Archive of SID

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

- **هومن تیموری***: گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **مسعود رضائی**: گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **مهدی طبرسا**: گروه عمل‌آوری 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 یک‌سو، ورود این ضایعات به‌عنوان زباله‌های 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 قرارگرفته و منتج به تولید فراورده‌های با ارزش افزوده بالا مثل آنزیم‌ها، ژلاتین، کیتین، کیتوزان و غیره گردد. با توجه به اثرات بیولوژیک و زیست‌فعال گزارش‌شده 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 مهاری 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 آنتی اکسیدانی کل کیتوالیگوساکارید میگو وانامی استخراج اسیدی بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۴۲/۱۹ درصد را از خود نشان داد.

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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: teimouri.training@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

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 به‌منظور تولید کیتین و کیتوزان و مشتقات آن‌ها به‌منظور استخراج این مواد با ارزش، چند وقتی است که مورد توجه قرارگرفته است. در تحقیقات مختلفی در خارج و داخل کشور مورد بررسی، پژوهش و ارزیابی قرارگرفته است. در سال‌های اخیر محققین پا فراتر گذاشته و علاوه بر خواص ضدمیکروبی کیتین و کیتوزان به‌دنبال سایر خواص زیستی بی‌نظیر این مواد و مشتقات ساده‌تر آن‌ها مانند الیگوساکاریدها بوده‌اند. با توجه به اثرات بیولوژیک و سلامت‌بخشی گزارش‌شده 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 ازجمله خواص: ضدالتهابی، انعقادکننده خون، کاهندگی فشارخون، کاهندگی سطوح کلسترول در حال انجام بوده و در مورد خواص آنتی‌دیابتی، ضدسرطان و آنتی اکسیدانی نیاز به بررسی‌های بیش‌تر و عمیق‌تر می‌باشد. ارائه میگوی فرآوری شده به‌صورت آماده مصرف که قسمت سر آن حذف (Head less) و محصول کاملاً پوست‌کنی (PUD) شده است، و هم‌چنین تولید محصولاتی 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 به‌دلیل مصرف اندک خرچنگ گرد در داخل کشور تمامی خرچنگ‌های جمع‌آوری شده که اغلب به‌صورت صیدضمنی می‌باشند، بلااستفاده و در موارد بسیار زیادی به دریا بازگردانده می‌شوند. از ذخایر خرچنگ در داخل کشور به‌علت 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 درسال (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۹۳-۱۳۸۰)، که غالباً به‌صورت فیله جهت‌صادرات 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 ضدمیکروبی 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 برروی تری‌گلیسیریدهاواسیدهای صفراوی و خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها توسط Zhou و همکاران (۲۰۰۶) بیان گردید. نقش کیتوزان در پایین نگه‌داشتن سطوح چربی خون و تنظیم سطوح نرمالی از میزان کلسیم، آهن و منیزیوم در افراد با چربی خون بالا به‌اثبات 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 هگزا ان- استیل‌کیتوهگزائوز در مطالعه Suzuki و همکاران (۱۹۸۶) و بررسی مهارکنندگی رشد تومورهای سخت توسط الیگومر هگزاان-استیل کیتوهگزائوز و کیتوهگزائوز توسط Tokoro و همکاران (۱۹۸۸) اشاره نمود. تاسال 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 به‌عنوان غذا دارو به مطالعات Xia و همکاران (۲۰۰۳) بر می‌گردد، که در حقیقت با تاکید بر افزایش سطح ایمنی، کاربرد آن به‌عنوان غذا دارو مطرح گردید. از کیتوزان و ترکیبات استخراج شده از آن به‌منظور رهایش دارویی در تحقیقات برخی از محققین استفاده‌شده است که در ذیل به آن‌ها اشاره می‌گردد. پیشرفت‌های چشمگیری در انتقال دارو توسط میکرو و نانو ذرات برپایه 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 به‌منظور 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 معنی‌داری‌رانشان داد(Sinswat و همکاران، ۲۰۰۳).-Bravo

www.SID.ir

Archive of SID

Osuna و همکاران(۲۰۰۷)،در یک ارزیابی آزمایشگاهی، ظرفیت جذب کلسیم توسط نانوذرات کیتوزان و ایزومر سیانوکریستاله 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 به‌اثبات رسید (Park و همکاران، ۲۰۱۰).

