برای ایجاد مزارع پرورش میگو فراهم است. یکی از مشکلات مراکز تکثیر میگو، بازماندگی پایین نوزادهاست. لذا می‌توان با مدیریت صحیح تغذیه، در بهبود شرایط پرورش نوزادی تلاش کرد. موضوعات جدید که در روش‌های غذا و غذادهی مطرح شده است، حاصل بازنگری مداوم راهبردهای تغذیه‌ای پرورش‌دهندگان آبزیان است که انتخاب آن باید متناسب نوع خوراک و روش‌های غذادهی انجام شود. بسیاری از غذاهای تجاری به‌علت مشکلاتی که در کیفیت اولیه مواد خام و یا تأثیرات مضر مراحل فرآوری غذا بر روی ترکیبات آن‌ها وجود دارد، بخشی از ارزش غذایی خود را از دست داده و این غذاها به‌طور کامل تأمین‌کننده نیازهای تغذیه‌ای آبزیان نیست. لذا، استفاده از مکمل‌های غذایی در بسیاری موارد امری اجتناب ناپذیر است (Benny and Vanitha, 2004). از طرفی، تأمین نیازهای تغذیه‌ای آبزیان یکی از بخش‌های مهم در موفقیت‌آمیز بودن روند پرورش و نگهداری آن‌هاست. علاوه بر این، برای افزایش مقاومت آبزیان در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌توان از محرک‌های دستگاه ایمنی به صورت مکمل غذایی استفاده کرد و از آنجا که برخی گیاهان دارویی دارای طیف وسیعی از خواص مفید از جمله تحریک رشد و تقویت دستگاه ایمنی هستند، به همین علت استفاده از آن‌ها در مزارع پرورش آبزیان سبب بهبود رشد، تولید و کاهش شیوع بیماری می‌شود (Yilmaz et al. 2012). همان‌طورکه بیان شد، از مهمترین مسائل آبزی‌پروری، افزایش رشد، تولید و بقا است و تلاش‌های بسیاری انجام شده که با صرف انرژی و هزینه کمتر، نتیجه بهتری به‌دست آید (Applebaum and Holt, 2003).

مطالعات متعددی درباره ارزیابی استرول درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای مانند *Stoechospermum marginatum* و *P. australis* (Akbary et al. 2021)، *P. boergesenii* (Jamili et al. 2015)، *Pelvetia siliquosa* (Rotini et al. 2013)، محتوای فنل و فعالیت ضداکسایشی درشت‌جلبک‌های سواحل چابهار *Padina australis*، *Stoechospermum marginatum* و *Ahnfeltiopsis pygmae* (Akbary et al. 2021)، *Cystoseira trinodis* (Taheri et al. 2017)، *Hizikia fusiformis* (Kolanjinathan et al. 2009) انجام شده است. برای مثال، Supardy و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که در بین عصاره‌های مختلف جلبک *Halimeda discoidea*، فعالیت ضداکسایشی عصاره کلروفرمی و محتوای فنل بالاتر بود.

از آنجا که پراکنش درشت‌جلبک‌ها در سواحل خلیج فارس و دریای عمان زیاد است و از طرف دیگر، آبزی‌پروری پایدار و موفق در گروی حفظ سلامت موجود آبزی و بهینه‌سازی شرایط پرورشی برای کسب بیشینه رشد آبزیان و همچنین، کاهش هزینه‌های جانبی فرآیند تولید است از این رو، محققان و پرورش دهندگان در پی یافتن راهکارهای نوین و بهتر برای تحقق اهداف آبزی‌پروری هستند. مطالعات اخیر نشان داده است که جلبک‌های دریایی توان بالقوه افزوده شدن به خوراک آبزیان به‌عنوان مکمل‌های غذایی به‌دلیل در دسترس بودن، هزینه پایین و ارزش غذایی بالا دارند. جلبک‌های دریایی دارای مقادیر زیادی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و انواع کارتنوئیدها هستند و تقریباً بیشتر آن‌ها به‌عنوان مواد کاربردی با ارزش بالا استفاده می‌شوند (Periera, 2012). از مهمترین منابع زیستی و طبیعی کشور با ارزش اقتصادی و کاربردهای شیلاتی بسیار، وجود جلبک‌های دریایی است که از استعدادهای بالقوه سواحل جنوبی کشور محسوب می‌شود (Rebei et al. 2007). افزایش رشد و بهبود سلامتی، ارتقای دستگاه ایمنی و بهبود طبیعی فلور روده و معده، از فواید استفاده از عصاره‌های جلبکی به‌عنوان افزودنی‌های غذایی به جیره است (Akbary and Aminikhoei, 2018). اینکه دقیقاً چه ترکیباتی در جلبک‌های دریایی باعث افزایش رشد می‌شوند، هنوز روشن نیست، ولی سودمندی جلبک‌ها را در بهبود عملکرد جیره و افزایش رشد بیشتر به‌دلیل وجود ویتامین‌ها، مواد معدنی، تعدیل سوخت و ساز لیپیدها و بهبود جذب مواد غذایی مرتبط می‌دانند (Valente et al. 2015).

