

بررسی خواص آنتی اکسیدانی کیتوزان استخراج شده از پوسته میگو رودخانه‌ای (*Macrobrachium nipponenes*)

- **نفیسسه تنها:** گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶
- **کتایون کریمزاده*:** گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶
- **عسگر زحمتکش:** گروه شیلات، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

کیتوزان یکی از مهم‌ترین پلیمرهای زیست فعال است که مشتق استیل زدایی شده کیتین می‌باشد. در مطالعه حاضر، کیتوزان با استیل زدایی کیتین در طی زمان‌های مختلف از پوسته میگو رودخانه‌ای تهیه گردید. جهت مقایسه خواص آنتی اکسیدانی کیتوزان‌های به دست آمده (C_{۶۰}، C_{۸۰} و C_{۱۰۰}) در زمان‌های ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه، از ویژگی‌هایی شامل فعالیت آنتی اکسیدانی، قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفنیل، ۱-پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، قدرت مهار رادیکال پراکسید هیدروژن، قدرت کاهندگی و کیلاته کنندگی کاتیون آهن سه ظرفیتی استفاده گردید. توان کاهندگی کیتوزان (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بین ۰/۴۲-۰/۲۷ به دست آمد. توانایی مهار کیتوزان C_{۶۰} نسبت به رادیکال DPPH، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۲۶/۲ درصد بود، در حالی که توانایی حذف این رادیکال توسط کیتوزان‌های C_{۸۰} و C_{۱۰۰} به ترتیب برابر با ۴۴/۳ و ۵۰/۴ درصد ثبت گردید. قابلیت مهار رادیکال‌های پراکسید هیدروژن، در دامنه ۵۸/۴ تا ۷۵/۶ درصد برآورد گردید، در حالی که در ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قابلیت‌های کیلاته کنندگی یون‌های آهن، ۶۴/۳ تا ۸۶/۸ درصد مشاهده شد. مقادیر غلظت موثر برای فعالیت آنتی اکسیدانی در تمام کیتوزان‌ها کم‌تر از ۱/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان‌های تهیه شده در زمان‌های مختلف، با مدت زمان استیل زدایی آن‌ها ارتباط داشت، به طوری که افزایش زمان داستیلاسیون منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان شده است (p < ۰/۰۵). کیتوزان‌های به دست آمده از میگو از فعالیت آنتی اکسیدانی قابل قبولی برخوردار بودند و می‌تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدانی در مکمل غذایی و صنایع دارویی به کار برده شوند.

کلمات کلیدی: کیتوزان، میگو رودخانه‌ای، فعالیت آنتی اکسیدانی، توان کاهندگی



مقدمه

کیتین پلی ساکاریدی می‌باشد که در پوست سخت‌پوستان، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد و دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت پس از سلولز به‌شمار می‌رود (Kim و همکاران، ۲۰۰۷). کیتین از لحاظ ساختاری، یک پلیمر راست زنجیره متشکل از پیوندهای بتا (۱-۴) β از زیرواحدهای N-استیل گلوکز آمین است و به انواع آلفا، بتا و گاما کیتین طبقه‌بندی شده است (Yen و همکاران، ۲۰۰۷). طی N-استیل‌زدایی جزئی کیتین نیز پلیمر راست زنجیره کیتوزان به‌دست آمده از گلوکوزامین و N-استیل گلوکوزامین تشکیل شده است. آلفاکیتین، فراوان‌ترین کیتین موجود در طبیعت، با زنجیره‌های پلی ساکاریدی غیرموازی است که در پوست خرچنگ، میگو و ماهیان مشاهده می‌شود. درحالی‌که بتا کیتین عمدتاً در سرپایان مشاهده شده که از زنجیره‌های موازی اتصال یافته با پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده است (Cabib و همکاران، ۱۹۹۸؛ Rinduo، ۲۰۰۶). به‌دلیل آن‌که کیتین و کیتوزان دارای ویژگی‌های بیولوژیک مفید بسیاری مانند فعالیت ضد میکروبی، سازگاری زیستی، زیست تجزیه‌پذیری، فعالیت هموستاتیکی و ویژگی ترمیم‌کنندگی زخم می‌باشند، توجه زیادی به کاربردهای زیست پزشکی آن‌ها شده است (Kim و همکاران، ۲۰۰۷؛ Lee و همکاران، ۲۰۰۹؛ Lin و همکاران، ۲۰۰۹؛ Tanha و همکاران، ۲۰۰۹). گسترش بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، آسیب‌های سلول‌های کبدی و حتی بیماری‌های قلبی و عروقی ناشی از حضور رادیکال‌های آزاد در بدن می‌باشد. آنتی اکسیدان‌ها از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند با مهار رادیکال‌های آزاد نقش ارزنده‌ای در به حداقل رساندن آسیب‌های اکسیداتیو و درمان بیماری‌های مرتبط با آن داشته باشند (Younes و همکاران، ۲۰۱۶). کیتوزان از جمله آنتی اکسیدان‌های طبیعی است که قادر است با گونه‌های فعال اکسیژنی (Reactive Oxygen Species: ROS) واکنش دهد و از پراکسیداسیون لیپیدها، وارد شدن به پروتئین‌های غشا و جهش اسید نوکلئیک غذایی و سیستم‌های زیستی جلوگیری نماید (Lee و همکاران، ۲۰۰۹). این پلیمر از توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و کیلات‌کنندگی یون‌های فلزی برخوردار است (Kim و همکاران، ۲۰۰۷؛ Lin و همکاران، ۲۰۰۹). گروه‌های هیدروکسیل و آمین از بخش‌های تاثیرگذار در فعالیت آنتی اکسیدانی در ساختار کیتوزان محسوب می‌شوند که جدا شدن آن‌ها با توجه به ساختار نیمه کریستالی و پیوندهای قوی هیدروژنی امکان‌پذیر نمی‌باشد (Xi و همکاران، ۲۰۰۱). فعالیت آنتی اکسیدانی کیتوزان استخراج شده از پوست خرچنگ و میگو و نیز مشتقات آن مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Younes و همکاران، ۲۰۱۴؛ Lee و همکاران، ۲۰۰۹؛ Park و همکاران، ۲۰۰۴؛

Jeon و Kim، ۲۰۰۱). مشتقات مطالعه شده شامل کیتوزان‌های محلول در آب (Chou و Lin، ۲۰۰۴) کربوکسی متیل کیتوزان (Guo و همکاران، ۲۰۰۵) کیتوزان سولفات‌ها و مشتقات سولفنیل آمینی کیتوزان (Zhong و همکاران، ۲۰۰۷) می‌باشد. هم‌چنین توانایی مهار رادیکال DPPH توسط کیتوزان استخراجی در برخی سخت‌پوستان از قبیل پوسته خرچنگ (Yen و همکاران، ۲۰۰۸)، پوسته میگو (Hafsa و همکاران، ۲۰۱۶) ضایعات میگو گزارش شده است (Ambigaipalan و Shahidi، ۲۰۱۷).