مواد و روش‌ها

استخراج کیتوالیگوساکارید: به‌منظور تولید کیتوالیگوساکارید از کیتوزان‌های استخراجی از دو روش پیشنهادی Cabrera و Cutsem (۲۰۰۵) به‌روش ذیل استفاده شد: در روش آنزیمی، میزان ۱۰ گرم کیتوزان در بافر استات ۰/۱۷۵ مول حل شده و در دمای اتاق به‌مدت یک شب نگه‌داری می‌شود. این محلول کیتوزان (۹۰ میلی‌لیتر) را با ۱۰ میلی‌لیتر SPL (آنزیم پکتیناز) مخلوط نموده و به‌مدت 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 میلی‌لیتر اسیدکاریدریک ۳۷٪ به آن افزوده و سوسپانسیون موجود برای ۳۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار گرفت. سپس در حمام یخ غوطه‌ور شد. قسمت اعظم حلال و اسیدکلریدریک تحت شرایط خلا تبخیر شده و باقی‌مانده دوباره در آب حل شده و محلول تبخیر گردید. دوبار این عمل انجام شد. سپس باقی‌مانده در آب مقطر حل شد و با افزودن سود ۱۰ مولار pH به ۶/۵ رسانده شد. درنهایت 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 زیست‌فعالی بر روی نمونه‌ها انجام پذیرفت.

سنجش خواص آنتی اکسیدان

آزمون خنثی‌سازی رادیکال DPPH: به‌منظور انجام آزمون خنثی سازی رادیکال DPPH، ۵۰۰میکرولیتر از نمونه کیتوزان رادر غلظت‌های مختلف (۰/۵ تا ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و در اسیداستیک ۰/۱ درصد حل کرده و سپس با ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۹۹/۵ درصد و ۱۲۵ میکرولیتر DPPH ۰/۰۲ درصد در اتانول ۹۹/۵ درصدی به آن افزوده شد. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در محل تاریک قرار داده شد و کاهش رادیکال‌های DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Bersuder و همکاران، ۱۹۹۸).

آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی: در آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی نیز یک میلی‌لیتر از محلول کیتوزان با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فریسیانید پتاسیم یک‌درصد (w/v) مخلوط شد. مخلوط حاصله به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط واکنش سپس در ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سرانجام ۲/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدفریک ۰/۱ درصد (w/v) ترکیب گردیدو بعد از گذشت ۱۰ دقیقه جذب آن در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گرفته شد. میزان جذب بالاتر بیان‌گر میزان بالاتر قدرت کاهندگی می‌باشد (Younes و همکاران، ۲۰۱۲).

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 کمپلکس‌های سبز رنگ فسفو مولیبدن همراه بوده که در طول موج ۶۹۵ نانومتر دارای حداکثر میزان جذب می‌باشند. این کمپلکس‌ها بسیار پایدار بوده و با حلال مورد استفاده جهت استخراج ترکیبات فنولی تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. عصاره‌هائی که شدت جذب بالاتری در این طول موج دارند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند (Prieto و همکاران، ۱۹۹۹).

نتایج

استخراج کیتوالیگوساکاریدها از منابع نرم‌تن مشخص شده در پژوهش به‌دو روش آنزیمی (پکتیناز) و اسیدی (اسیدکلریدریک) انجام پذیرفت، نتایج در جدول ۱ ملاحظه می‌گردد.

جدول۱: مقایسه روش‌های 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}
اسکوئیدهندی	۱۰	۷/۰۸^{b}	۲/۹۳^{e}

نتایج آزمون خنثی‌سازی رادیکال DPPH: اساس کار این آزمون بر اندازه‌گیری کاهش رادیکال‌های 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 می‌باشد، نتایج به‌صورت جذب در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و در مقایسه با اسیدآسکوربیک در جدول ۳ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: در این روش عصاره‌هائی که شدت جذب بالاتری در طول موج ۶۹۵ نانومتر دارند، ظرفیت آنتی اکسیدانی بیش‌تری از خود نشان می‌دهند. اساس کار در این روش احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن 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.

جدول۲: نتایج آزمون خنثی‌سازی رادیکال DPPH

میلی‌گرم/میلی‌لیتر	خرچنگ گرد (آنزیم)	میگو وانامی (آنزیم)	اسکوئید هندی (آنزیم)	خرچنگ گرد (اسید)	میگو وانامی (اسید)	اسکوئید هندی (اسید)	آسکوربیک اسید (V_C)
۰/۵	۵۳/۸۸±۲/۴۲ c	۶۴/۱۵±۱/۴۶ b	۴۴/۶۶±۱/۵۹ f	۴۵/۱۴±۱/۸۹ e	۳۹/۸۰±۱/۵۱ g	۴۶/۸۴±۳/۸۸ d	۶۸/۴۹±۱/۴۳ a
۱	۵۶/۵۵±۴/۶۱ d	۶۹/۶۶±۰/۸۷ b	۵۰/۱۶±۱/۷۵ e	۴۷/۸۹±۱/۷۰ f	۴۶/۵۲±۲/۹۱ g	۶۰/۴۳±۴/۲۵ c	۷۵/۸۳±۲/۲۴ a
۲	۷۰/۰۶±۳/۱۲ d	۷۳/۰۵±۱/۸۳ b	۵۱/۶۹±۲/۱۱ g	۶۸/۷۷±۲/۱۲ e	۵۶/۳۱±۱/۹۸ f	۷۴/۵۱±۳/۳۰ c	۸۳/۴۹±۱/۰۹ a
۴	۷۳/۵۴±۰/۲۴ c	۷۴/۶۷±۱/۶۱ d	۶۳/۹۱±۴/۸۸ g	۶۸/۹۳±۰/۸۷ f	۷۱/۴۴±۳/۵۵ e	۷۸/۲۳±۳/۶۴ b	۸۷/۶۴±۰/۷۶ a

