

مقایسه خواص آنتی اکسیدانی کیتوالیگوساکاریدهای استخراجی از ضایعات میگوی پرورشی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannami*)، اسکوئید هندی (*Uroteuthis duvaucelii*) و خرچنگ گرد (*Portunus pelagicus*)

- هومن تیموری*: گروه عمل آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- مسعود رضائی: گروه عمل آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- مهدی طبرسا: گروه عمل آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

استفاده بهینه از ضایعات حاصل از کارخانه‌های فرآوری آبزیان از مسائل بسیار مهم و نیاز به بازبینی اساسی دارد، از یک سو، ورود این ضایعات به‌عنوان زیاده‌های تر علاوه بر تولید شیرابه و تهدید اکوسیستم‌های آبی و بروز مشکلات زیست‌محیطی، می‌تواند یکی از عوامل مشکل‌زا و سبب بروز بیماری‌های مختلف گردد. از سویی دیگر منابعی چنین با اهمیت می‌تواند مورد بهره‌برداری قرار گرفته و منتج به تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده بالا مثل آنزیم‌ها، ژلاتین، کیتین، کیتوزان و غیره گردد. با توجه به اثرات بیولوژیک و زیست‌فعال گزارش شده از الیگوساکاریدهای استخراجی از ترکیبات کیتینی نرم‌تنان دریایی در سال‌های اخیر که با نام (کیتوالیگوساکاریدها) شناخته می‌شوند، امکان استفاده از این اجزای فراسودمند به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی‌های انجام شده تقریباً در تمام آزمون‌ها کیتوالیگوساکاریدها توانایی مهارتی نسبتاً خوبی از خود نشان دادند که می‌توانند به‌عنوان یک منبع خوب برای تحقیقات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار بگیرند. در آزمون خنثی‌سازی رادیکال DPPH، با کمی فاصله از ویتامین C الیگوساکارید اسکوئید هندی با استخراج اسیدی با ۷۸/۲۳ درصد، در آزمون بررسی احیا در برابر یون آهن، کیتوالیگوساکارید خرچنگ گرد با استخراج آنزیمی بیش‌ترین اثر فعالیت احیایی ۱۹ درصد را از خود نشان داد. هم‌چنین در آزمون سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کیتوالیگوساکارید میگو و انامی استخراج اسیدی بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۴۲/۱۹ درصد را از خود نشان داد.

کلمات کلیدی: کیتوالیگوساکارید، وزن مولکولی، خواص آنتی‌اکسیدانی، زیست فعال



مقدمه

کیتین و ترکیب استیل‌زدایی شده آن (کیتوزان) دو پلیمر طبیعی شناخته‌شده‌ای هستند که سابقه استخراج و استفاده‌های متعدد از آن‌ها به بیش از ۲۰۰ سال پیش بازمی‌گردد. در حال حاضر ضایعات کیتینی حاصل از کارخانجات فرآوری آبزیان در ایران صرفاً در بهترین شکل، خشک شده و به غذای میگوهای پرورشی افزوده می‌شود. استفاده از منابع ضایعات حاصل از آبزیان و در کنار آن بهره‌گیری از آبزیان کم‌مصرف یا حتی بدون مصرف در ایران به منظور تولید کیتین و کیتوزان و مشتقات آن‌ها به منظور استخراج این مواد با ارزش، چند وقتی است که مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیقات مختلفی در خارج و داخل کشور مورد بررسی، پژوهش و ارزیابی قرار گرفته است. در سال‌های اخیر محققین با فراتر گذاشته و علاوه بر خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان به دنبال سایر خواص زیستی بی‌نظیر این مواد و مشتقات ساده‌تر آن‌ها مانند الیگوساکاریدها بوده‌اند. با توجه به اثرات بیولوژیک و سلامت‌بخشی گزارش شده از الیگوساکاریدهای استخراجی از ترکیبات کیتینی نرم‌تنان دریایی در سال‌های اخیر با نام (کیتو الیگوساکاریدها) شناخته می‌شوند، خواص جالب کیتو الیگوساکاریدهای استخراجی در مورد برخی از خواص زیستی از جمله خواص: ضد التهابی، انعقادکننده خون، کاهندگی فشارخون، کاهندگی سطوح کلسترول در حال انجام بوده و در مورد خواص آنتی‌دیابتی، ضدسرطان و آنتی‌اکسیدانی نیاز به بررسی‌های بیشتر و عمیق‌تر می‌باشد. ارائه میگوی فرآوری شده به صورت آماده مصرف که قسمت سر آن حذف (Head less) و محصول کاملاً پوست‌کنی (PUD) شده است، و همچنین تولید محصولات نظیر میگوی سوخاری، ناگت میگو و غیره با سهم بالایی از ضایعات بدون مصرف و غنی از منابع کیتینی مواجه خواهیم بود. از سوی دیگر به دلیل مصرف اندک خرچنگ گرد در داخل کشور تمامی خرچنگ‌های جمع‌آوری شده که اغلب به صورت صیدضمنی می‌باشند، بلااستفاده و در موارد بسیار زیادی به دریا بازگردانده می‌شوند. از ذخایر خرچنگ در داخل کشور به علت عدم مصرف و برنامه صیادی محترم آمار دقیقی در دست نیست. ذخایر اسکوئید و ماهی مرکب در کشور با داشتن میزان صیدی بین ۱۰۰۰ تا ۲۷۰۰ تن در سال (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۹۳-۱۳۸۰)، که غالباً به صورت فیله جهت صادرات آماده می‌گردند، دارای اسکلت داخلی می‌باشند که منبع مناسبی جهت استخراج ترکیبات کیتینی می‌باشند. در زمینه آماده سازی الیگومرها از کیتوزان تصفیه شده و کاربردهای آن در تحقیقات Uchida و همکاران (۱۹۸۹) به اوج خود رسید. با علم بر فعالیت‌های ضد میکروبی کیتوزان تحقیقات در زمینه استفاده از این مواد و مشتقات آن در نگهداری مواد غذایی انجام پذیرفت. بر روی ماندگاری مواد