فراوری و تولید ترکیبات زیست فعال از آبزیان می‌تواند در بسیاری از صنایع مانند صنایع کشاورزی، پزشکی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد (Anraku و همکاران، ۲۰۱۱). آبزیان موجود در منابع آبی شمال کشور ایران از لحاظ محتوای ترکیبات زیست فعال دارای ارزش‌های فراوانی هستند. سخت‌پوستان آبی مانند شاه‌میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) و میگوی رودخانه‌ای (*Macrobrachium nipponense*) که بیش از ۵۰ درصد بدن آن‌ها را بخش‌های غیرخوراکی مانند پوسته، امعاء و احشاء و پاها تشکیل داده و ترکیب عمده این اندام‌ها نیز فیبر و خاکستر است (کریم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳) می‌توانند به‌عنوان منبع تهیه مواد زیست فعال مدنظر قرار گیرند. در این میان میگوی رودخانه‌ای یک گونه غیر بومی است که طی دو دهه اخیر وجود آن در منابع آبی شمال کشور ایران گزارش شده است (De'Grave و Chane، ۲۰۰۶؛ گرکین و علی‌محمدی، ۱۳۸۳؛ تحقیقی و همکاران، ۱۳۹۲). با وجود جمعیت قابل ملاحظه آن در آبگیرهای طبیعی و استخرهای پرورش ماهی استان‌های شمالی کشور تاکنون تحقیقاتی درخصوص استخراج مواد زیست فعال از آن صورت نگرفته است. لذا این مطالعه به‌منظور تهیه کیتوزان از پوسته میگو رودخانه‌ای و ارزیابی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی آن طی زمان‌های متفاوت واکنش استیل‌زدایی و هم‌چنین تعیین توان آنتی اکسیدانی آن با استفاده از خصوصیات نظیر توان کاهنده‌گی، توانایی راباندگی رادیکال‌ها و توانایی کیلات‌کنندگی یون‌های (آهن) طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه کیتوزان میگو: جمع‌آوری میگو رودخانه‌ای *Macrobrachium nipponense* با کمک تله تاشو در فصل بهار (اردیبهشت ۱۳۹۴) از تالاب انزلی انجام گرفت و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکز آموزش شیلات میرزاکوچک خان در رشت منتقل شدند. پس از شوک حرارتی میگوها توسط یخ، اسکلت خارجی آن‌ها به‌صورت دستی جدا شد. پوسته‌ها در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ دقیقه

مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در گرمخانه 37°C ، به هر کدام از نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر متانل، درصد افزوده شد. میزان جذب در طول موج ۲۳۴ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UU-visible (Jenwey, UK) قرائت گردید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بر حسب درصد از رابطه (۲) محاسبه گردید. از اسیداسکوربیک، بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) و آلفاتوکوفرول به‌عنوان نمونه شاهد استفاده گردید.

$$(2) \quad (A_0 - A_1 / A_0) \times 100 = \text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی}$$

که در آن A_0 میزان جذب کنترل، A_1 میزان جذب نمونه می‌باشد.

تعیین مقدار مهار رادیکال DPPH(1-diphenyl-2- Picrylhydrazyl)

جهت اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال DPPH نمونه‌ها، از روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) استفاده گردید. محلول‌هایی از کیتوزان در اسیداستیک ۰/۲ درصد تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از کیتوزان محلول در اسید به ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH اتانولی (۰/۱ میلی‌مولار DPPH در ۹۹/۵ درصد اتانل) اضافه گردید. این مخلوط به شدت تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه‌داری گردید. میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد اندازه‌گیری شد. توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH طبق رابطه (۳) محاسبه گردید:

$$(3) \quad (A_s - A_0 / A) \times 100 = \text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH}$$

که در آن A_s جذب کیتوزان، A_0 جذب بلانک و A جذب کنترل می‌باشد.

قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH کیتوزان‌ها، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) و اسیداسکوربیک در غلظت‌های مختلف (۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مقایسه شد.

تعیین مقدار مهار رادیکال پراکسید هیدروژن: میزان قدرت

مهار رادیکال پراکسید هیدروژن با روش Govindarajan و همکاران (۲۰۰۳) تعیین گردید. ابتدا محلول پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار توسط بافر نمکی فسفات (PBS) با pH برابر ۷/۴ تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از کیتوزان در اسیداستیک ۰/۲ درصد با غلظت‌های مختلف (۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) با ۲ میلی‌لیتر از محلول پراکسید هیدروژن مخلوط گردید. اسیداسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جذب نمونه در طول موج ۲۳۰ نانومتر در حضور بلانک (فاقد هیدروژن پراکسید) پس از ۱۰ دقیقه نگه‌داری در دمای 37°C قرائت شد. درصد پراکسید هیدروژن مهار شده از رابطه (۴) محاسبه گردید.

$$(4) \quad (A_0 - A_1 / A_0) \times 100 = \text{درصد مهار } \text{H}_2\text{O}_2$$

که در آن A_0 میزان جذب کنترل، A_1 میزان جذب نمونه می‌باشد.

قدرت احیاکنندگی: قدرت احیاکنندگی کیتوزان‌های به‌دست

آمده برطبق روش Oyaizu (۱۹۸۶) تعیین شد. نمونه کیتوزان در محلول اسیداستیک ۰/۲ درصد با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم

خشک گردیدند. سپس به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی پودر شدند و تا زمان آزمایش در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند.

استخراج کیتوزان از روش Yen و همکاران (۲۰۰۸) با اندکی اصلاحاتی استفاده گردید. کانی‌زدایی با اسید کلریدریک ۱ نرمال در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت و حذف پروتئین‌ها توسط محلول آبی هیدروکسید سدیم ۵٪ به نسبت ۱:۱۰ (w/v) در درجه سانتی‌گراد ۱۰۰ به مدت ۳ ساعت انجام شد. رسوب به‌دست آمده در این مرحله به‌وسیله آب دیونیزه شستشو گردید. پس از حذف ترکیبات رنگ دانه‌ای با استفاده از محلول‌های پر منگنات پتاسیم ۱ درصد و اسید اگزالیک ۱ درصد به مدت ۱ ساعت کیتوزان به‌دست آمد (Younes و همکاران، ۲۰۱۴).

جهت تهیه کیتوزان (مشتق استیل‌زدایی شده کیتوزان)، ۱ گرم کیتوزان به ۳۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد در دمای 100°C درجه سانتی‌گراد طی زمان‌های ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه افزوده گردید. بعد از فیلتراسیون و شستشو با آب دیونیزه، خشک گردید. با تقسیم وزن خشک کیتوزان به‌دست آمده به مقدار پودر اولیه پوسته‌میگو استفاده شده، درصد این پلیمرها محاسبه گردید (Younes و همکاران، ۲۰۱۴). از نمونه‌های کیتوزان به‌دست آمده طی ۶۰ دقیقه (C۶۰)، ۸۰ دقیقه (C۸۰)، ۱۰۰ دقیقه (C۱۰۰) و کیتوزان استاندارد از شرکت سیگما (CS) جهت ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید.

جهت تعیین درجه استیل‌زدایی از روش طیف‌سنجی زیر قرمز (FTIR) استفاده گردید. در این روش، درجه استیل‌زدایی کیتوزان با توجه به طیف FTIR از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$(1) \quad DD = 100 [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100] / 1.33$$

در این معادله، DD درجه استیل‌زدایی و A_{1655} پیک جذبی امید نوع اول در 1655 cm^{-1} و A_{3450} پیک جذبی گروه هیدروکسیل د

طیف‌سنجی FTIR کیتوزان: گروه‌های عاملی موجود در ساختار کیتوزان استاندارد و کیتوزان به‌دست آمده به‌روش FTIR (دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Perkin Elmer، آمریکا) بررسی شدند. در این روش، نمونه‌های کیتوزان به شکل قرص به ضخامت ۰/۲۵ میلی‌متر مخلوط با پتاسیم برمید آماده‌سازی شده و سپس در شرایط یکسان در دامنه $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ طیف آن‌ها تهیه گردید (Hajji و همکاران، ۲۰۱۴).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل: فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل کیتوزان

براساس روش Lingnert و همکاران (۱۹۷۹) تعیین شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های کیتوزان (۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) در اسید استیک ۰/۲ درصد به ۲ میلی‌لیتر اسیدیلینولئیک ۱۰ میلی‌مولار در بافر فسفات (۲۰۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=6/5$) افزوده گردید. پس از قرارگیری



مختلف از فاکتوری تحت عنوان EC_{50} (Effective Concentration) استفاده می‌شود که طبق تعریف به غلظت موثری از نمونه اطلاق می‌شود که در آن ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد در محیط واکنش مهار شوند. مقدار EC_{50} برای تمام ویژگی‌های آنتی اکسیدانی کیتوزان‌های تهیه شده، اندازه‌گیری گردید (Yen و همکاران، ۲۰۰۸).

آنالیز آماری: جهت آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد و داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن تجزیه و تحلیل گردیدند. برای پردازش داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

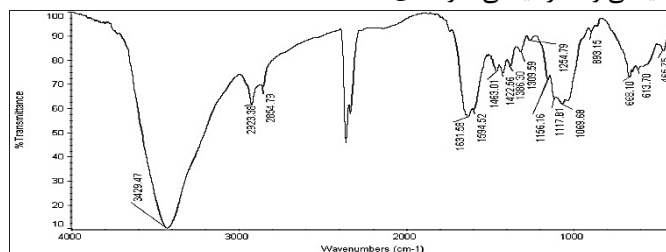
طیف‌سنجی FTIR: در شکل‌های ۱ و ۲ تصاویر مربوط آنالیز طیف‌سنجی FTIR کیتوزان استاندارد و کیتوزان تهیه شده از پوسته میگو رودخانه‌ای نشان داده شده است. در طیف FTIR کیتوزان ۱۲ پیک اصلی مشاهده می‌شود که این پیک‌ها در دامنه $1-613 \text{ cm}^{-1}$ تا $1-3429 \text{ cm}^{-1}$ قرار دارند (شکل ۱)، در حالی که طیف FTIR کیتوزان تهیه شده از پوسته میگو دارای ۶ پیک اصلی است که بین محدوده $1-931 \text{ cm}^{-1}$ تا $1-3287 \text{ cm}^{-1}$ قرار گرفته است (شکل ۲).

۰/۲ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط شد و این مخلوط در 50°C به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از اسیدتری کلرواستیک ۰٫۵ درصد به آن افزوده شد و مخلوط در ۲۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جمع‌آوری شده و با ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده و ۱ میلی‌متر کلریدفریک ۰/۱ درصد مخلوط شد. میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر در مقابل شاهد اندازه‌گیری گردید. جذب بالاتر نشان‌دهنده توان کاهنده‌گی بالاتر می‌باشد.

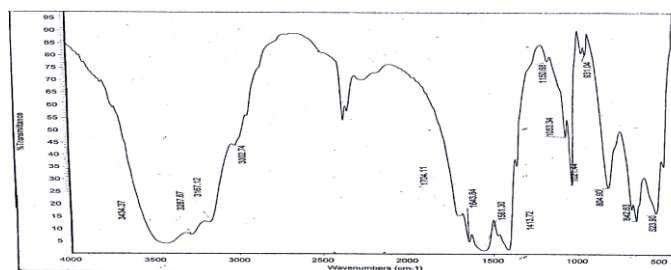
توانایی کیلات‌کنندگی یون‌های آهن: توانایی کیلات‌کنندگی بر طبق روش Dinis و همکاران (۱۹۹۴) تعیین شد. ابتدا هر یک از نمونه‌های کیتوزان محلول در اسیداستیک ۰/۲ درصد با ۳/۷ میلی‌لیتر متانول و ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آهن ۲ میلی‌مولار مخلوط شدند. واکنش با افزودن ۰/۲ میلی‌لیتر فرس سولفات ۵ میلی‌مولار آغاز شد. بعد از ۱۰ دقیقه، میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب پایین‌تر، توانایی کیلات بالاتری را نشان می‌دهد. در این آزمون از EDTA به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و درصد کیلات‌کنندگی یون آهن در هر یک از نمونه‌ها با رابطه (۵) محاسبه گردید.

$$(5) \quad \text{Ki} = 100 \times (A_1/A_0) - 1$$

A_1 نشان‌دهنده جذب نمونه و A_0 جذب کنترل را نشان می‌دهد. معمولاً جهت مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد رادیکالی نمونه‌های



شکل ۱: طیف FTIR کیتوزان استاندارد در دامنه 4000 cm^{-1} تا 400 cm^{-1}



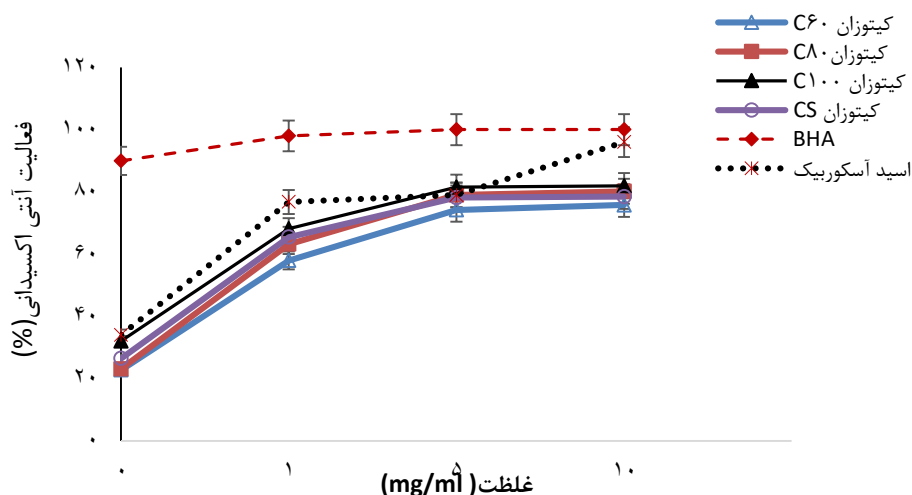
شکل ۲: طیف FTIR کیتوزان استاندارد در دامنه 4000 cm^{-1} تا 400 cm^{-1}

آنتی اکسیدانی در نمونه‌های کیتوزانی، کیتوزان استاندارد (CS) و نمونه‌های کنترل (اسیداسکوربیک و BHA) افزوده گردید. بیش‌ترین فعالیت آنتی اکسیدانی متعلق به کیتوزان C_{100} در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۸۱/۸ درصد) و کم‌ترین مقدار آن مربوط

فعالیت آنتی اکسیدانی: فعالیت آنتی اکسیدانی متوسط تا بالایی (۵۷/۵ تا ۶۸/۲ درصد) در نمونه‌های کیتوزانی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید (شکل ۳). با افزایش غلظت، میزان فعالیت

بیش‌تری را نسبت به کیتوزان‌های به‌دست آمده در زمان‌های ۸۰ و ۶۰ دقیقه نشان داد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان استاندارد، اسیداسکوربیک و BHA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲۶/۲٪، ۳۴/۱٪ و ۹۰٪ بود.

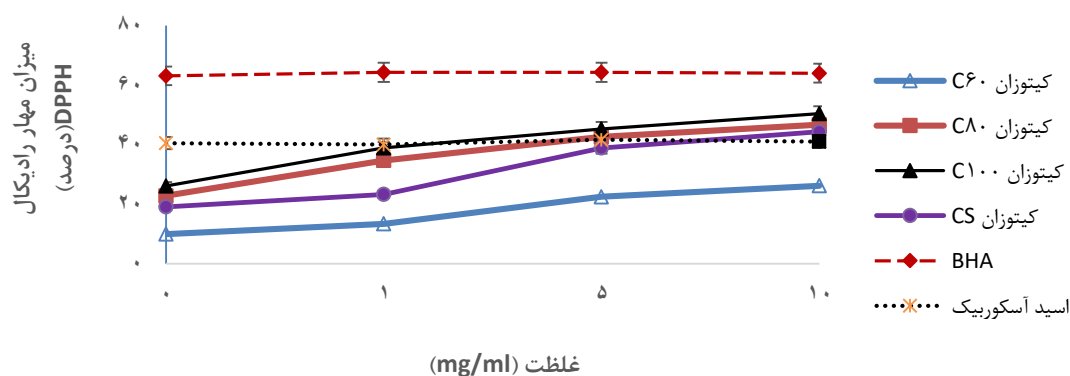
به کیتوزان C۶۰ (۲۲/۵ درصد) در این غلظت بود. به‌علاوه، بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های کیتوزانی (C۶۰، C۸۰ و C۱۰۰) با مدت زمان N-استیل‌زدایی رابطه مستقیم وجود دارد. به‌طوری‌که کیتوزان N-استیل‌زدایی شده طی ۱۰۰ دقیقه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی



شکل ۳: مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار ± میانگین)

ترتیب برابر با ۴۶/۷ و ۵۰/۴ درصد به‌دست آمد (شکل ۴). البته در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، کیتوزان استاندارد، اسید اسکوربیک و BHA قابلیت مهار کم تا متوسطی (۱۹/۱، ۴۰/۵ و ۶۳/۴ درصد) را به‌ترتیب نشان دادند.

میزان مهار رادیکال DPPH: توانایی مهار رادیکال DPPH کیتوزان C۶۰ میگو در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۲۶/۲ درصد بود. درحالی‌که قابلیت مهار دیگر کیتوزان‌ها C۸۰ و C۱۰۰ به



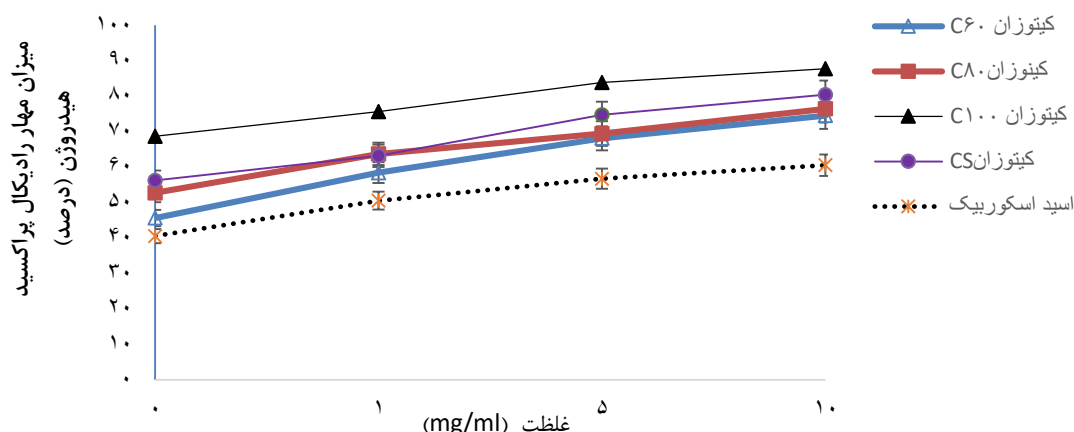
شکل ۴: مقایسه میانگین مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار ± میانگین)

در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان مهار رادیکال پراکسید هیدروژن توسط نمونه‌های کیتوزانی افزایش یافت و بیش‌ترین مقدار مهار برابر با ۸۷/۷٪ در کیتوزان C۱۰۰ مشاهده گردید. لذا بین میزان حذف رادیکال پراکسید هیدروژن و زمان استیل‌زدایی در نمونه‌های کیتوزانی رابطه مستقیمی وجود دارد.

میزان مهار رادیکال پراکسید هیدروژن: توانایی مهار رادیکال پراکسید هیدروژن نمونه‌های کیتوزانی C۶۰، C۸۰، C۱۰۰ و کیتوزان استاندارد (CS) به‌ترتیب برابر با ۴۵/۶، ۵۲/۷، ۶۸/۷ و ۵۶/۲ درصد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (شکل ۵).

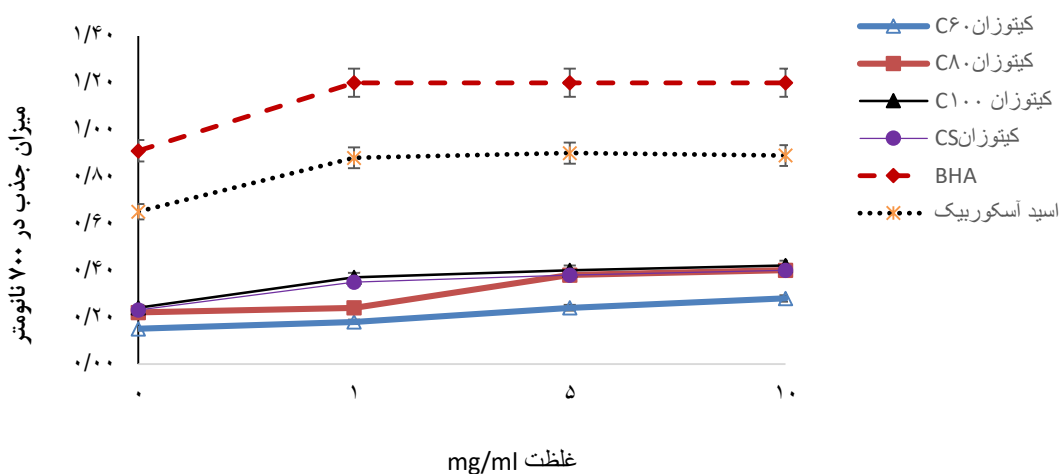




شکل ۵: مقایسه میانگین مهار رادیکال پراکسید هیدروژن در غلظت‌های مختلف کیتوزان (۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار \pm میانگین)

کنندگی برابر با ۰/۹۱، ۰/۶۵ و ۰/۲۳ به ترتیب نشان دادند. بیش‌ترین قدرت احیاکنندگی در کیتوزان‌های C۱۰۰ و C۸۰ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰/۴۲ و ۰/۴۰) و کم‌ترین مقدار در کیتوزان C۶۰ (۰/۱۵) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید.

قدرت احیاکنندگی: قدرت احیاکنندگی کیتوزان‌های میگو در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۲ به‌دست آمد (شکل ۶). BHA، اسیداسکوربیک و کیتوزان خرچنگ (CS) نیز در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توان احیا

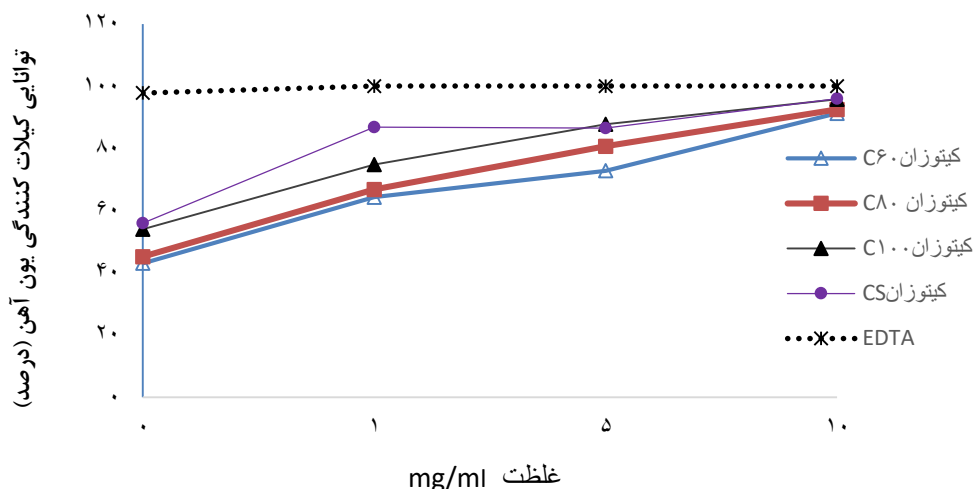


شکل ۶: مقایسه میانگین قدرت احیاکنندگی کیتوزان در غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار \pm میانگین)

داد دارد. البته EDTA، قابلیت کیلاته‌کنندگی بالای ۹۷/۹ درصد را در غلظت پایین (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد. مقادیر EC₅₀ به‌دست آمده برای هر یک از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کیتوزان‌ها و کیتوزان استاندارد (CS) در جدول ۱ آورده شده است. هرچه قدر مقادیر به‌دست آمده برای هر ویژگی آنتی‌اکسیدانی کم‌تر باشد، نمونه کیتوزانی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدرادیکالی بیش‌تری برخوردار است.

اثر کیلاته‌کنندگی بر یون‌های آهن: در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، توان کیلاته‌کنندگی یون آهن برای نمونه‌های کیتوزانی میگو در طیف ۶۴/۳ تا ۸۶/۸ درصد ثبت گردید (شکل ۷). در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش‌تر از ۹۵ درصد یون‌های آهن کیلاته شدند. به‌نظر می‌رسد که قابلیت کیلاته‌کنندگی کیتوزان‌های میگو (C۶۰، C۸۰، C۱۰۰) با مدت زمان استیل‌زدایی آن‌ها رابطه مستقیمی





شکل ۷: مقایسه میانگین قدرت کیلات کنندگی یون آهن توسط کیتوزان‌های مختلف (۱/۰، ۵/۰، ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

جدول ۱: مقایسه میانگین EC_{50} برای کیتوزان‌های مختلف و کیتوزان خرچنگ (CS) در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف

EC_{50} (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)				
کیتوزان CS	کیتوزان C100	کیتوزان C80	کیتوزان C60	ویژگی آنتی‌اکسیدانی
0.0 ± 0.03	0.0 ± 0.01	0.0 ± 0.01	0.0 ± 0.02	فعالیت آنتی‌اکسیدانی
15.0 ± 0.3	13.0 ± 0.1	13.0 ± 0.2	18.0 ± 0.2	قدرت احیا کنندگی
1.0 ± 0.05	9.0 ± 0.1	11.0 ± 0.7	16.0 ± 0.4	توانایی مهار رادیکال DPPH
0.61 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	توانایی مهار رادیکال پراکسید هیدروژن
0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.1	توانایی کیلاته کنندگی یون آهن

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۵ درصد است.

کردند. یکی از روش‌های متداول جهت توصیف ساختار کیتین و کیتوزان، استفاده از آنالیز طیف‌سنج FTIR می‌باشد (Ma و همکاران، ۲۰۰۸). در طیف FTIR کیتوزان به‌دست آمده از پوسته میگوی رودخانه‌ای، جذب‌هایی در طول موج‌های $1643/84 \text{ cm}^{-1}$ ، $1561/30 \text{ cm}^{-1}$ ، $1413/72 \text{ cm}^{-1}$ و $1150/68 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده شد که در طیف کیتوزان استاندارد نیز حضور دارند. حضور پیک کوچک در محدوده $1654 - 1635 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده کشش مربوط به گروه عاملی C=O (آمید نوع I) می‌باشد که در طیف کیتوزان تهیه شده از پوسته میگو نیز مشاهده می‌شود (شکل ۲). این پیک نشان‌دهنده استیل‌زدایی کیتین به کیتوزان است (Hafsa و همکاران، ۲۰۱۶). طیف FTIR کیتوزان تهیه شده از پوسته میگو با منحنی طیف کیتوزان استاندارد مطابقت خوبی را نشان می‌دهد. پیک‌های مشخص شده در طیف FTIR کیتوزان میگو رودخانه‌ای بسیار مشابه با پیک‌های FTIR گزارش شده در مطالعات Hafsa و همکاران (۲۰۱۶) و Al-Sagheer و همکاران (۲۰۰۹) به ترتیب برای کیتوزان‌های تهیه شده از پوسته میگو *Parapenaeus Longirostris* و *Penaeus semisulcatus* می‌باشد.

بیش‌ترین مقدار EC_{50} قدرت احیا کنندگی برابر با $18/8 \pm 0/2$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در کیتوزان C60 و کم‌ترین مقدار در کیتوزان C80 ($13/0 \pm 27/02$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده گردید. کم‌ترین مقادیر مهار رادیکال‌های DPPH نیز در کیتوزان C100 برابر با $9/0 \pm 8/101$ ثبت گردید. تمام مقادیر EC_{50} به‌دست آمده برای ویژگی توانایی مهار رادیکال‌های پراکسید هیدروژن کم‌تر از $0/1$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ثبت گردیدند که نشان می‌دهد کیتوزان خرچنگ در این ویژگی آنتی‌اکسیدانی، موثرتر بود. مقادیر EC_{50} توانایی کیلاته کنندگی یون آهن نیز در طیف $0/72 - 0/56$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت.

بحث

در این پژوهش، درصد استخراج کیتوزان از پوسته میگو $17/4$ درصد بود که این مقدار با درصد استخراج کیتوزان به‌دست آمده از پوسته میگو *Parapenaeus Longirostris* توسط Hafsa و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد. Yen و همکاران (۲۰۰۸) نیز بازده کیتوزان تهیه شده از پوست خرچنگ را بین ۳۰ تا ۳۲ درصد گزارش



به دست آمد. بنابر این کیتوزان می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان خوب جهت مهار رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن به کار رود.

Samar و همکاران (۲۰۱۳) نوع روش استخراج، اندازه کیتین و نیز میزان غلظت سود مصرفی در فرآیند استیل‌زدایی آن، جهت تولید کیتوزان با فعالیت زیستی بالا را موثر گزارش نمودند، به طوری که برای کیتوزان تولید شده از ضایعات میگو با روش ماکروویو در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توان احیاکنندگی برابر با ۰/۴۹ تا ۲/۲۸ را مشاهده کردند که بیش‌ترین مقدار آن در زمانی مشاهده شد که کیتین کم‌ترین اندازه را دارا بود. Yen و همکاران (۲۰۰۸) عنوان کردند که کیتوزان‌های خرچنگ در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، توان احیایی جزئی و در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، توانایی احیا کنندگی متوسطی را نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد کیتوزان حاصل از پوسته خرچنگ و پوسته میگو در این مطالعه از توان احیایی بالایی برخوردار نیستند. اما برعکس کیتوزان‌های حاصل از پوسته میگو مورد استفاده در این مطالعه از قدرت بالایی در کیلات‌کنندگی یون آهن برخوردار بودند، به طوری که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تمام یون‌های آهن کیلاته شده بودند. نتایج مشابهی نیز توسط Yen و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۰۷) در خصوص توانایی کیلاته‌کنندگی یون‌های آهن به وسیله کیتوزان استخراج شده از پوسته خرچنگ و ساقه قارچ گزارش شد.

توانایی کیلاته‌کنندگی یون آهن توسط کیتوزان، دارای مکانیسم پیچیده‌ای است که عوامل زیادی بر آن اثرگذار هستند (Inoue و همکاران، ۱۹۹۸). به طور مثال کیلاته‌کنندگی مستلزم اتصال یون آهن با گروه‌های هیدروکسیل و آمین به ترتیب در کربن‌های دوم و ششم از مولکول کیتوزان است (Yen و همکاران، ۲۰۰۸). میزان قابلیت کیلاته‌کنندگی یون آهن توسط کیتوزان می‌تواند متأثر از درجه استیل‌دار شدن آن باشد به طوری که کیتوزان‌های به طور کامل استیل‌دار شده از قدرت کم‌تری در کیلاته‌کنندگی برخوردارند (Qin و همکاران، ۱۹۹۳؛ Younes و همکاران، ۲۰۱۶).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان‌های تهیه شده اثربخشی بیش‌تری را در کیتوزان C۱۰۰ نسبت به سایر کیتوزان‌ها نشان داد و اثر بخشی کیتوزان‌های میگو با زمان N- استیل‌زدایی آن‌ها رابطه مستقیمی داشت. برحسب توانایی مهار رادیکال‌های پراکسید هیدروژن و توانایی کیلاته‌کنندگی یون‌های آهن، همه کیتوزان‌های میگو از توانایی خوبی برخوردار بودند. افزایش زمان N- استیل‌زدایی منجر به تهیه کیتوزان با درجه استیل‌زدایی بالاتر می‌شود. بنابراین تعداد گروه‌های آمینی بیش‌تری بر روی کربن شماره ۲ در ساختار کیتوزان قرار می‌گیرد و این امر منجر به افزایش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Seedevi و همکاران، ۲۰۱۷).