جدول۳: نتایج آزمون فعالیت احیا در برابر آهن سه ظرفیتی

میلی‌گرم/میلی‌لیتر	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

جدول۴: نتایج سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

میلی‌گرم/میلی‌لیتر	خرچنگ گرد (آنزیم)	میگو وانامی (آنزیم)	اسکوئید هندی (آنزیم)	خرچنگ گرد (اسید)	میگو وانامی (اسید)	اسکوئید هندی (اسید)
۰/۵	۱۸/۷۵±۲/۲۵ c	۲۰/۵۲±۰/۶۵ a	۱۸/۲۳±۰/۶۵ c	۲۰/۲۰±۰/۷۲ b	۱۸/۰۲±۱/۳۰ 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±۱/۶۲ c	۲۳/۲۳±۱/۱۸ b
۲	۲۹/۳۸±۱/۵۶ a	۲۵/۰۰±۱/۱۳ d	۲۷/۶۰±۰/۶۵ b	۲۷/۶۱±۱/۲۶ b	۲۵/۵۲±۰/۷۹ c	۲۹/۴۸±۲/۳۰ a
۴	۳۲/۸۱±۰/۹۴ c	۲۸/۱۳±۰/۶۳ e	۲۹/۳۸±۱/۱۳ d	۳۲/۲۹±۱/۸۳ c	۴۲/۱۹±۱/۷۴ a	۳۸/۰۲±۲/۸۲ b

بحث

در استخراج آنزیمی کیتوالیگوساکارید، نسبت به استخراج اسیدی به‌مراتب استحصالی 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 ۲و۲-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 kobiensis* 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 زیست‌فعالی الیگوساکارید حاصل از کیتوزان افزایش چشمگیری پیدا کرد. در تحقیق Yen و همکاران (۲۰۰۸) میزان خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ۲و۲-دی‌فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل توسط ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر کیتوزان استحصالی از خرچنگ گرد ۴۶/۵۲-۴/۳ درصد تعیین گردید. در تحقیق حاضر که از غلظت‌های ۰/۵ تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر کیتوالیگوساکارید خرچنگ گرد استفاده شد

www.SID.ir

Archive of SID

و درصدهای ۵۳/۸۸تا ۷۳/۵۴ برای استخراج آنزیمی کیتوالیگوساکارید و ۴۵/۱۴٪ تا ۶۸/۹۳٪ استخراج اسیدی کیتوالیگوساکارید از کیتوزان خرچنگ گرد دست‌آمد، که هم از نظر مقدار مصرف ماده واجد خاصیت آنتی‌اکسیدانی و هم درصد خنثی‌سازی نتایج بهتری را شاهد هستیم. همان‌گونه که پیش‌تر اشاره‌شد شاید استخراج آنزیمی و آسیب‌کم‌تری که به بافت کیتوالیگوساکارید وارد کرده موجب شده درصد خنثی کنندگی در استخراج آنزیمی خرچنگ گرد نسبت به استخراج آنزیمی نتایج بهتری به‌دست آید. بالا بودن توان خنثی سازی رادیکال DPPH در کیتوالیگوساکارید استحصال اسیدی از اسکوئید (۷۸/۲۳٪) شاید به‌خاطر ساختار خاص کیتین در این آبزی باشد که در تحقیق Abdelmalekوهمکاران (۲۰۱۷) اشاره گردیده است: کتین 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 کیتو الیگوساکاریدهای 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 وانامی 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 این‌است 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 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 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 این‌حال بسیاری از گروه‌های هیدروکسیل و آمینی فعال پس از قرار گرفتن در معرض کیتوالیگوساکاریدها، به‌راحتی 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 گلوتاتیون (GSH) و سوپراکسیددسموتاز (SOD) کاهش می‌دهند (Ngoو 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 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 مالون‌دی‌آلدهید (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

www.SID.ir

Archive of SID

تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند به‌واسطه‌وجود گروه سولفات، امکان‌جوانه‌زنی‌گندم‌را تحت‌آسیب‌های 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 عبدالهی 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 داشته اند 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 پلی فنلی توتیای دریایی*Echinometra mathaei* خلیج فارس. زیست فناوری 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.; Assaâd, 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 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 H 2 O 2 -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 kobiensis* (Hoyle 1885). International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 64, pp: 202-212.

۲۴. **Sinswat, P. and Tengamnuay, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir