

کاربرد فراصوت در استخراج آستازانتین از زانادات میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن

دانیال رضائی^۱، مسعود رضائی^{۱*}، سمانه پزشکی^۱

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکیده

هدف از تحقیق حاضر استخراج آستازانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) با استفاده از روش فراصوت و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن بود. استخراج با حلال آلی استون به وسیله روش خیساندن روی همزن مغناطیسی در دمای محیط به همراه فراصوت در توان‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ وات در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انجام گرفت و همچنین آزمون‌های کندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و احیا یون Fe^{3+} انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه بهره گرفته شد. بهترین بازده آستازانتین در شرایط ۲۰ دقیقه همزن مغناطیسی در دمای محیط به همراه ۴۰۰ وات فراصوت با زمان ۱۰ دقیقه با $12 \pm 0.5 \mu g/g$ و همچنین کمترین میانگین بازده را با شرایط ۱۵ دقیقه همزن مغناطیسی در دمای محیط به همراه ۴۰۰ وات فراصوت با زمان ۱۵ دقیقه با مقدار $49 \pm 0.6 \mu g/g$ مشاهده شد. نتیجه‌ی هر سه آزمون DPPH، ABTS و احیا یون Fe^{3+} نشان داد که شرایط ۲۰ دقیقه همزن مغناطیسی در دمای محیط به همراه ۴۰۰ وات فراصوت با زمان ۱۰ دقیقه بود. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از فراصوت در زمان‌های کمتر تاثیر بهتری دارد و با افزایش زمان باعث کاهش بازده و کاهش خواص آنتی اکسیدانی می‌شود.

کلید واژه‌ها: میگوی موزی، آستازانتین، فراصوت، خواص آنتی اکسیدانی

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۰

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲

*نویسنده مسول:

rezai_ma@modares.ac.ir

مقدمه

آبزی پروری سخت پوستان یکی از بزرگترین بخش‌های تولید غذاهای دریایی در سراسر جهان است که جزء مواد غذایی غنی از پروتئین محسوب می‌شود. سالانه تقاضای مصرف میگو و محصولات حاصل از آن در سراسر جهان به طور گسترده‌ای رو به افزایش می‌باشد. گزارش شده است تولید جهانی میگو در سال ۲۰۲۰ به ۵/۰۳ میلیون تن رسیده و انتظار می‌رود با نرخ رشد سالانه (CAGR) ۶/۱ درصد از سال ۲۰۲۰ تا ۲۰۲۵ به ۷/۲۸ میلیون تن برسد [1]. باقیمانده‌های حاصل از فرآوری میگو، بسته به شرایط فرآوری و گونه، شامل ۴۸ تا ۶۰ درصد وزن کل میگوی خام می‌باشد [2,3] که شامل بسیاری از مواد با ارزش مانند کیتین، پروتئین و رنگدانه‌ها است که از جمله یکی از با ارزش‌ترین رنگدانه‌ها آستازانتین می‌باشد [4]. آستازانتین یک کاروتنوئید گزانتوفیل قرمز است که عمدتاً در میکروارگانیسم‌ها و حیوانات دریایی یافت می‌شود که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است [5,6]. آستازانتین (۳، ۳' - دی هیدروکسی - بتا، بتا - کاروتن - ۴، ۴' - دی اون) به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی بالای آن در مقایسه با آستازانتین سنتتیک به طور گسترده در بسیاری از صنایع (مانند مواد غذایی، آرایشی، آبزی پروری و داروسازی) مورد استفاده قرار می‌گیرد [7]. بیان شده است که آستازانتین علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی، دارای خواص مفید متعددی از جمله ضد سرطان، ضد دیابت، ضد التهاب، ترمیم DNA و تقویت سیستم ایمنی می‌باشد، بنابراین این رنگدانه می‌تواند به طور بالقوه برای حفظ سلامت انسان‌ها در برابر بیماری‌ها، جهش‌های سلولی و محافظت در برابر نور خورشید مفید باشد [8]. گزارش شده است که فعالیت آنتی اکسیدانی آستازانتین ۱۰ برابر بیشتر از لوتئین، کانتازانتین، بتا-کاروتن و حتی ۱۰۰ برابر بهتر از آلفا توکوفرول می‌باشد [9]. آستازانتین رادیکال‌های آزاد را در زنجیره غیراشباع مزدوج (پلی ان) و انتهای حلقه (حلقه‌های C3) مهار می‌کند [10].

در حال حاضر، آستازانتین تجاری موجود عمدتاً از *Haematococcus pluvialis* استخراج می‌شود، اما کشت آن در مقیاس بزرگ دشوار است. با این حال، در شرکت‌های فرآوری غذاهای دریایی مقادیر زیادی پوسته میگو و خرچنگ تولید می‌شود که غنی از آستازانتین هستند و استخراج آستازانتین از آن‌ها مزایای اقتصادی زیادی را به همراه دارد.

میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) یکی از هشت گونه اقتصادی از خانواده *Penaeidae* است که در جنوب شرقی آسیا، هند، خلیج مکزیک، استرالیا و خلیج فارس پراکنش دارد [11]. این گونه از مهم‌ترین گونه‌های میگو در صیدگاه‌های استان هرمزگان می‌باشد که حدود ۶۰ درصد از کل صید میگو در این استان را تشکیل می‌دهد. ذخایر میگو نه تنها به خاطر ارزش غذایی و نقش به سزایی در اقتصاد کشور ایران دارد، بلکه در صنعت تکثیر و پرورش نیز از جایگاه خاصی برخوردار است و یکی از محورهای اصلی توسعه در بخش شیلات جنوب کشور را به خود اختصاص داده است. هر ساله بهره‌برداری از ذخایر میگوی موزی در صیدگاه‌های استان هرمزگان توسط تعداد زیادی از شناورهای سنتی و تا حدودی شناورهای صنعتی به منظور تأمین نیاز بازار مصرف و همچنین تأمین میگوی مولد و صادرات به خارج از کشور انجام می‌شود [12]. با توجه به در دسترس بودن این منبع ارزشمند در کشور به نظر می‌رسد استفاده با بالاترین میزان بهره‌برداری از این میگو بخصوص از رنگدانه آستازانتین حاصل از آن می‌تواند از اهداف مهم فرآوری میگو مد نظر قرار گیرد.

روش‌های مختلفی جهت استخراج آستازانتین وجود دارد: ۱- روش مکانیکی ۲- روش غیر مکانیکی. روش غیر مکانیکی شامل شوک شیمیایی (حلال‌های آلی)، اسمزی و تیمار آنزیمی است و روش‌های مکانیکی شامل استفاده از هموژنایزر فشار بالا (HPH)، آسیاب کردن و فراصوت می‌باشد [13]. استفاده از حلال‌های آلی در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از آن بین می‌توان به استون، هگزان، ایزوپروپانول، متانول، اتانول و ترکیبات آن‌ها اشاره نمود. [14]. حلال‌های قطبی برای استخراج آستازانتین مناسب‌تر هستند که این پدیده احتمالاً به این دلیل است که انتشار حلال‌های غیرقطبی از طریق لایه آبدوست که رنگدانه را احاطه کرده است دشوارتر است [15]. از طرف دیگر، استفاده از فراصوت، با ویژگی مصرف انرژی کم، جهت کاهش هزینه عملیات، فرآوری در مقیاس بزرگ و افزایش میزان استخراج مفید می‌باشد [16]. اصل استفاده از مافوق صوت به دلیل نیروهای برشی بالا ناشی از حباب‌های کاویتاسیون امواج مافوق صوت همراه با برش مکانیکی است، که استخراج مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و کاروتنوئیدها را به مقدار زیاد افزایش می‌دهد [17]. Gao و همکاران [18] در گزارشی استخراج به کمک امواج فراصوت با استفاده از میکروامولسیون‌ها برای بازیابی آستازانتین طبیعی از ضایعات میگو استفاده کردند که منجر به راندمان بالاتر بازده استخراج شد و همچنین بیان کردند میکروامولسیون مایع یونی در آب، یک جایگزین مناسب برای روش‌های مرسوم در استخراج و بازیابی آستازانتین از منابع زیستی طبیعی می‌باشد. Sharayei و همکاران [19] در تحقیقی گزارش کردند که استفاده از فراصوت می‌تواند به طور موثری به عنوان یک روش استخراج سبز برای استخراج رنگدانه آستازانتین از میگوی ببری سبز با فعالیت ضد اکسیدانی بالا مورد استفاده قرار گیرد و همچنین استخراج آستازانتین و خواص ضد اکسیدانی آن زمانی بهبود یافت که از حلال مناسب با قطبیت مناسب استفاده گردید.

در نتیجه براساس مطالعات انجام‌شده، ثابت شده‌است که استخراج به کمک فراصوت یک روش امیدوار کننده و موثر برای جداسازی و استخراج مولکول‌های زیستی در تکنیک‌های استخراج مرسوم است [20].

بنابراین هدف از تحقیق حاضر بازیابی آستازانتین از دور ریز میگوی موزی با استفاده از حلال استون به همراه فراصوت و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی مواد اولیه:

زاندا ت میگوی موزی از سواحل استان هرمزگان تهیه شد و به صورت منجمد با حفظ شرایط سرمایش در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل گردید. زاندا ت میگو موزی شامل پوسته و سر بود که در ابتدا جهت خشک شدن به مدت ۷۲ ساعت در

فریز درایر قرار داده شد و در نهایت با استفاده از یک خردکن (پاناسونیک MX-1515G2، ساخت ژاپن) به صورت پودر در آمده و در دمای فریزر تا زمان آزمایشات ذخیره شد.

استخراج رنگدانه از زائادات میگوی موزی:

زائادات میگوی موزی با استفاده از حلال استون ۹۹/۵٪ (ساخت ایران) با نسبت ۱:۱۰ (گرم بر میلی لیتر) تحت همزن مغناطیسی (FINE TECH، ساخت کره) در دمای محیط با هم ترکیب شدند^[21]. تیمار شاهد تحت ۳۰ دقیقه همزدن مداوم با همزن مغناطیسی در دمای محیط تهیه شد و بقیه تیمارها تحت فراصوت پروپ (همگامساز فراصوت UHP-400، ساخت ایران) با توان ۲۰۰ و ۴۰۰ وات با زمان های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و با هم ترکیب شدند. سپس سانتریفیوژ (یونیور سال مدل PIT320، ساخت ایران) در ۷۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انجام گردید و مایع رویی برداشته و تا بی رنگ شدن مایع رویی شستشو انجام شد. سپس حلال پرانی با روتاری (heidolph، ساخت آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با ۸۰rpm انجام گرفت.

تعیین میزان بازده با اسپکتروفتومتر:

ماده ی خشک شده در بالن با ۱۰۰ml ان-هگزان ۹۶٪ ایرانی ترکیب و عدد جذب در اسپکتروفتومتر (JENWAY6305، ساخت انگلستان) در طول موج ۴۶۸ nm خوانده شد و میزان بازده آن مطابق با فرمول شماره ۱ محاسبه گردید.

$$\frac{0.2}{\text{وزن نمونه (گرم)}} \div \text{ضریب محلول} \times \text{حجم عصاره (میلی لیتر)} \times \text{عدد جذب در طول موج ۴۶۸ nm} = \text{بازده آستانزانتین (میکروگرم بر گرم)}$$

حلال پرانی با روتاری (heidolph، ساخت آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در ۸۰rpm انجام و باقی مانده در آون خلا (یاران بهگزین پارسا YVO500-G4، ساخت ایران) برای ادامه ی حلال پرانی قرار داده شد و نمونه ها برای آزمون های آنتی اکسیدانی در محیط تاریک نگهداری گردید.

آزمون آنتی اکسیدانی DPPH:

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رادیکال های آزاد پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH)، طبق روش Brand-Willuams و همکاران^[22] صورت پذیرفت. بدین منظور دو میلی لیتر/گرم از نمونه ها به ۲ میلی لیتر از محلول متانولی ۰/۱۶ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به نسبت غلظت های مختلف آستانزانتین (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲) ترکیب و به مدت یک دقیقه تکان داده شد و همچنین اسید اسکوربیک با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر نیز به عنوان کنترل مثبت مورد سنجش قرار گرفت. سپس ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه الایزا (ELISA Reader Epock، آمریکا) خوانده شد قدرت خنثی کنندگی رادیکال های آزاد DPPH نمونه ها طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$RSA = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A= sample جذب نمونه بعد از زمان موردنظر (نمونه و محلول حاوی رادیکال های آزاد)

A= control جذب محلول حاوی رادیکال های آزاد بدون نمونه

A= blank جذب نمونه بعد از زمان موردنظر (نمونه بدون محلول حاوی رادیکال های آزاد)

آزمون آنتی اکسیدانی ABTS:

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS با روش Borazjani و همکاران^[23] مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که در ابتدا برای تهیه محلول رادیکال پایدار ABTS ابتدا یک محلول ۷ مولار آن در آب مقطر تهیه شد. در ادامه به محلول پتاسیم پر سولفات ۲/۴۵ میلی مولار اضافه شده و در مکانی تاریک به مدت ۱۶ ساعت برای تشکیل کاتیون های سبزی آبی نگهداری شد. سپس محلول نهایی تا حدی رقیق شد که مقدار جذب آن به ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد. در ادامه ۰/۵ میلی لیتر از غلظت های مختلف آستازانتین (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲) یا اسید اسکوربیک (۰/۱۰۰ میلی لیتر) به ۱/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۷ میلی مولار تهیه شده ی ABTS افزوده خواهد شد و همچنین اسید اسکوربیک با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر نیز به عنوان کنترل مثبت مورد سنجش قرار گرفت. به منظور کنترل واکنش از ترکیب ABTS و اتانول استفاده شد. محلول حاصل در میکروپلیت نگهداری شده و در انتها در ۷۳۴ توسط دستگاه الایزا (ELISA Reader Epock، آمریکا) نانومتر خوانده شد. توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS بر طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$ABTS \text{ scavenging activity (\%)} = (Ac - As) / Ac \times 100$$

که Ac جذب نمونه کنترل ۰/۵ میلی لیتر اتانول همراه با ۱/۵ میلی لیتر محلول ABTS و As به عنوان جذب نمونه می باشد.

قدرت کاهندگی یون آهن Fe^{3+} :

جهت اندازه گیری قدرت کاهندگی آهن برای نمونه ها از روش Chew و همکاران^[24] استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانات پتاسیم ۱٪ با ۱ میلی لیتر گرم از نمونه مخلوط شد. این محلول در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس به این محلول ۲/۵ میلی لیتر اسید تری کلرو استیک ۱۰٪ اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. در ادامه ۲/۵ میلی لیتر آب و ۰/۵ میلی لیتر کلرید آهن (کلرید آهن ۰/۱٪) به ۲/۵ میلی لیتر از مخلوط اضافه شد و همچنین اسید اسکوربیک با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر نیز به عنوان کنترل مثبت مورد سنجش قرار گرفت. سپس این محلول در دمای ثابتی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده تا در آن ایجاد رنگ صورت بپذیرد. بعد از این مدت جذب نمونه ها در ۷۰۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا (ELISA Reader Epock، آمریکا) خوانده شد.

تحلیل داده ها:

به منظور تجزیه تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. بررسی نرمال بودن داده ها از طریق آزمون شاپیروویک (Shapiro-Wilk) و سپس همگنی واریانس آن ها از طریق آزمون لون (Leven) بررسی گشت. جهت مقایسه آماری تیمارهای مختلف از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) در قالب آزمون دانکن جهت مقایسه چندگانه میانگین ها استفاده گردید.

نتایج

بازده ی آستازانتین:

تیمارهای مختلف با نسبت ۱:۱۰ (گرم بر میلی لیتر) پودر میگو با حلال استون در زمان های مختلف و توان های متفاوت فراصوت در دمای محیط به همراه بازده آستازانتین طبق جدول ۱ صورت پذیرفت. طبق جدول ۱ مقدار بازده برای تیمار ۶ با میانگین $79/5 \pm 0/12 \mu g/g$ از تیمار کنترل و سایر تیمارها به طور معنی داری ($p < 0/05$) بیشتر بوده و همچنین کمترین میانگین بازده را برای تیمار ۷ با مقدار $69/3 \pm 0/49 \mu g/g$ مشاهده شد و همچنین اختلاف معناداری بین تیمار ۱ و تیمار ۲ مشاهده نشده است.

جدول ۱: میانگین بازده آستازانتین طی زمان و توان‌های فراصوت متفاوت و در دمای محیط

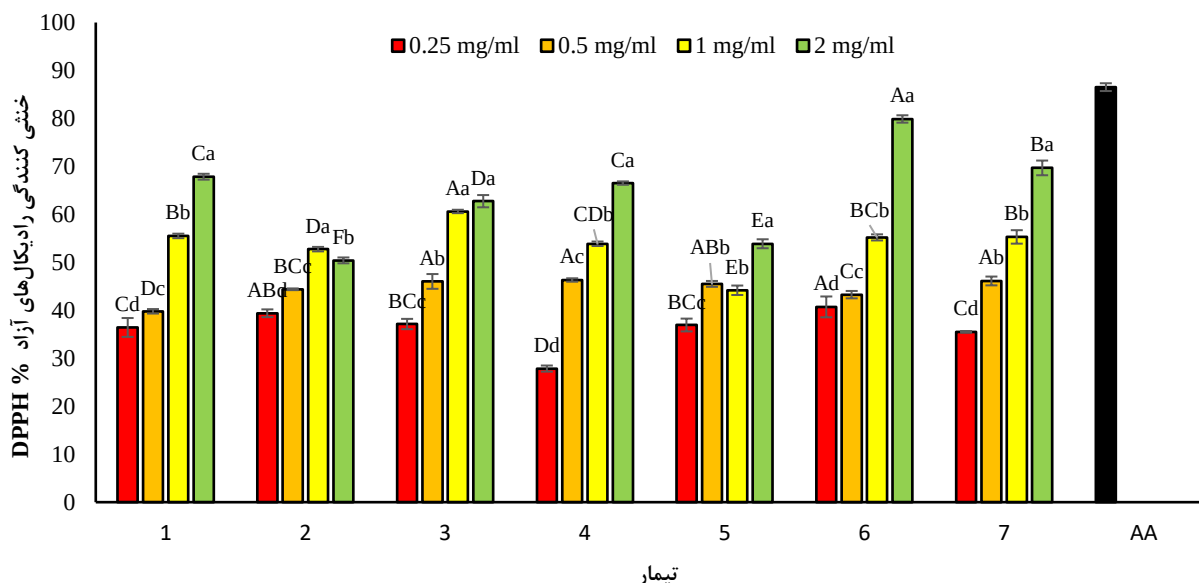
شرایط	همزن مغناطیسی	فراصوت	میانگین بازده آستازانتین (µg/g)
۱	۳۰ دقیقه	–	۷۱/۵±۰/۰۱۴ ^d
۲	۲۵ دقیقه	۵ دقیقه-۲۰۰ وات	۷۱/۵±۰/۰۲۳ ^d
۳	۲۰ دقیقه	۱۰ دقیقه-۲۰۰ وات	۷۱/۶±۰/۰۵۵ ^c
۴	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه-۲۰۰ وات	۷۲/۴±۰/۰۷۱ ^b
۵	۲۵ دقیقه	۵ دقیقه-۴۰۰ وات	۷۰/۵±۰/۰۶۳ ^e
۶	۲۰ دقیقه	۱۰ دقیقه-۴۰۰ وات	۷۹/۵±۰/۰۱۲ ^a
۷	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه-۴۰۰ وات	۶۹/۳±۰/۰۴۹ ^f

حروف کوچک نشانگر وجود اختلاف معنادار هر یک از تیمارها می‌باشد ($p < 0.05$).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH:

فعالیت مهارکنندگی DPPH آستازانتین تیمارهای مختلف در نمودار ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود قدرت مهارکنندگی تیمارها در محدوده ی (۸۰/۷۱٪-۲۷/۱۴٪) سنجش شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آستازانتین در تیمارهای مختلف افزایش معناداری ($p < 0.05$) را در درصد مهارکنندگی نشان داد. بیشترین خاصیت مهارکنندگی در تیمار ۶ در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین خاصیت مهارکنندگی در تیمار ۴ در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده گردید.

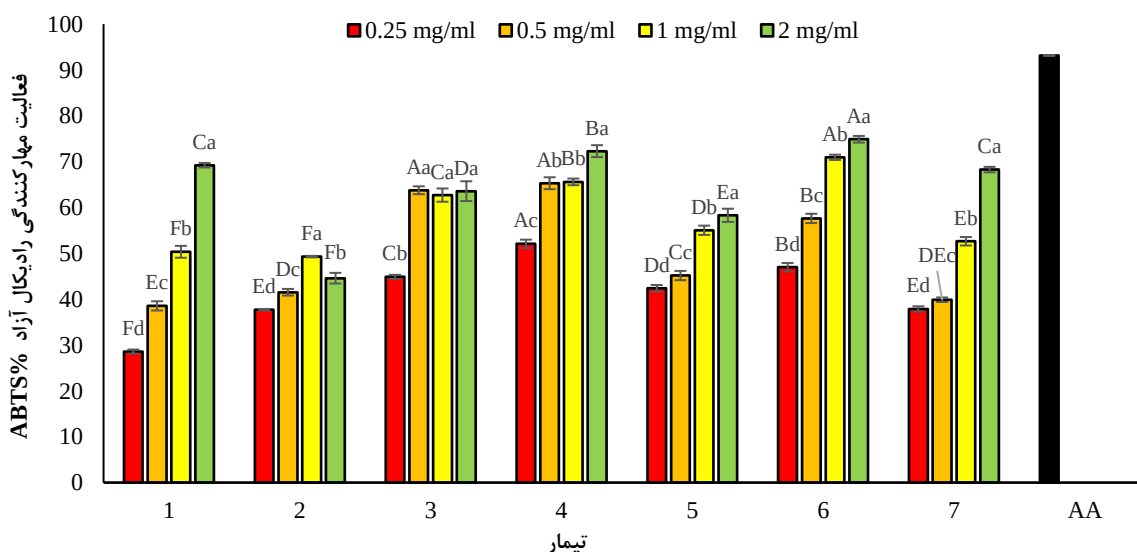
نمودار ۱: آزمون آنتی اکسیدانی DPPH (در غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) حروف بزرگ نشانگر وجود اختلاف معنادار برون گروهی



هر یک از غلظت ها در تیمارهای متفاوت ($p < 0.05$)، حروف کوچک نشانگر وجود اختلاف معنادار درون گروهی هر یک از تیمارها در غلظت های متفاوت ($p < 0.05$). اسید آسکوربیک (AA) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS:

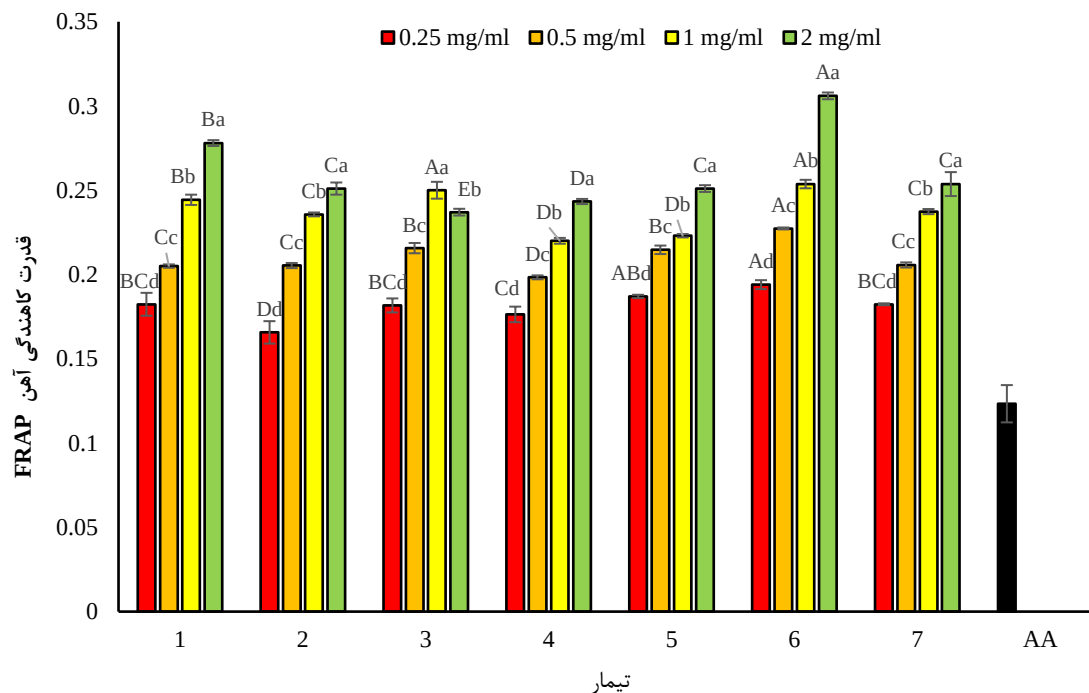
همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است قدرت مهارکنندگی ABTS در تیمارهای مختلف در محدوده (۰/۸۶-۰/۶۲٪) سنجش شد. نتایج نشان داد که علاوه بر میزان افزایش غلظت آستازانتین، قدرت و زمان فراصوت نیز تاثیر معنی داری ($p < 0/05$) را در میزان قدرت مهارکنندگی ABTS را در تیمارهای مورد آزمایش دارد به طوری که تیمار ۱ (همزن مغناطیسی ۳۰ دقیقه در دمای محیط) در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر کمترین میزان فعالیت مهارکنندگی و بیشترین فعالیت مهارکنندگی هم مربوط به تیمار ۶ (همزن مغناطیسی ۲۰ دقیقه در دمای محیط به همراه فراصوت توان ۴۰۰ در زمان ۱۰ دقیقه) در غلظت ۲ میلی گرم بر گرم می باشد.



نمودار ۲: آزمون آنتی اکسیدانی ABTS (در غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر. حروف بزرگ نشانگر وجود اختلاف معنادار برون گروهی هر یک از غلظت ها در تیمارهای متفاوت ($p < 0/05$), حروف کوچک نشانگر وجود اختلاف معنادار درون گروهی هر یک از تیمارها در غلظت های متفاوت ($p < 0/05$). اسید آسکوربیک (AA) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

قدرت کاهندگی یون آهن Fe^{3+} :

همانطور که در نمودار ۳ مشاهده می شود پتانسیل کاهندگی یون آهن Fe^{3+} در تیمارها با افزایش غلظت آستازانتین افزایش یافت. در این میان در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر آستازانتین در تیمار ۶ بیشترین خاصیت کاهندگی و در تیمار ۲ در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر کمترین خاصیت کاهندگی را نشان داد ($p < 0/05$).



نمودار ۳: آزمون آنتی اکسیدانی FRAP (در غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر میلی لیتر). حروف بزرگ نشانگر وجود اختلاف معنادار برون گروهی هر یک از غلظت ها در تیمارهای متفاوت ($p < 0/05$), حروف کوچک نشانگر وجود اختلاف معنادار درون گروهی هر یک از تیمارها در غلظت های متفاوت ($p < 0/05$). اسید آسکوربیک (AA) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

بحث

در تحقیق حاضر استخراج با حلال آلی استون به همراه فراصوت در توان و زمان های متفاوت انجام شد. در تحقیقی از Paul و Vimla [25] گزارش کرده اند که حداکثر بازده کاروتنوئیدها از زائادات میگوی پاسبید غربی (*Penaeus monodon*) با استون در مقایسه با سایر حلال های مورد استفاده برای استخراج به دست آمد. حلال های قطبی به طور کلی محیط استخراج خوبی برای گزاتوفیل ها هستند در حالی که حلال های غیر قطبی توصیه نمی شوند، زیرا نفوذ آنها از طریق جرم آبگریز که رنگدانه را احاطه کرده است محدود است [17].

با توجه به نتایج، بازده آستازانتین در تیمار ۶ (همزن مغناطیسی ۲۰ دقیقه در دمای محیط به همراه فراصوت توان ۴۰۰ در زمان ۱۰ دقیقه) دارای اختلاف معنی داری ($p < 0/05$) نسبت به سایر تیمارها بوده است. با این وجود، محتوای آستازانتین زمانی که قدرت فراصوت به سطوح بسیار بالاتر افزایش می یابد، کاهش می یابد، که در تیمار ۷ این افت مشاهده شد و همچنین با افزایش توان دستگاه فراصوت به علت شکستن راحت تر بافت ها، میزان ترکیبات استخراج شده حاصل می شود که خود عامل انتشار سریع رنگدانه ها و مواد درون بافتی به عنوان ترکیبات هدف به بیرون

می شود. در واقع در توان های بالا به علت افزایش بیش از اندازه حباب ها اثر پدید کاویتاسیون کاهش پیدا میکند و امواج فراصوت پراکنده شده و بازدهی استخراج را کاهش می دهند [26]. اصل استفاده از مافوق صوت به دلیل نیروهای برشی بالا ناشی از حباب های کاویتاسیون امواج مافوق صوت همراه با برش مکانیکی است، که استخراج مولکول های زیستی مانند پروتئین ها، لیپیدها و کاروتنوئیدها را به مقدار زیاد افزایش می دهد [19]. این اثر ممکن است به دلیل کاویتاسیون و اثر مکانیکی بهبود یافته فراصوت باشد که سطح تماس بین سطوح جامد و مایع را افزایش داده و باعث نفوذ بیشتر حلال به نمونه می شود. در توان بالا، فروپاشی حباب کاویتاسیون شدیدتر است. به گفته Zhang و همکاران [27]، از آنجایی که دما و فشار داخل حباب ها بسیار بالا بود و فروپاشی حباب ها در مدت زمان بسیار کوتاهی رخ داد، یک موج ضربه ای شدید و یک جت پرسرعت ایجاد شد که می تواند نفوذ حلال را به بافت های سلولی افزایش دهد و با ایجاد اختلال در دیواره های سلولی، منجر به افزایش بازده شود که در تیمار ۱ شاهد افت بازده به دلیل عدم استفاده از فراصوت مشاهده شد. همچنین اثر زمان فراصوت بر بازده آستازانتین مورد بررسی قرار گرفت و سایر پارامترهای استخراج ثابت بودند بازده آستازانتین از ۵ به ۱۵ دقیقه ابتدا صعودی و سپس نزولی بوده است. طور کلی، مدت زمان فراصوت می تواند بر بازده استخراج تأثیر بگذارد [28].