Yen و همکاران (۲۰۰۷) از روش N- استیل‌زدایی قلیایی مشابه با این تحقیق برای تهیه کیتوزان‌های تهیه شده از قارچ استفاده کردند و دریافتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۸۲/۲-۶۱/۶ درصد و در ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۸۹/۹-۸۲/۳ درصد افزایش یافت. در مطالعه دیگری که بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان‌های به دست آمده از پوست خرچنگ طی زمان‌های متفاوت انجام شده است، رابطه مستقیمی بین زمان N- استیل‌زدایی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بیش‌تر مشاهده شد (Yen و همکاران، ۲۰۰۸).

با افزایش زمان N- استیل‌زدایی، می‌توان کیتوزان با درجه دی‌استیل‌سیون بالاتری به دست آورد (Kumar، ۲۰۰۰؛ Younes و همکاران، ۲۰۱۶). در این شرایط تعداد گروه‌های آمین بیش‌تری بر روی کربن دوم در ساختار کیتوزان قرار می‌گیرند. لذا اکسیداسیون اسیدلینولیک بهتر مهار می‌گردد و منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Yen و همکاران، ۲۰۰۸). توانایی مهار رادیکال‌های DPPH توسط کیتوزان‌های به دست آمده از پوست خرچنگ در زمان‌های متفاوت N- استیل‌زدایی، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بین ۲۸/۴ تا ۵۳/۵ درصد گزارش شده است (Yen و همکاران، ۲۰۰۸) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Chou و Lin (۲۰۰۴) دریافتند که مشتقات کیتوزان دی‌ساکارید N- آلکیل‌دار شده با درجات استخلاف مختلف (۷۰-۶۰ درصد) قادرند بالاترین توانایی ربایندگی رادیکال DPPH (۹۰ تا ۹۵ درصد) را در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دهند. بنابراین به نظر می‌رسد که قابلیت مهار رادیکال DPPH توسط کیتوزان می‌تواند با مقدار N- آلکیل‌دار شدن رابطه مستقیمی داشته باشد. در صورتی که سولفات‌دار کردن کیتوزان منجر به کاهش توانایی آن در مهار رادیکال DPPH می‌گردد (Xing و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات انجام گرفته تاکنون نشان دادند که کیتوزان از توانایی زیادی برای مهار رادیکال‌های پراکسید هیدروژن برخوردار است چنان‌که قدرت مهار کنندگی بالایی برای رادیکال پراکسید هیدروژن توسط کیتوزان حاصل از قارچ و پوست خرچنگ گزارش شده است (Yen و همکاران، ۲۰۰۸). Esumi و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که کیتوزان‌ها دارای فعالیت مهاری ۸۰ برابر بیش‌تر نسبت به اسیدآسکوربیک می‌باشند.

Chou و Lin (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که مشتقات کیتوزان الکیل‌دار شده در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش‌تر از ۸۰ درصد پراکسید هیدروژن را حذف می‌نمایند. در این مطالعه نیز میزان حذف رادیکال پراکسید هیدروژن توسط کیتوزان‌های به دست آمده نسبتاً بالا بود و بیش‌ترین میزان مهار رادیکال پراکسید هیدروژن (۹۱/۵ درصد) در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از کیتوزان C۱۰۰

۷. Cabib, E.; Bowers, B.; Sburlati, A. and Silverman, S.J., 1988. Fungal cell wall synthesis: The construction of a biological structure. Microbiological Science. Vol. 5, pp: 370-375.
۸. Dinis, T.C.P.; Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 315, pp: 161-169
۹. De Grave, S. and Grane, A., 2006. The establishment of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan, ۱۸۴۹) in Anzali lagoon, IRAN. Aquatic Invasions. Vol. 1, No. 4, pp: 204-208.
۱۰. Esumi, K.; Takei, N. and Yoshimura, T., 2003. Antioxidant-potentiality of gold chitosan nanocomposites. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 32, pp: 117-123.
۱۱. Guo, Z.; Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C. and Li, P., 2005. The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. Vol. 15, pp: 4600-4603.
۱۲. Govindarajan, R.; Rastogi, S.; Vijayakumar, M.; Shirwaikar, A. and Rawat, A.K.S., 2003. Studies on the Antioxidant Activities of *Desmodium gangeticum*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. Vol. 26, pp: 1424-1427.
۱۳. Hafsa, J.; Smach, M.A.; Charfeddine, B.; Limem, K.; Majdoub, H. and Rouatbi, S., 2016. Antioxidant and antimicrobial properties of chitin and chitosan extracted from *Parapenaeus Longirostris* shrimp shell waste. Annales Pharmaceutiques Françaises. Vol. 74, pp: 27-33.
۱۴. Hajji, S.; Younes, I.; Ghorbel-Bellaaja, O.; Hajji, R.; Rinaudo, M.; Nasria, M. and Jelloulia, K., 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 65, pp: 298-306.
۱۵. Inoue, K.; Baba, Y.; Yoshizuka, K.; Noguchi, H. and Yoshizaki, M., 1988. Selectivity series in the adsorption of metal ions on a resin prepared by crosslinking copper (II) complexed chitosan. Chemistry Letters. Vol. 8, pp: 1281-1284.
۱۶. Jeon, Y.J. and Kim, S.K., 2001. Potential immune stimulating effect of anti tumoral fraction of chitosan oligosaccharides. Journal of Chitin and Chitosan. Vol. 6, pp: 163-167.
۱۷. Kim, S.K.; Rajapakse, N. and Shahidi, F., 2007. Production of bioactive chitosan oligosaccharides and their potential use as nutraceuticals. In: Marine Nutraceuticals and Functional Foods. Barrow C and Shahidi F, eds. CRC Press, London and New York, GB and US. pp: 183-196.
۱۸. Kumar, M.N.V.R., 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers. Vol. 46, pp: 1-27.
۱۹. Lee, D.S.; Jeong, S.Y.; Kim, Y.M.; Lee, M.S.; Ahn, C.B. and Je, J.Y., 2009. Antibacterial activity of aminoderivatized chitosans against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Bioorganic Medicinal Chemistry. Vol. 17, pp: 7108-7112.
۲۰. Lin, H.Y. and Chou, C.C., 2004. Antioxidant activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives. Food Research International. Vol. 37, pp: 883-889.
۲۱. Lin, S.B.; Lin, Y.C. and Chen, H.H., 2009. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulose, lysozyme and chitinase: characterisation and antibacterial activity. Food Chemistry. Vol. 116, pp: 47-53.

یون‌های فلزی با وزن مولکولی متوسط می‌توانند واکنش زنجیره‌ای در پراکسیداسیون لیپیدها را آغاز نمایند لذا حضور آن‌ها منجر به اختلال در طعم و مزه در غذا می‌شود. از آنجایی که یون‌های آهن نیز یکی از مؤثرترین پیش اکسیدان‌ها در مواد غذایی به‌شمار می‌روند، قابلیت کیلات‌کنندگی این یون توسط کیتوزان می‌تواند در کاهش اثرات نامطلوب در غذاهای فرموله شده اهمیت به‌سزایی داشته باشد (Shahidi و Ambigaipalan, ۲۰۱۷; Anraku و همکاران, ۲۰۱۱).

اگرچه BHA و اسیداسکوربیک از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قدرت احیاکنندگی و قدرت مهار رادیکال‌های DPPH و نیز EDTA به‌لحاظ کیلات‌کنندگی یون‌های آهن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خوبی بوده و از افزودنی‌های غذایی محسوب می‌شوند که از آن‌ها در مقادیر میلی‌گرم در غذا استفاده می‌گردد. اما می‌توان به‌جای آن‌ها از کیتوزان‌های حاصل از پوسته میگو در مقادیر گرم در مواد غذایی بهره جست. بنابراین، کیتوزان‌های پوسته میگو می‌توانند به‌عنوان عامل حفاظتی برای کمک به انسان در کاهش آسیب‌های اکسایشی عمل نمایند.

منابع

۱. تحقیقی، م.؛ پاشایی‌راد، ش.؛ هزاوه، ن.؛ علاف‌نویریان، ح. و تحقیقی، ه.، ۱۳۹۲. مطالعه مورفولوژیکی و تاکسونومیکی میگوی رودخانه‌ای شرق (*Macrobrachium nipponense*) در رودخانه سیاه درویشان استان گیلان. فصلنامه محیط زیست جانوری. سال ۵، شماره ۳، صفحات ۱۹ تا ۱۱.
۲. کریم‌زاده، ک.؛ زحمتکش، ع. و ولی‌پور، ع.، ۱۳۹۳. بررسی تغییرات ترکیب بدن شاه‌میگوی آب‌شیرین (*Astacus leptodactylus*) در سنین و وزن‌های مختلف. مجله پژوهش‌های جانوری. دوره ۲۷، شماره ۲، صفحات ۲۷۰ تا ۲۸۱.
۳. گرگین، س. و علیمحمدی، ا.، ۱۳۸۳. نخستین گزارش از وجود میگوی *Macrobrachium nipponense* در ایران و مقایسه مورفولوژیک آن با گونه *Macrobrachium rosenbergii*. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۶۵، صفحات ۵۷ تا ۵۹.
۴. Al-Sagheer, F.A.; Al-Sughayer, M.A.; Muslim, S. and Elsabee, M.Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources Gulf. Carbohydrate Polymers. Vol. 77, pp: 410-419.
۵. Ambigaipalan, P. and Shahidi, F., 2017. Bioactive peptides from shrimp shell processing discards: antioxidant and biological activities, Journal of Functional Foods. Vol. 34, pp: 7-17.
۶. Anraku, M.; Fujii, T.; Kondo Y.; Kojima, E.; Hata, T.; Tabuchi, N.; Tsuchiya, D.; Goromaru, T.; Tsutsumi, H. and Kadowaki, D., 2011. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. Carbohydrate Polymer. Vol. 83, pp: 501- 505.



۳۸. **Zhong, Z.; Ji, X.; Xing, R.; Liu, S.; Guo, Z.; Chen, X. and Li, P., 2007.** The preparation and antioxidant activity of the sulfanilamide derivatives of chitosan and chitosan sulfates. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 15, pp: 3775-3782.
۲۲. **Lingnert, H.; Vallentin, K. and Eriksson, C.E., 1979.** Measurement of antioxidative effect in model system. *Journal of Food Processing and Preservation*. Vol. 3, pp: 87-104.
۲۳. **Ma, G.; Yang, D.; Zhou, Y.; Xiao, M.; Kennedy, J.F. and Nie, J., 2008.** Preparation and characterization of water soluble N-alkylated chitosan. *Carbohydrate Polymer*. Vol. 74, pp: 121-126.
۲۴. **Oyaizu, M., 1986.** Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. Vol. 44, pp: 307-315.
۲۵. **Park, P.J.; Je, J.Y. and Kim, S.K., 2004b.** Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymer*. Vol. 55, pp: 17-22.
۲۶. **Qin, Y., 1993.** The chelating properties of chitosan fibres. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 49, pp: 727-731.
۲۷. **Rinaudo, M., 2006.** Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*. Vol. 31, pp: 603-632.
۲۸. **Samar, M.M.; El-Kalyoubi, M.H.; Khalaf, M.M. and Abd El-Razik, M.M., 2013.** Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique *Annals of Agricultural Science*. Vol. 58, No.1, pp: 33-41.
۲۹. **Seedevi, P.; Moovendhan, M.; Vairamani, S. and Shanmugam, A., 2017.** Evaluation of antioxidant activities and chemical analysis of sulfated chitosan from *Sepia prashadi*. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 3, pp: 12-22.
۳۰. **Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K. and Nakamura, T., 1992.** Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 40, pp: 945-948.
۳۱. **Tanha, N.; Karimzadeh, K. and Zahmatkesh, A., 2017.** A Study on the Antimicrobial Activities of Chitin and Chitosan Extracted from Freshwater Prawn Shells (*Macrobrachium nipponense*). *International Journal of Health Studies*. Vol. 3, No. 3, pp: 16-19.
۳۲. **Xie, W.; Xu, P. and Liu, Q., 2001.** Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. chelating ability. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 11, No. 13, pp: 1699-1701.
۳۳. **Xing, R.; Liu, S.; Yu, H.; Guo, Z.; Li, Z. and Li, P., 2005.** Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydrate Polymer*. Vol. 61, pp: 148-154.
۳۴. **Yen, M.T.; Tseng, Y.H.; Li, R.C. and Mau, J.L., 2007.** Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stapes. *LWT- Food Science and Technology*. Vol. 40, pp: 255-261.
۳۵. **Yen, M.T.; Yang, J.H. and Mau, J.L., 2008.** Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymer*. Vol. 74, pp: 840-844.
۳۶. **Younes, I.; Hajji, S.; Frachet, V.; Rinaudo, M.; Jellouli, K. and Nasri, M., 2014.** Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan, *International Journal of Biology of Macromolecule*. Vol. 69, pp: 489-498.
۳۷. **Younes, I.; Frachet, V.; Rinaudo, M.; Jellouli, K. and Nasri, M., 2016.** Cytotoxicity of chitosans with different acetylation degrees and molecular weights on bladder carcinoma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 84, pp: 200-207.