غذایی با پوشش‌های فیلمی حاصل از کیتوزان شکل گرفت (Zhao و همکاران، ۲۰۰۶). توسعه تحقیقات بر روی فعالیت‌های فیزیولوژیکی کیتوالیگوساکاریدها نیز با تحقیقات Wei و همکاران (۲۰۰۳) در چین وارد مرحله‌ای جدید در استفاده از الیگوساکاریدهای مشتق شده از کیتوزان حاصل از سخت‌پوستان گردید. Kim و همکاران (۲۰۰۵) با تحقیق بر روی فعالیت‌های بیولوژیکی و محصولات آنزیمی حاصل از الیگوساکاریدهای مشتق شده از کیتوزان بر تاثیر مثبت آن‌ها بر کنترل سطوح کلسترول در خون صحه گذاشتند. در شرایط آزمایشگاهی تاثیر سطوح کیتوزانی آماده‌شده بر روی تری‌گلیسیریدها و اسیدهای صفاوی و خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها توسط Zhou و همکاران (۲۰۰۶) بیان گردید. نقش کیتوزان در پایین نگه داشتن سطوح چربی خون و تنظیم سطوح نرمالی از میزان کلسیم، آهن و منیزیم در افراد با چربی خون بالا به اثبات رسیده است (Liao و همکاران، ۲۰۰۷). این تحقیقات در حقیقت تکمیل‌کننده فعالیت‌های مطالعاتی Sugano و همکاران (۱۹۸۰)؛ (۱۹۸۸) می‌باشد که ایده نوآورانه‌ای را در استفاده از کیتوزان در مهار کلسترول در موش‌هایی با عارضه کلسترول بالا بیان نمودند و تاثیر کیتوزان‌های با ویسکوزیته مختلف را بر فعالیت کلسترولی موش‌های با کلسترول بالا را مورد بررسی قرار دادند. در مورد افزایش سطوح ایمنی و خواص ضدسرطانی کیتوزان و مواد منتج شده از آن می‌توان به اثرات ضد تومور کیتوزان و الیگومر هگزان- استیل کیتوهگزائوز در مطالعه Suzuki و همکاران (۱۹۸۶) و بررسی مهارکنندگی رشد تومورهای سخت توسط الیگومر هگزان- استیل کیتوهگزائوز و کیتوهگزائوز توسط Tokoro و همکاران (۱۹۸۸) اشاره نمود. تا سال ۲۰۱۵ بیش از ۱۵ مطالعه در مورد خواص ضدسرطانی و ضدالتهابی کیتوالیگوساکاریدها در مجلات مختلف به چاپ رسیده است (Azuma و همکاران، ۲۰۱۵). بررسی فعالیت‌های فیزیولوژیکی و استفاده از کیتوزان به عنوان غذا دارو به مطالعات Xia و همکاران (۲۰۰۳) بر می‌گردد، که در حقیقت با تاکید بر افزایش سطح ایمنی، کاربرد آن به عنوان غذا دارو مطرح گردید. از کیتوزان و ترکیبات استخراج شده از آن به منظور رهایش دارویی در تحقیقات برخی از محققین استفاده شده است که در ذیل به آن‌ها اشاره می‌گردد. پیشرفت‌های چشمگیری در انتقال دارو توسط میکرو و نانو ذرات بر پایه کیتوزان انجام پذیرفت (Agnihotri و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین طی یک تحقیق Thanou و همکاران (۲۰۰۱) اعلام کردند که کیتوزان و برخی از مواد استخراج شده از آن دارای جذب روده‌ای مناسبی بوده که به منظور انتقال دارو می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. در تحقیق دیگری که بر روی موش انجام پذیرفت مشاهده شد، با بهره‌گیری از کیتوزان میزان جذب کلسی تونین از طریق بینی در مقایسه با هیدروکسی پروپیل و دی متیل بتا-سیکلودکسترین افزایش معنی‌داری رانشان داد (Sinswat و همکاران، ۲۰۰۳). Bravo-

محلول کیتوزان با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فریسیانید پتاسیم یک درصد (w/v) مخلوط شد. مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط واکنش سپس در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سرانجام ۲/۵ میلی لیتر از مایع رویی برداشته شد و با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلریدفریک ۰/۱ درصد (w/v) ترکیب گردید و بعد از گذشت ۱۰ دقیقه جذب آن در ۷۰۰ نانومتر اندازه گرفته شد. میزان جذب بالاتر بیانگر میزان بالاتر قدرت کاهندگی می باشد (Younes و همکاران، ۲۰۱۲).

سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل: اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس های سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که در طول موج ۶۹۵ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می باشند. این کمپلکس ها بسیار پایدار بوده و با حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنولی تحت تاثیر قرار نمی گیرد. عصاره های که شدت جذب بالاتری در این طول موج دارند، ظرفیت آنتی اکسیدانی بیش تری از خود نشان می دهند (Prieto و همکاران، ۱۹۹۹).

نتایج

استخراج کیتوالیگوساکاریدها از منابع نرم تن مشخص شده در پژوهش به دو روش آنزیمی (پکتیناز) و اسیدی (اسید کلریدریک) انجام پذیرفت، نتایج در جدول ۱ ملاحظه می گردد.

جدول ۱: مقایسه روش های مختلف جهت استحصال کیتوالیگوساکارید

گونه	کیتوزان (گرم)	میزان استحصال (روش آنزیمی) (گرم)	میزان استحصال (روش اسیدی) (گرم)
میگو وانامی	۱۰	۸/۳۲ ^a	۶/۳۵ ^d
خرچنگ گرد	۱۰	۷/۱۵ ^b	۶/۴۷ ^c
اسکوئید هندی	۱۰	۷/۰۸ ^b	۲/۹۳ ^e

نتایج آزمون خنثی سازی رادیکال DPPH: اساس کار این آزمون بر اندازه گیری کاهش رادیکال های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر استوار است که در مقایسه با اسیدآسکوربیک نتایج در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی: در این آزمون میزان جذب بالاتر بیانگر میزان بالاتر قدرت کاهندگی می باشد، نتایج به صورت جذب در ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری شده و در مقایسه با اسیدآسکوربیک در جدول ۳ آورده شده است.

Osuna و همکاران (۲۰۰۷)، در یک ارزیابی آزمایشگاهی، ظرفیت جذب کلسیم توسط نانوذرات کیتوزان و ایزومر سیانو کریستاله کیتوزان واجد هسته را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق دیگری حمل و رهایش داروهای با وزن مولکولی کم توسط کیتوزان و سایر مشتقات آن با موفقیت به اثبات رسید (Park و همکاران، ۲۰۱۰).

مواد و روش ها

استخراج کیتوالیگوساکارید: به منظور تولید کیتوالیگوساکارید از کیتوزان های استخراجی از دو روش پیشنهادی Cutsem و Cabrera (۲۰۰۵) به روش ذیل استفاده شد: در روش آنزیمی، میزان ۱۰ گرم کیتوزان در بافر استات ۰/۱۷۵ مول حل شده و در دمای اتاق به مدت یک شب نگه داری می شود. این محلول کیتوزان (۹۰ میلی لیتر) را با ۱۰ میلی لیتر SPL (آنزیم پکتیناز) مخلوط نموده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. در استخراج اسیدی، ۲ گرم کیتوزان در اسید استیک حل نموده و در شرایط خلا تا ایجاد یک خمیر ژلاتینی ادامه یافت. ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷٪ به آن افزوده و سوسپانسیون موجود برای ۳۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بر روی شیکر قرار گرفت. سپس در حمام یخ غوطه ور شد. قسمت اعظم حلال و اسید کلریدریک تحت شرایط خلا تبخیر شده و باقی مانده دوباره در آب حل شده و محلول تبخیر گردید. دوبار این عمل انجام شد. سپس باقی مانده در آب مقطر حل شد و با افزودن سود ۱۰ مولار pH به ۶/۵ رسانده شد. در نهایت رسوبات حاصل از کیتوزان هیدرولیز شده با غلظت ۷۰ و ۹۰ درصد متانول خنثی گردید، سانتریفیوژ شد و با متانول شستشو داده شد و در شرایط خلا خشک شد. سوپر ناتانت تحت فشار تغلیظ گردید. پس از تولید کیتوالیگوساکاریدها آزمایشات مشخص شده برای ارزیابی خواص زیست فعالی بر روی نمونه ها انجام پذیرفت.

سنجش خواص آنتی اکسیدان

آزمون خنثی سازی رادیکال DPPH: به منظور انجام آزمون خنثی سازی رادیکال DPPH، ۵۰۰ میکرو لیتر از نمونه کیتوزان را در غلظت های مختلف (۰/۵ تا ۴ میلی گرم در میلی لیتر) و در اسیداستیک ۰/۱ درصد حل کرده و سپس با ۳۷۵ میکرو لیتر اتانول ۹۹/۵ درصد و ۱۲۵ میکرو لیتر DPPH ۰/۰۲ درصد در اتانول ۹۹/۵ درصدی به آن افزوده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در محل تاریک قرار داده شد و کاهش رادیکال های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری گردید (Bersuder و همکاران، ۱۹۹۸).

آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی: در آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی نیز یک میلی لیتر از



نتایج سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: در این روش عصاره‌هایی که شدت جذب بالاتری در طول موج ۶۹۵ نانومتر دارند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند. اساس کار در این روش

احیاء مولیبیدن ۶ ظرفیتی به مولیبیدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. معادله خط به‌دست آمده عبارت بود از: $y = 0.0032x$ که با قرار دادن در معادله، آنتی‌اکسیدان کل به‌شرح جدول ۴ به‌دست آمد.

جدول ۲: نتایج آزمون خنثی‌سازی رادیکال DPPH

میلی گرم / میلی لیتر	خرچنگ گرد (آنزیم)	میگو وانامی (آنزیم)	اسکوئید هندی (آنزیم)	خرچنگ گرد (اسید)	میگو وانامی (اسید)	اسکوئید هندی (اسید)	آسکوربیک اسید (VC)
۰/۵	۵۳/۸۸±۰/۴۲ ^c	۶۴/۱۵±۰/۴۶ ^b	۴۴/۶۶±۰/۵۹ ^f	۴۵/۱۴±۰/۸۹ ^e	۳۹/۸۰±۰/۵۱ ^g	۴۶/۸۴±۰/۸۸ ^d	۶۸/۴۹±۰/۴۳ ^a
۱	۵۶/۵۵±۰/۶۱ ^d	۶۹/۶۶±۰/۸۷ ^b	۵۰/۱۶±۰/۷۵ ^e	۴۷/۸۹±۰/۷۰ ^f	۴۶/۵۲±۰/۹۱ ^g	۶۰/۴۳±۰/۲۵ ^c	۷۵/۸۳±۰/۲۴ ^a
۲	۷۰/۰۶±۰/۱۲ ^d	۷۳/۰۵±۰/۸۳ ^b	۵۱/۶۹±۰/۱۱ ^g	۶۸/۷۷±۰/۱۲ ^e	۵۶/۳۱±۰/۹۸ ^f	۷۴/۵۱±۰/۳۰ ^c	۸۳/۴۹±۰/۰۹ ^a
۴	۷۳/۵۴±۰/۲۴ ^c	۷۴/۶۷±۰/۶۱ ^d	۶۳/۹۱±۰/۴/۸۸ ^g	۶۸/۹۳±۰/۸۷ ^f	۷۱/۴۴±۰/۵۵ ^e	۷۸/۲۳±۰/۶۴ ^b	۸۷/۶۴±۰/۷۶ ^a

جدول ۳: نتایج آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی

میلی گرم / میلی لیتر	خرچنگ گرد (آنزیم)	میگو وانامی (آنزیم)	اسکوئید هندی (آنزیم)	خرچنگ گرد (اسید)	میگو وانامی (اسید)	اسکوئید هندی (اسید)	آسکوربیک اسید (VC)
۰/۵	۱۱/۱±۰/۰۰۴ ^e	۱۱/۴±۰/۰۰۱ ^d	۱۱/۶±۰/۰۰۲ ^c	۵/۷±۰/۰۰۱ ^g	۱۱/۱±۰/۰۰۵ ^f	۱۲/۹±۰/۰۰۱ ^b	۵۱/۵±۰/۰۰۱ ^a
۱	۱۳/۴±۰/۰۰۱ ^c	۱۱/۷±۰/۰۰۱ ^e	۱۲/۷±۰/۰۰۱ ^d	۸±۰/۰۰۷ ^g	۱۱/۷±۰/۰۰۴ ^f	۱۳/۹±۰/۰۰۱ ^b	۵۹/۳±۰/۰۰۵ ^a
۲	۱۳/۶±۰/۰۰۱ ^c	۱۳/۱±۰/۰۰۳ ^e	۱۳/۳±۰/۰۰۲ ^d	۱۰/۱±۰/۰۰۳ ^g	۱۲/۳±۰/۰۰۱ ^f	۱۵±۰/۰۰۳ ^b	۷۲/۷±۰/۰۱۲ ^a
۴	۱۹/۰±۰/۰۰۲ ^b	۱۳/۸±۰/۰۰۱ ^f	۱۷/۷±۰/۰۰۲ ^c	۱۱/۷±۰/۰۰۴ ^g	۱۴/۲±۰/۰۰۱ ^e	۱۷/۲±۰/۰۰۲ ^d	۸۱/۴±۰/۰۰۸ ^a

جدول ۴: نتایج سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

میلی گرم / میلی لیتر	خرچنگ گرد (آنزیم)	میگو وانامی (آنزیم)	اسکوئید هندی (آنزیم)	خرچنگ گرد (اسید)	میگو وانامی (اسید)	اسکوئید هندی (اسید)
۰/۵	۱۸/۷۵±۰/۲۵ ^c	۲۰/۵۲±۰/۶۵ ^a	۱۸/۲۳±۰/۶۵ ^c	۲۰/۲۰±۰/۷۲ ^b	۱۸/۰۲±۰/۳۰ ^c	۱۷/۹۲±۰/۴۸ ^c
۱	۲۵/۲۱±۰/۷۹ ^a	۲۲/۲۹±۰/۴۸ ^c	۲۵/۴۲±۰/۷۹ ^a	۲۱/۶۷±۰/۴۸ ^c	۲۱/۸۸±۰/۶۲ ^c	۲۳/۲۳±۰/۱۱۸ ^b
۲	۲۹/۳۸±۰/۵۶ ^a	۲۵/۰۰±۰/۱۳ ^d	۲۷/۶۰±۰/۶۵ ^b	۲۷/۶۱±۰/۲۶ ^b	۲۵/۵۲±۰/۷۹ ^c	۲۹/۴۸±۰/۲۳۰ ^a
۴	۳۲/۸۱±۰/۹۴ ^c	۲۸/۱۳±۰/۶۳ ^e	۲۹/۳۸±۰/۱۳ ^d	۳۲/۲۹±۰/۸۳ ^c	۴۲/۱۹±۰/۷۴ ^a	۳۸/۰۲±۰/۸۲ ^b

بحث

در استخراج آنزیمی کیتوالیگوساکارید، نسبت به استخراج اسیدی به‌مراتب استحصال با نتایج بهتر حاصل شد. این تفاوت به‌نظر می‌رسد که از اختصاصی عمل کردن آنزیم حاصل شده و آسیب کم‌تری به کیتوزان وارد کرده و در نتیجه مقدار بیش‌تری کیتوالیگوساکارید به‌دست آمد. نتایج خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل با الیگوساکاریدهای استخراجی از نرم‌تنان و مقایسه آن با ویتامین C نشان داد که کیتوالیگوساکاریدهای استحصال شده خواص آنتی‌اکسیدانی نسبتاً مناسبی از خود نشان دادند. در جایگاه نخست و با کمی فاصله از ویتامین C الیگوساکارید اسکوئید هندی با استخراج اسیدی با ۷۸/۲۳ درصد (غلظت ۴ میلی‌گرم) و با فاصله کمی از آن، الیگوساکارید استخراج آنزیمی میگو وانامی و الیگوساکارید استخراج آنزیمی خرچنگ گرد به ترتیب با ۷۴/۶۷٪ و ۷۳/۵۴٪ قرار گرفتند. در تمامی نمونه‌ها با افزایش

غلظت کیتوالیگوساکارید میزان خنثی‌سازی افزایش چشمگیری را نشان داد. نتایج این آزمون با نتایج Ramasamy و همکاران (۲۰۱۴) که بر روی کیتوزان استخراجی از گونه *Sepia kobeensis* انجام شد، هم‌خوانی دارد. که البته بالا بودن نسبی درصد‌های خنثی‌سازی به‌دست آمده از کیتوالیگوساکاریدها استخراجی در تحقیق حاضر می‌تواند به‌دلیل پایین بودن وزن مولکولی کیتوالیگوساکاریدها نسبت به کیتوزان باشد که در پژوهش Jo و همکاران (۲۰۱۳) نیز نتیجه مشابه حاصل شد که با کاهش وزن مولکولی تاثیرات زیست‌فعال الیگوساکارید حاصل از کیتوزان افزایش چشمگیری پیدا کرد. در تحقیق Yen و همکاران (۲۰۰۸) میزان خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل توسط ۱۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر کیتوزان استحصالی از خرچنگ گرد ۴/۳-۴۶/۵۲ درصد تعیین گردید. در تحقیق حاضر که از غلظت‌های ۰/۵ تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر کیتوالیگوساکارید خرچنگ گرد استفاده شد



ارتباط بسیار نزدیکی با بیماری‌های آسیب‌زا از قبیل: سرطان، آسیب‌های سلولی و تصلب شرائین می‌باشند (Li و همکاران، ۲۰۱۶). مطالعات بر روی کیتوالیگوساکاریدها و مواد استخراج شده از آنها، توانائی بالای قدرت احیائی کل، این مواد را نشان دادند، هم‌چنین توانایی موثر در جذب رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون‌های سوپر اکسیدکننده را به اثبات رساند (Feng و همکاران، ۲۰۰۶). کیتوالیگوساکاریدها توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های پیوسته را تا زمانی که بتوانند یون‌های مثبت مورد نیاز رادیکال آزاد را تامین نمایند، دارا هستند و آنها را تبدیل به ترکیبات پایدار می‌نمایند. در ضمن کیتوالیگوساکاریدها توانایی ایجاد باندهای هیدروژنی فرا مولکولی دارند که گروه‌های هیدروکسیل و گروه‌های آمینی را احاطه می‌نماید و به تناسب طول زنجیره، نیروی بین مولکولی را کاهش می‌دهند. با این حال بسیاری از گروه‌های هیدروکسیل و آمینی فعال پس از قرار گرفتن در معرض کیتوالیگوساکاریدها، به راحتی فعال شده و در مهار رادیکال‌های آزاد نقش ایفا می‌کنند (Sun و همکاران، ۲۰۰۶). نسل جدیدی از کیتوالیگو ساکاریدها که از ترکیب با اسیدگالیک حاصل می‌شوند، استرس‌های اکسیداتیو را، با افزایش بیان آنزیم‌های اکسیدکننده مانند گلوکوتاتیون (GSH) و سوپراکسیددسموتاز (SOD) کاهش می‌دهند (Ngo و همکاران، ۲۰۱۱) و Huang و همکاران (۲۰۱۴) با بهره بردن از سلول‌های SH-SY5Y و تحقیق بر تاثیر کیتوالیگوساکاریدها بر روی یون مس Cu^{2+} (که موجب آسیب‌های اکسیداسیونی می‌شود)، دریافتند که کیتوالیگو ساکاریدها، می‌توانند سطوح استرس‌های اکسیداتیو را با کاهش ترکیبات سلولی، تقلیل دهند. هم‌چنین در پژوهشی دیگر با ترکیب کیتوالیگو ساکارید و ۴- هیدروکسی بنزالدهید (HB-COS) مشخص شد سطح اکسیژن و واکنش‌پذیر در تولید و کاهش محتوای پروتئینی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر ۱- هم اکسیژناز (HO-1) و کاتالاز (CAT) کاهش می‌یابد (Oh و همکاران، ۲۰۱۷). کیتوالیگوساکارید به‌طور آشکاری میزان H_2O_2 (که القاء استرس‌های اکسیداتیو را موجب می‌شود) را در سلول‌های ECV304 کاهش می‌دهد (Liu و همکاران، ۲۰۰۹). Xie و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی بر روی خوک‌های آبستن اثرات آنتی‌اکسیداسیونی، مکمل کیتوالیگوساکارید را کشف کردند. نتایج نشان دادند که با بهره بردن از مکمل کیتوالیگوساکارید، سطح پلاسمای کل SOD به اندازه بیان mRNA ژن‌های آنتی‌اکسیدانی در جفت افزایش یافت در حالی که سطح پلاسمای مالون دی‌آلدهید (MDA) کاهش چشمگیری نشان داد. به‌علاوه کیتوالیگوساکاریدها توانایی واکنش تدافعی گیاهان را با تعدیل نمودن عملکرد آنزیم‌ها افزایش می‌دهند. Zou و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی جوانه گندم، پتانسیل اثر محافظتی سولفات کیتوالیگوساکارید (SCOS) در پاسخ‌های دفاعی گیاهان تحت استرس شوری تایید نمودند. این نتایج مشخص نمودند که SCOS با

و درصدهای ۵۳/۸۸ تا ۷۳/۵۴ برای استخراج آنزیمی کیتوالیگوساکارید و ۴۵/۱۴ تا ۶۸/۹۳٪ استخراج اسیدی کیتوالیگوساکارید از کیتوزان خرچنگ گرد دست آمد، که هم از نظر مقدار مصرف ماده واجد خاصیت آنتی‌اکسیدانی و هم درصد خنثی‌سازی نتایج بهتری را شاهد هستیم. همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد شاید استخراج آنزیمی و آسیب کم‌تری که به بافت کیتوالیگوساکارید وارد کرده موجب شده درصد خنثی‌کنندگی در استخراج آنزیمی خرچنگ گرد نسبت به استخراج آنزیمی نتایج بهتری به دست آید. بالا بودن توان خنثی‌سازی رادیکال DPPH در کیتوالیگوساکارید استحصال اسیدی از اسکوئید (۷۸/۲۳٪) شاید به‌خاطر ساختار خاص کیتین در این آبری باشد که در تحقیق Abdelmalek و همکاران (۲۰۱۷) اشاره گردیده است: کیتین و کیتوزان حاصل از اسکوئید از نوع β -chitin می‌باشد. در آزمون دوم که با بررسی احیا در برابر یون آهن و در مقایسه با ویتامین C به‌عنوان شاهد صورت پذیرفت. هرچند در این آزمون تفاوت معنی‌داری بین شاهد و کیتوالیگوساکاریدهای استخراجی ملاحظه گردید، ولی در میان کیتوالیگو ساکاریدهای موجود، کیتوالیگوساکارید خرچنگ گرد با استخراج آنزیمی بیش‌ترین اثر فعالیت احیایی را از خود نشان داد. در تمامی نمونه‌ها هم با افزایش غلظت شاهد بالا رفتن فعالیت احیایی بودیم، که با نتایج تحقیقات سلیمانی و همکاران (۱۹۹۴)، Fu و همکاران (۲۰۱۱) و Ferreira و همکاران (۲۰۰۷) هم‌خوانی دارد. عصاره‌های مورد آزمایش به‌عنوان عاملی احیاکننده، می‌توانند Fe^{+3} را به Fe^{+2} تبدیل کنند، هم‌چنین، میزان قدرت احیاکنندگی با افزایش غلظت، رابطه مستقیم دارد، که در پژوهش حاضر نیز این مساله تایید گردید. و کیتوالیگوساکارید حاصل از پوسته خرچنگ با استخراج آنزیمی ۱۹/۰ درصد و کیتوالیگوساکارید استخراج آنزیمی حاصل از اسکوئید با ۱۷/۷ درصد در بالاترین غلظت (۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) خاصیت احیاکنندگی مناسبی از خود نشان دادند. در آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بالاترین غلظت، کیتوالیگوساکارید میگو و انامی استخراج اسیدی بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۴۲/۱۹) در غلظت ۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر را از خود نشان داد. در تحقیق مشابهی که بر روی جنس *Podophthalmus* توسط Prabu و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده شد که با افزایش غلظت کیتوزان مورد آزمایش از ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت تصاعدی افزایش پیدا نمود. در تحقیق مذکور در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کیتوزان استخراجی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حدود ۸۰ را نشان داد، تجمیع نتایج بیانگر این است که با افزایش غلظت کیتوزان و مشتقات آن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش تصاعدی و معنی‌داری پیدا می‌کند. در تکمیل نتایج حاصل از پژوهش و علل عملکرد آنتی‌اکسیدانی کیتوالیگوساکاریدهای حاصل از نرم‌تنان دریایی بایستی بیان داشت که استرس‌های اکسیداتیو در