مطالعه حاضر، با هدف ارزیابی استرول، فنل، فلانوئید و فعالیت ضداکسایشی عصاره‌های مختلف پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای *Padina australis*، *Sargassum ilicifolium* و *Stoechospermum marginatum* سواحل چابهار برای ترویج این محصول غذایی منطقه‌ای در جیره غذایی میگو و اندازه آبزیان است که می‌تواند چشم‌انداز خوبی در توسعه سلامت عمومی مصرف‌کنندگان و سودآوری تجاری درشت‌جلبک‌های این منطقه داشته باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی عصاره پرمیکس درشت‌جلبک‌ها

جمع‌آوری دستی درشت‌جلبک‌های *P. astraulis*، *S. ilicifolium* و *S. marginatum* در فصل پاییز ۱۴۰۰ از سواحل چابهار (دریای بزرگ و تیس) هنگام جزر انجام شد و پس از حمل به آزمایشگاه، با آب شیرین چندین بار شستشو شدند تا کاملاً گل و لای و موجودات اپی‌فیت آن‌ها از بین رفت. سپس در دمای اتاق (۲۵°C) به دور از نور مستقیم خورشید خشک شدند. برای عصاره‌گیری، ابتدا درشت‌جلبک‌های خشک شده، توسط آسیاب برقی به قطعات ریز تبدیل شدند. سپس مقدار ۲۰۰ گرم پودر مخلوط حاصل از سه گونه درشت‌جلبک‌ها (۱:۱:۱) تهیه، و تا زمان استفاده بعدی در دمای ۴°C- نگهداری شد (Taheri et al. 2017). برای تهیه عصاره‌های آبی، اتانول ۹۰٪ و اتانولی:آبی (۵۰:۵۰) از پرمیکس درشت‌جلبک‌ها، ۵ گرم از پودر حاصله از پرمیکس با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۰٪ و ۵۰ میلی‌لیتر اتانول : آبی (۵۰:۵۰) مخلوط و در دستگاه سوکسله (Qickfit, UK) قرار گرفت. این عمل چندین بار تکرار شد تا مقدار مناسب عصاره پرمیکس تهیه شود. نهایتاً با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان (IKA, Germany) در دمای ۴۰°C درجه عصاره‌ها تغلیظ شدند و در دمای ۸۰°C- تا زمان سنجش نگهداری شدند.

سنجش ترکیبات فیتو شیمیایی

استخراج و سنجش استرول

برای استخراج استرول‌های آزاد به ۱ گرم از پودر پرمیکس درشت‌جلبک‌ها، ۲۰ میلی‌لیتر دی‌کلرو متان افزوده شد و با کمک دستگاه فراصوت همگن شد. سپس مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به‌حالت سکون نگه داشته شد و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱، صاف شد و در نهایت، با استفاده از دستگاه تبخیر در خلاء و گاز نیتروژن، حلال به‌طور کامل از هر نمونه خشک شد. پس از استخراج استرول‌های آزاد از چهار گونه نرم‌تن و خشک شدن کامل عصاره‌ها با گاز نیتروژن، ۵۰ میکرولیتر پیریدین خشک دوبار تقطیر به همراه ۵۰ میکرولیتر معرف BSTFA (N,O-

(Bis trimethylsilyl)trifluoroacetamide >99% حاوی ۱٪ TMCS (trimethylchlorosilane) (شرکت سیگما-آلدریچ) به آن‌ها افزوده شد و به‌مدت یک شب در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس، هر یک از عصاره‌ها با ۱ میلی لیتر دی‌کلرومتان رقیق شده و حجم ۱ میکرولیتر از هریک از آن‌ها برای تجزیه به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. استخراج از هر نمونه سه بار انجام شد. برای جداسازی انواع استرول‌ها در عصاره‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مدل Unicam 4600 (مستقر در شرکت میزان سنجش پاسارگاد تهران) استفاده شد. ستون این دستگاه از نوع Bp × ۱۰ به درازای ۳۰ متر و قطر ۰/۱ میلی‌متر بود. آشکارساز دستگاه از نوع FID و گاز حاصل از دستگاه هلیوم بود که با فشار ۶ پاسکال در ستون به‌عنوان گاز حامل به‌کار رفت. برنامه حرارتی ستون با دمای ۱۵۰°C به‌مدت ۲ دقیقه آغاز شد و پس از آن با افزایش دمای ۵°C درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۳۰۰°C رسید و بعد به‌مدت ۱۵ دقیقه در همین دما باقی ماند. دمای اتاقک تزریق و آشکارساز ۳۰۰°C و حجم عصاره برای تزریق ۱ میکرولیتر بود. شناسایی اجزای موجود در کروماتوگراف به‌کمک زمان بازداری آن‌ها انجام شد. زمان بازداری اجزای مختلف با استفاده از داده‌های تزریق فیتواسترول‌های استاندارد (کمپسترول[1]، استیگمااسترول[2] و بتا-سیتوسترول[3]) (شرکت سیگما-آلدریچ) در شرایط یکسان با تزریق نمونه‌ها محاسبه شد و از کلسترول به‌عنوان استاندارد داخلی برای سنجش کمی استفاده شد (Liuet al. 2007).

اندازه‌گیری فنل

مقادیر فنل کل عصاره حاصل از هر تیمار مورد آزمایش، با اندکی تغییر توسط روش Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۰۸) اندازه گیری شد. ۲۰۰ میکرولیتر عصاره با ۲۰ میکرولیتر معرف فولین–سیکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) مخلوط شد و به‌مدت ۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس، ۲ میکرولیتر از بی‌کربنات سدیم ۶٪ اضافه و مخلوط شد و بعد از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu, uv-1800, Japan) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. مقادیر فنل کل در هریک از عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه و بر حسب mgGAE/g عصاره بیان شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید

محتوای فلانوئیدی عصاره حاصل از پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای با اندکی تغییر توسط روش Ebrahimzadeh و همکاران (۲۰۰۸) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره نمونه، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ در اتانول ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم M۱ و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu, uv-1800, Japan) در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه و بر حسب mgQE/g عصاره خشک بیان شد.

ارزیابی فعالیت ضداکسایشی توسط دی فنیل پیکریل هیدرازیل[4] (DPPH)

فعالیت خنثی‌سازی رادیکال آزاد[5] دی فنیل پیکریل هیدرازیل عصاره پرمیکس ماکروجلبک توسط روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از کیت اندازه‌گیری ظرفیت خنثی‌سازی رادیکال آزاد بر اساس روش DPPH (کیت زیتوکس تهیه شده از شرکت کاوش آزما) در طول موج ۵۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و مقدار DPPH بر حسب µmol Trolex/g وزن خشک عصاره بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

[1] Campesterol
[2] Stigmasterol
[3] βsisterol
[4] Di Phenyl Picryl Hydrazyl
[5] Radical Scavenging activity

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ و بر اساس آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از تست کولموگروف اسمیرنوف و برابری واریانس‌ها با تست لون بررسی شد. بعد از مشخص شدن معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها، برای رتبه‌بندی آن‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $p<۰/۰۵$ استفاده شد. برای تمامی اندازه‌گیری‌ها هر عصاره پرمیکس سه بار تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شد.

نتایج

ترکیب‌های فیتوشیمیایی

استرول

در جدول ۱ مقایسه میزان استرول آزاد و کل استرول پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای ارائه شده است. استرول غالب سیتو استانول [1] بود. میزان استرول کل ۳۶۸/۷۸ ± ۲۴/۱۲mg/g۱۰۰ ماده خشک بود. میزان کلسترول و دلتا ۵ اوناسترول [2] به‌ترتیب ۲/۱۲ ± ۱۰/۰۲ و ۰/۰۶ mg/g۱۰۰ ± ۳/۵۴ ماده خشک بود.

فنل کل

تعییرات میانگین میزان فنل در عصاره‌های مختلف پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین میزان فنل در عصاره اتانولی مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با عصاره آبی و آبی-اتانولی نشان داد ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان فنل در عصاره آبی مشاهده شد.

فلاونوئید

محتوی فلاونوئید استخراج شده از عصاره پرمیکس جلبک‌های قهوه‌ای در شکل ۲ آورده شده است. بیشترین (mg QE/g عصاره خشک ۰/۶۷ ± ۲۵/۵۱) و کمترین (mg QE/g عصاره خشک ۰/۸۷ ± ۹/۸۱) محتوای فلاونوئید به ترتیب در عصاره اتانولی و آبی پرمیکس مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). محتوی فلاونوئید در عصاره آبی-اتانولی (mg QE/g عصاره ۰/۵۲ ± ۱۸/۲۷) بیش از عصاره آبی بود و اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

فعالیت ضداکسایشی

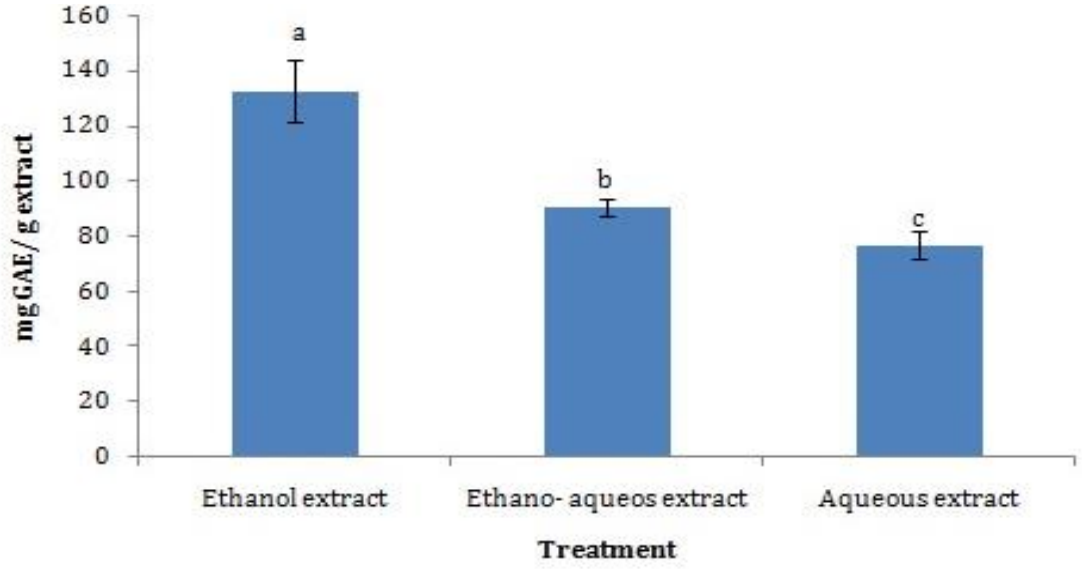
در شکل ۳ فعالیت ضداکسایشی عصاره پرمیکس درشت جلبک های قهوه‌ای آورده شده است. همچنین بیشترین و کمترین مقدار دی فنیل پیکریل هیدرازیل به ترتیب در عصاره اتانولی (µmol Trolex/g عصاره ۳۱/۰۷ ± ۱۹۶۷/۳۲) و آبی (µmol Trolex/g عصاره ۲۱/۷۸ ± ۱۴۹۵/۷۲) مشاهده شد. میزان دی فنیل پیکریل هیدرازیل در عصاره آبی-اتانولی (µmol Trolex/g عصاره ۴۲/۷۸ ± ۱۷۸۹/۱) بیشتر از عصاره آبی بود و اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

[1] Sitostanol
[2] Delta 5-avenasterol

جدول ۱ میانگین (± خطای استاندارد) مقادیر استرول آزاد و استرول کل (mg/۱۰۰DW g) در پرمیکس درشت جلبک های قهوه‌ای *Padina astraulis*، *Sargassum ilicifolium* و *Stoechospermum marginatum*

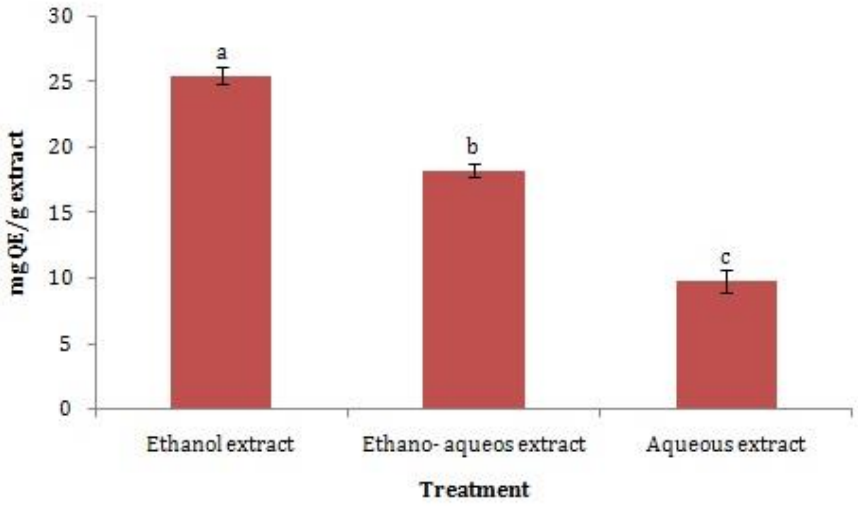
Table 1 Mean (± SE) of the total free sterol contents and total sterol (mg/100 g of dry weight) in the brown macroalgae premix of *Padina astraulis*, *Stoechospermum marginatum*, and *Sargassum ilicifolium*

	Sterol content (mg/100 g of dry weight)
Cholesterol	10.02 ± 2.12
Ergosterol	0.18 ± 0.05
24- methyl cholesterol	0.21 ± 0.04
Campersterol	1.78 ± 0.02
Sistostanol	88.07 ± 0.05
Delta-5-onasterol	3.54 ± 0.06
Delta-7-campesterol	0.20 ± 0.01
Stigmasterol	0.21 ± 0.01
Camperstanol	0.05 ± 0.02
Total sterol	368.78 ± 24.12



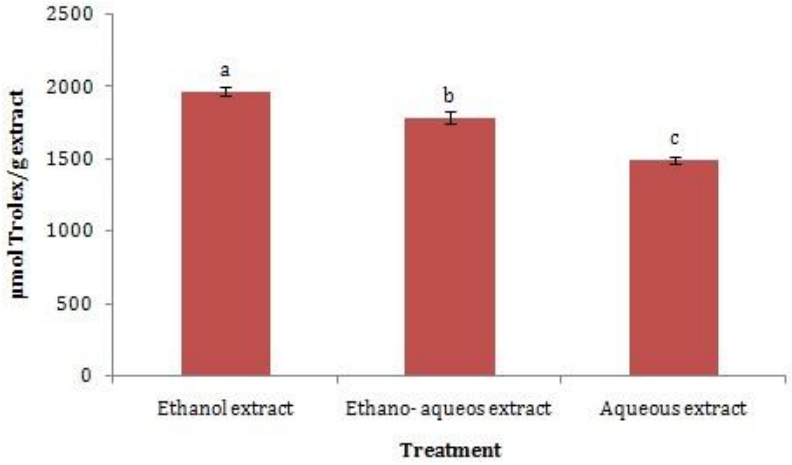
شکل ۱ تغییرات میانگین (± خطای استاندارد) فنل کل در عصاره پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای *Padina astraulis*، *Sargassum ilicifolium* و *Stoechospermum marginatum* است. اختلاف معنی‌دار بین عصاره‌ها با حروف نامشابه نشان داده شده است (p<۰/۰۵).

Figure 1 Mean (± SE) of the total phenol in the brown macroalgae permix of *Padina astraulis*, *Stoechospermum marginatum*, and *Sargassum ilicifolium*. Significant difference between the treatments is indicated by non-similar letters (p<0.05).



شکل ۲ تغییرات میانگین (± خطای استاندارد) محتوی فلاونوئید در عصاره پرمیکس درشت جلبک های قهوه‌ای *Padina astraulis*، *Sargassum ilicifolium* و *Stoechospermum marginatum* است. اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با حروف نامشابه نشان داده شده است (p<۰/۰۵).

Figure 2. Mean (± SE) of the Flavonoids in the brown macroalgae permix of *Padina astraulis*, *Stoechospermum marginatum*, and *Sargassum ilicifolium*. Significant difference between the treatments is indicated by non-similar letters (p<0.05).



شکل ۳ مقایسه میانگین (میانگین ± خطای استاندارد) فعالیت ضداکسایشی عصاره پرمیکس درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای *Padina astraulis*، *Sargassum ilicifolium* و *Stoechospermum marginatum* است. اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با حروف نامشابه نشان داده شده است (p<۰/۰۵).

Figure 2. Mean (± SE) of antioxidant activity in the brown macroalgae permix of *Padina astraulis*, *Stoechospermum marginatum*, and *Sargassum ilicifolium*. Significant difference between the treatments is indicated by non-similar letters (p<0.05).

بحث

این تحقیق با هدف ارزیابی ترکیب‌های فیتوشیمیایی و فعالیت ضداکسایشی عصاره پرمیکس سه گونه درشت‌جلبک‌های قهوه‌ای *P. australis*، *S. ilicifolium* و *S. marginatum* انجام شد. مقدار استرول کل و همچنین محتوای استرول‌های شاخصی مانند سیتوستانول، کلسترول، دلتا ۵ اوناسترول قابل توجه بود و می توان آنها را به عنوان منابع مکمل این استرول‌ها در صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد که با نتایج Akbary و همکاران (۲۰۲۱) بر روی درشت‌جلبک‌های سواحل چابهار *Padina australis*، *Stoechospermum marginatum* و *Ahnfeltiopsis pygmaea* همخوانی دارد. آن‌ها نشان دادند که میزان سیتوستانول به‌عنوان استرول غالب در جلبک *P. australis*، *Stoechospermum marginatum* و *Ahnfeltiopsis pygmaea* به‌ترتیب ۸۱/۰۲، ۹۰/۳۴ و ۴۶/۸۳ mg/۱۰۰g وزن خشک بود. Jamili و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که در جلبک *P. boergesenii* کلسترول و ۲۲-دهیدروکلسترول، دو استرول اصلی این گونه است که با نتایج حاضر همخوانی ندارد. می‌توان گفت که نوع این ترکیبات در شرایط محیطی در گونه‌های متعدد متفاوت است. این ترکیبات جزء متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند و متابولیت‌های ثانویه هر موجود زنده‌ای تحت تأثیر شرایط محیطی، متغیر و یا به مشتقات مشابه تبدیل می‌شوند (Desmond and Gribaldo, 2009). با توجه به ارزش بسیار زیاد دارویی استرول‌ها از جمله کمپسترول، استیگما استرول را می‌توان منبع مناسبی برای استفاده در صنایع دارویی به حساب آورد و این استرول‌ها، نقش مهمی در جلوگیری از رشد یاخته‌های سرطانی و پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی دارند (Ghannadiand Mehregan, 2003; Mirza et al. 2004; Fernandes and Cabral, 2007). با افزایش ترکیبات فنلی، خاصیت ضداکسایشی بیشتر می‌شود. ترکیبات فنلی با وزن مولکولی زیاد مانند فلاونوئید و تانن‌ها توانایی زیادی برای پاکسازی رادیکالای آزاد دارند و این توانایی بیشتر بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابه‌جاشونده هیدروکسیل دارد (Salmanian et al. 2013; Davari et al. 2017). نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان فنل در عصاره اتانولی پرمیکس مشاهده شد. Akbary و همکاران (۲۰۲۱) با بررسی میزان فنل کل و خواص ضداکسایشی سه گونه درشت‌جلبک سواحل چابهار ایران نشان دادند که میزان فنل کل در عصاره اتانولی دو گونه جلبک قهوه‌ای *Padina australis* (۱۰۳/۰۷ ± ۶/۰۸ mg GAE/g عصاره) و *S. marginatum* (۱۲۶/۶۶ ± ۶/۱۱ mg GAE/g عصاره) بیش از عصاره آبی و آبی-اتانولی بود و عصاره اتانولی جلبک *S. marginatum* بیشترین میزان فنل را در مقایسه با عصاره اتانولی درشت‌جلبک‌های *P. australis* و *Ahnfeltiopsis pygmaea* نشان داد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. Supardy و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که در بین عصاره‌های مختلف جلبک *Halimeda discoidea* فعالیت ضداکسایشی عصاره کلروفرمی و محتوی فنل بالاتر بود که با نتایج این تحقیق همخوانی ندارد و می‌توان گفت گونه‌های مختلف درشت‌جلبک‌ها حاوی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی متنوعی هستند. لذا انتخاب حلال مناسب باید بر حسب قطبیت و تنوع ترکیبات شیمیایی مورد مطالعه و نیز غلظت ماده استخراج شده، انجام شود (Karaman et al. 2010).

محتوای فلاونوئید در این تحقیق، به ترتیب از بیشترین به کمترین عبارتند از عصاره اتانولی>آبی-اتانولی>آبی بود. Davarynejad و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر تیمار حلال‌های متانول، اتانول، استون (۵۰، ۹۰ و ۱۰۰٪) و آب مقطر بر روی میزان ترکیبات ضداکسایشی (فنل کل، تانن‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها) میوه عناب (*Ziziphus jujube* Miller) نشان دادند که استون ۵۰٪ در استخراج ترکیبات فنل و فلاونوئید کل به ترتیب با مقادیر mg GAE/g ۷۹۸/۲۰ ماده خشک و mg QE/g ۱۸۷۱/۷۳ عصاره خشک، بهترین عملکرد را در بین دیگر حلال‌ها داشته است. Salmanian و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که نوع حلال مورد استفاده برای استخراج تأثیر معنی‌داری بر مقدار ترکیبات فلاونوئید عصاره‌های اتانولی و متانولی *Eucalyptus camaldulensis* داشته است. Nazari و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی خواص ضداکسایشی، میزان

فنل و فلاونوئید کل پوست درختان اوکالیپتوس (*Pinus sylvestris*) و کاج جنگلی (*Eryngium caucasicum*) دریافتند که عصاره اتانولی اوکالیپتوس دارای مقادیر بیشتری فنل و فلاونوئید بود. می‌توان گفت که تفاوت در نوع، خلوص و قطبیت حلال‌ها بر میزان استخراج متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (Akbary et al. 2021).

نتایج حاصل از بررسی به روش DPPH در این تحقیق نشان داد که خاصیت ضداکسایشی مستقیماً تحت تأثیر ترکیبات فنلی قرار گرفته است. در میان حلال‌های مورد استفاده، اتانول بهترین بازده را در روش DPPH نشان داد. Akbary و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که عصاره اتانولی سه گونه درشت‌جلبک‌های *P. australis*، *Stoechospermum marginatum* و *Ahnfeltiopsis pygmaea* چابهار بیشترین میزان DPPH را در مقایسه با عصاره آبی و اتانولی-آبی نشان دادند که با نتایج حاضر همخوانی دارد. همچنین Taheri و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که بیشترین ظرفیت ضداکسایشی در روش DPPH برای جلبک *C. trinodis* مربوط به عصاره اتیل استات بود (۴/۹۶ ± ۹۲٪). می‌توان گفت که عصاره‌های مختلف پرمیکس درشت‌جلبک‌ها دارای توان ضداکسایشی متفاوتی هستند و از این ترکیبات به عنوان ابزار درمانی می‌توان استفاده کرد (Bektas et al. 2005; Taheri et al. 2017; Akbary et al. 2021).

در مطالعه حاضر، سیتوستانول، استرول غالب پرمیکس درشت‌جلبک‌های مورد آزمایش بود و میزان فنل کل، فلاونوئید و فعالیت ضداکسایشی به‌ترتیب از بیشترین به کمترین عبارت بود از عصاره اتانولی> آبی-اتانولی> آبی. از آنجاکه عصاره اتانولی پرمیکس درشت‌جلبک‌ها بهترین محتوای فلاونوئیدی، فنل و فعالیت ضداکسایشی نشان داد، می‌توان به‌عنوان منابع غنی از استرول و ضداکسایش‌های طبیعی برای صنایع غذایی و دارویی توصیه کرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار و کارشناس محترم آزمایشگاه نمونه آزموی تهران تشکر و قدردانی می‌شود. حمایت مالی این طرح (۴۰۰۰۰۰۷) از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور انجام شد.

منابع

Afshar Mazandaran, N. 2018. A practical guide to nutrition and nutritional and pharmaceutical inputs of aquatic animals in Iran. Noorbakhsh, Tehran, Iran.

Akbary, P., Liao, L.M., Aminikhoei, Z., Hobbi, M., Erfanifar, E. 2021. Sterol and fatty acid profiles of three macroalgal species collected from the Chabahar coasts, southeastern Iran. Aquaculture International 9: 155-165. Doi: 10.1007/s10499-020-00616-y.

Akbary, P., Aminikhoei, Z. 2018. Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. Journal of Applied Phycology 30: 1345-1353. Doi:10.1007/s10811-017-1299-8.

Andrade, P.B., Barbosa, M., Matos, R.P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., Valentão, P. 2013. Valuable compounds in macroalgae extracts. Food Chemistry 138: 1819-1828. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.081.

Applebaum, S., Holt, G. 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Marine Biology 142: 1159-1167. Doi:10.1007/s00227-003-1041-8.

Bakrin, F.S., Zuraina, F. 2018. Antibacterial activity of extract brown marine algae, species *Padina australis* Hauck from

coastal area of Port Dickson, Malaysia. KPJ Medical 7:49-52.

Bektas, T., Dimitra, D., Atalay, S., Munevver, S., Moschos, P. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extract of *Salivato mentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chemistry 90: 333-340. Doi: 10.1016/j.foodchem.2003.09.013.

Benny, K.H., Vanitha, T.J. 2004. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. Current Medicinal Chemistry 11: 1423-1430. Doi: 10.2174/0929867043365161.

Davarynejad, G., Taghizadeh, S. F., Asili, J. 2017. Effect of different solvents on total phenolic contents and antioxidant activity of *Zizyphus jujube* miller fruits. Journal of Horticultural Science 31: 158-166. Doi: 10.22067/jhorts4.v0i0.47986

Desmond, E., Gribaldo, S. 2009. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. Genome Biology Evolution 1: 364-381. Doi: 10.1093/gbe/evp036.

Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. 2008. Antioxidantand free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacology 1: 7-14.

Fernandes, P., Cabral, J. 2007. Phytosterols applications and recovery methods. Bioresource Technology 98: 2335-2350. Doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.006.

Ghannadi, A., Mehregan, I. 2003. Essential oil of one of the Iranian Skullcaps. Journal of Biosciences 58: 316-318. Doi: 10.1515/znc-2003-5-604.

Holdt, S.L., Kraan, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. Journal of Applied Phycology 23: 543-597. Doi: 10.1007/s10811-010-9632-5.

Jamili, S., Gohari Kakhki, A., Saeidnia, S., Permeh, P. 2015. Extraction and Identification Sterols in Brown alga, *Padina boergesenii* in Chabahar Coasts. Iranian Scientific Fisheries Journal 24: 35-44. Doi:10.22092/isfj.2017.110192

Karaman, S., Tutem, E., Bas-Kan, K.S., Apak R. 2010. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. Food Chemistry 120: 1201-1209. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.11.065.

Kolanjinathan, K., Ganesh, P., Govindarajan, M. 2009. Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens. European Review Medical Pharmacology Science13: 173-177.

Liu, W.H., Ding, B., Ruan, X.M., Xu, H.T., Yang, J., Liu, .M. 2007. Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography–flame ionization detection. Journal of Chromatography A 1163: 304-311. Doi: 10.1016/j.chroma.2007.06.043.

Mirza, M., Najafpoor Navaii, M., Dini, M. 2004. Identification and Investigation chemical composition of essential oil *Scutellaria pinnatifida.* Medicinal and Aromatic Plants of Iran 4: 417-423. doi: 10.52547/jmp.21.81.12.

Mohammadi, E., Shabanpour, B., Kordjazi, M. 2020. Chemical composition and functional properties of two brown seaweeds from the Qeshm Island, Iran. Iranian Journal of Fisheries Science 19: 85-98. Doi: 10.22092/ijfs.2019.118281.

Naiel, M.A., Ismael, N.E., Abd El-hameed, S.A., Amer, M.S. 2020. The antioxidative and immunity roles of chitosan nanoparticle and vitamin C-supplemented diets against imidacloprid toxicity on *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 523:

219-249. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735219.

Natrah, F., Harah, Z.M., Sidik, B.J., Izzatul, N., Syahidah, A. 2015. Antibacterial activities of selected seaweed and seagrass from port Dickson coastal water against different aquaculture pathogens. Sains Malays 44: 1269-1273. Doi: 10.17576/jsm-2015-4409-08.

Nazari, S., Nazarnezhad, N.J., Ebrahimzadeh, M.A. 2013. Evaluationof antioxidant properties andtotal phenolic and flavonoidscontentof *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris*bark. Iranian Journal of Wood and Paper Science Research 28: 522-533. Doi:10.22092/ijwpr.2013.3460.

Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Eva Rešek, K., Engelen, A., Varela, J. 2012. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. Marine Drugs. 10: 1920-1935. Doi:10.3390/md10091920.

Rabiei, R., Asadi, M., Sohrabipour, J., Nejadsattari, T., Majd, A. 2007. Algae species diversity of *Gracilariasalicornia* on the Persian Gulf Coast-Qeshm Island. International Journal of Construction Education and Research 20: 43-57.

Rotini, A., Belmonte, A., Barrote, I., Micheli, C., Peirano, A., Santos, R.O., Silva, J., Migliore, L. 2013. Effectiveness and consistency of a suite of descriptors for assessing the ecological status of seagrass meadows (*Posidonia oceanica* L. Delile). Estuarine, Coastal Shelf Science 130: 252-259. Doi:10.1016/j.ecss.2013.06.015.

Salmanian, Sh., SadeghiMahoonak, A.R., Jamson, M., Tabatabaee Amid, B. 2013. Identification and quantification of phenolicacids, radical scavenging activity and ferric reducing power of *Eryngium caucasicum* Trautv. ethanolic and methanolic extracts. Journal of Research Innovation Food Science and Technology 2: 193-204. DOI: 10.22101/JRIFST.2013.09.16.227.

Sanghyun, L., Yeon Sil, L., Sang Hoon, J.,Sam Sik, K., Kuk Hyun, S.H. 2003. Anti-oxidant activities of fucosterol fromthe marine algae *Pelvetia siliquosa*. Archives of Pharmacal Research 26: 719-722. Doi:10.1007/BF02976680.

Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., Villanueva-Cañongo, C. 2019. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds, Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds. Intech Open. Doi:10.5772/intechopen.83815.

Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J. 2005. Extraction of polyphenolics from Plant material for functional foods engineering and technology. Food Review International 21: 1-12. Doi: 10.1081/FRI-200040606.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Namkamura, T. 1992. Antioxidative properties of Xanthan on the auto oxidation of soyabean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 945-948. Doi: 10.1021/jf00018a005

Supardy, N.A., Ibrahim, D., Sulaiman, S.F., Zakaria, N.A. 2011. Free radical scavenging activity, total phenolic content and toxicity level *of Halimeda discoidea* (Decaisne) extracts (Malaysia's green macroalgae). International Journal of Pharmacy Pharmaceutics Science 3: 397-402.

Taheri, A., Ghaffari, M., Bagherpour, N.S., Attaran Fariman, G. 2017. Study the Antioxidative properties of the marine algae *Cystoseira trinodis* extracts from Chabahar coastal water Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 25: 658-669.

Valente, L.M.P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E., Pinto, I. 2015. Evaluation of three seaweeds *Gracilariabursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 252: 85-91. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.052.

Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G., Camire, M.E., Brawley, S.H. 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. Journal of Applied Phycology 29: 949-982. Doi: 10.1007/s10811-016-0974-5.

Yılmaz, S., Ergün, S., Türk, N. 2012. Effects of cumin-supplemented diets on growth and disease (*Streptococcus iniae*) resistance of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 64: 764-768. Doi: 10.46989/001c.20626.