- Isolation of Antioxidants by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 75, pp: 181-187.
۶. **Bravo-Osuna, I.; Millotti, G.; Vauthier, C. and Ponchel, G., 2007.** In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 338, No. 12, pp: 284-290.
۷. **Feng, T.; Du, Y.; Li, J.; Wei, Y. and Yao, P., 2006.** Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan in vitro. *European Food Research and Technology*. Vol. 225, No. 1, pp: 133-138.
۸. **Ferreira, I.; Baptista, P.; Vilas-Boas, M. and Barros, L., 2007.** Free-radical scavenging antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. *CJNM*. Vol. 10, pp: 421-428.
۹. **Fu, L.; Xu, B.T.; Xu, X.R.; Gan, R.Y.; Zhang, Y. and Xia, E.Q., 2011.** Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chem*. Vol. 129, pp: 345-350.
۱۰. **Huang, H.C.; Hong, L.; Chang, P.; Zhang, J.; Lu, S.Y.; Zheng, B.W. and Jiang, Z.F., 2014.** Chitooligosaccharides Attenuate Cu²⁺-Induced Cellular Oxidative Damage and Cell Apoptosis Involving Nrf2 Activation. *Neurotoxicity Research*. Vol. 27, No. 4, pp: 411-420.
۱۱. **Jo, S.H.; Ha, K.S.; Moon, K.S.; Kim, J.G.; Oh, C.G.; Kim, Y.C.; Apostolidis, E. and Kwon, Y.I., 2013.** Molecular Weight Dependent Glucose Lowering Effect of Low Molecular Weight Chitosan Oligosaccharide (GO2KA1) on Postprandial Blood Glucose Level in SD Rats Model. *Vol. 14, pp: 14214-14224.*
۱۲. **Kim, J.Y.; Lee, J.K.; Lee, T.S. and Park, W.H., 2003.** Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 32, No. 1-2, pp: 23-27.
۱۳. **Kim, S.K. and Rajapakse, N., 2005.** Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 62, No. 4, pp: 357-368.
۱۴. **Li, K.; Xing, R.; Liu, S. and Li, P., 2016.** Advances in preparation, analysis and biological activities of single

تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند به‌واسطه وجود گروه سولفات، امکان‌جوانه‌زنی گندم را تحت آسیب‌های استرس شوری میسر سازند. کادمیوم یکی از فلزات سنگینی است که اثرات زیان‌باری بر بازده و کیفیت محصول می‌گذارد. کیتوالیگوساکاریدها مقاومت گیاه در برابر کادمیوم را با ارتقاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌دهند (Zong و همکاران، ۲۰۱۷). در بررسی‌های انجام شده تقریباً در تمام آزمون‌ها کیتوالیگوساکاریدها توانایی مهاری خوبی از خود نشان دادند که می‌توانند به‌عنوان یک منبع ایده آل برای تحقیقات آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار بگیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان، نهایت تشکر و قدردانی خود را از آقایان دکتر مهدی عبدالمهدی و دکتر بهروز محمدزاده ابراز نموده و همچنین تشکر از همکاری بی‌دریغ مسئولین آزمایشگاه دانشکده علوم دریائی تربیت مدرس، مهندس نورانی و مهندس کمالی که در راستای انجام این پژوهش داشته‌اند را ابراز می‌دارند.

منابع

۱. سلیمانی، س.؛ یوسفی‌زاده، م.؛ معین، س.؛ امراللهی‌بیوکی، ن.؛ کشاورز، م. و اصلیان، ح.، ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعیین محتوای پلی‌فنلی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* خلیج فارس. زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس. دوره ۶، شماره ۲، صفحات ۷۱ تا ۸۲.
۲. **Agnihotri, S.A.; Mallikarjuna, N.N. and Aminabhavi, T.M., 2004.** Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. Vol. 100, No. 1, pp: 5-28.
۳. **Azuma, K.; Izumi, R.; Osaki, T.; Ifuku, S.; Morimoto, M.; Saimoto, H. and Minami, S., 2015.** Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *Journal of functional biomaterials*. Vol. 6, No. 1, pp: 104-142.
۴. **Baha, E.A.; Assaad, S.; Anissa, H.; Ali, B. and Mohamed, A.A., 2017.** β -chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 104, pp: 953-962.
۵. **Bersuder, P.; Hole, M. and Smith, G., 1998.** Antioxidants from a Heated Histidine-Glucose Model System. I: Investigation of the Antioxidant Role of Histidine and



۲۴. **Sinswat, P. and Tengamuay, P., 2003.** Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl-b cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 257, No. 12, pp: 15-22.
۲۵. **Sugano, M.; Fujikawa, T.; Hiratsuji, Y.; Nakashima, K.; Fukuda, N. and Hasegawa, Y., 1980.** A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 33, pp: 787-793.
۲۶. **Sun, T.; Zhou, D.; Xie, J. and Mao, F., 2006.** Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. Vol. 225, No. 3-4, pp: 451-456.
۲۷. **Suzuki, K.; Mikami, T.; Okawa, Y.; Tokoro, A.; Suzuki, S. and Suzuki, M., 1986.** Antitumor effect of hexa-N acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Research*. Vol. 151, pp: 403-408.
۲۸. **Thanou, M.; Verhoef, J.C. and Junginger, H.E., 2001.** Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 50, No. S1, pp: S91-S101.
۲۹. **Tokoro, A.; Tatewaki, N.; Suzuki, K.; Mikami, T.; Suzuki, S. and Suzuki, M., 1988.** Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 36, pp: 784-790.
۳۰. **Uchida, Y.; Lzume, M. and Ohtakara, A., 1989.** Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In G. Skjak-Brak, T. Anthonsen, & P. Sandford (Eds.), *Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications* London: Elsevier. pp: 373-382.
۳۱. **Van, P.; Cutsem, J. and Cabrera, C., 2005.** Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 25, No. 2, pp: 165-172
۳۲. **Wei, X.L. and Xia, W.S., 2003.** Research development of chitooligosaccharides physiological activities. *Chinese Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 19, No. 6, pp: 614-617.
- chitooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 139, pp: 178-190.
۱۵. **Liao, F.H.; Shieh, M.J.; Chang, N.C. and Chien, Y.W., 2007.** Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. *Nutrition Research*. Vol. 27, No. 3, pp: 146-151.
۱۶. **Liu, H.T.; Li, W.M.; Xu, G.; Li, X.Y.; Bai, X.F.; Wei, P. and Du, Y.G., 2009.** Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacological Research*. Vol. 59, No. 3, pp: 167-175.
۱۷. **Ming, T.Y.; Joan, H.Y. and Jeng, L.M., 2008.** Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 74, pp: 840-844.
۱۸. **Ngo, D.H.; Qian, Z.J.; Vo, T.S.; Ryu, B.; Ngo, D.N. and Kim, S.K., 2011.** Antioxidant activity of gallate-chitooligosaccharides in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 84, No. 4, pp: 1282-1288.
۱۹. **Oh, S.H.; Ryu, B.; Ngo, D.H.; Kim, W.S.; Kim, D.G. and Kim, S.K., 2017.** 4-hydroxybenzaldehyde-chitooligomers suppresses H₂O₂-induced oxidative damage in microglia BV-2 cells. *Carbohydrate Research*. Vol. 440, pp: 32-37.
۲۰. **Park, J.H.; Saravanakumar, G.S.; Kim, K.Y. and Kwon, C., 2010.** Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 62, No. 1, pp: 28-41.
۲۱. **Prabu, K. and Natarajan, E., 2012.** In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Chitosan Isolated from *Podophthalmus vigil*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 2, No. 9, pp: 75-82.
۲۲. **Prieto, P.; Pineda, M. and Aguilar, M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin, *Analytical biochemistry*.
۲۳. **Pasiyappazham R.; Namasivayam, S.; Vairamani, S. and Annaian, S., 2014.** Extraction, characterization and antioxidant property of chitosan from cuttlebone *Sepia kobeiensis* (Hoyle 1885). *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 64, pp: 202-212.



۳۳. **Xia, W.S., 2003.** Physiological activities of chitosan and its application in functional foods. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*. Vol. 3, No. 1, pp: 77-81.
۳۴. **Xie, C.; Wu, X.; Long, C.; Wang, Q.; Fan, Z.; Li, S. and Yin, Y., 2016.** Chitosan oligosaccharide affects antioxidant defense capacity and placental amino acids transport of sows. *BMC Veterinary Research*. Vol. 12, No. 1.
۳۵. **Younes, O.; Ghorbel-Bellaaj, R.; Nasri, M.; Chaabouni, M.; Rinaudo, M. and Nasri, S. 2012.** *Process Biochem*. Vol. 47, pp: 2032-2039.
۳۶. **Zhao, X.R. and Xia, W.S., 2006.** Antimicrobial activities of chitosan and application in food preservation. *Chinese Food Research and Development*. Vol. 27, No. 2, pp: 157-160.
۳۷. **Zhou, K.; Xia, W.; Zhang, C. and Yu, L., 2006.** In vitro binding of bile acids and triglycerides by selected chitosan preparations and their physicochemical properties. *LWT Food Science and Technology*. Vol. 39, pp: 1087-1092.
۳۸. **Zong, H.; Li, K.; Liu, S.; Song, L.; Xing, R.; Chen, X. and Li, P., 2017.** Improvement in cadmium tolerance of edible rape (*Brassica rapa* L.) with exogenous application of chitooligosaccharide. *Chemosphere*. Vol. 181, pp: 92-100.
۳۹. **Zou, P.; Li, K.; Liu, S.; He, X.; Zhang, X.; Xing, R. and Li, P., 2016.** Effect of sulfated chitooligosaccharides on wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 64, pp: 2815-2821.