Holanda و Netto [29] گزارش کردند که بازیابی آستازانتین از زائادات میگو با استفاده از مخلوطی از حلال ها، کارآمدتر از استخراج روغن است. همچنین مشاهده شد که برای هر نمونه خشک (پروتئین زدایی شده یا غیر پروتئینی)، استون با استخراج تا ۹۰ درصد بهترین حلال برای استخراج کاروتنوئید است. Yolmeh و همکاران [30] نیز اعلام کردند استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی به کمک امواج فراصوت از دانه آناتو در مقایسه با روش خیساندن ۳/۶٪ موثرتر می باشد. Tsiaka و همکاران [31] بهبود راندمان استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی از میگو (*Aristeus antennatus*) با فراصوت را به صورت قرار گرفتن در معرض فراصوت: ۵ دقیقه، قدرت فراصوت: ۶۰۰ وات و نسبت مخلوط کردن ۱ به ۲۰ میلی لیتر بر گرم با حلال استون گزارش کردند که نتیجه ی آن روش فراصوت سریع تر، آسان تر و تکرارپذیرتر از روش های استخراج مرسوم بود. از سوی دیگر، Zhao و همکاران [32] اثر منفی این فرآیند را بر استخراج آستازانتین مشاهده کردند که باعث تغییر رنگ آستازانتین شد. Jaeschke و همکاران بالاترین راندمان بازیافت کاروتنوئید (۸۰ درصد) را از ریز جلبک ها (*Hetero Chlorella Luteoviridis*) با استفاده از فراصوت گزارش کردند (دامنه صوت: ۵۰ درصد و با اتانول ۷۵ درصد). همچنین آنها گزارش دادند که با افزایش شدت صوت تا ۱۰۰ درصد، راندمان استخراج حدود ۵۹ درصد کاهش می یابد. بالاترین مقدار آستازانتین از میگو موندون با بازده ۷۰/۲۶ میکروگرم بود و همچنین استفاده از استون را به عنوان حلال بهتر برای استخراج آستازانتین از زائادات پوسته میگو (۴۸/۶۴ میکرو گرم در گرم) گزارش کردند [33,34,35]. از طرفی طبق مطالعات انجام گرفته فراصوت بازده بهتر و خواص زیست فعالی بهتری در زمان کوتاه تری نسبت به روش های متفاوت استخراج داشته است به عنوان نمونه با مقایسه روش استخراج آنتی اکسیدان های طبیعی توسط امواج فراصوت با روش خیساندن و سوکسله از گل *Jatropha integerrima*، عنوان نمودند استخراج توسط امواج فراصوت به دلیل مدت زمان کمتر و دمای پایین تر کمک به حفظ آنتی اکسیدان های طبیعی نموده است [26]. Oancea و همکاران [36] نیز اعلام نمودند خاصیت آنتی اکسیدانی آنتوسیانین استخراج شده به کمک امواج فراصوت از توت سیاه و گیلاس در مقایسه به روش مرسوم (خیساندن) بیشتر می باشد.

خاصیت آنتی اکسیدانی در سه آزمون انجام گرفته که در هر سه آزمون خاصیت آنتی اکسیدانی تیمار ۶ از همه بیشتر بوده است که در واقع افزایش زمان استخراج می تواند منجر به افزایش تجزیه رنگدانه و یا تبدیل ایزومرهای سیس به فرم های ترانس و بالعکس شود [37].

نتایج حاضر نشان داد که آستازانتین از پوسته میگو به دلیل ساختار مولکولی منحصر به فرد خود دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی است که به دلیل وجود هیدروکربن هایی با پیوندهای دوگانه مزدوج به نام پلین می باشد. وجود انتهای هیدروکسیل (OH) و کتو (C=O) در هر یک از آنها حلقه یونی که در ترکیب آستازانتین وجود دارد، قابلیت اهدای هیدروژن را دارد که بر فعالیت آنتی اکسیدانی می افزاید [38]. نتایج این آزمون مشابه نتایج Chintong و همکاران [39] بود. بر اساس این اصل، اکثر نمونه ها در غلظت های آزمایش شده فعالیت های مهارکننده آشکار رادیکال های DPPH را به روشی وابسته به دز نشان دادند [39]. فعالیت های رادیکال آزاد آستازانتین با افزایش غلظت، افزایش یافت. با برخی از

گزارش‌های قبلی موافق است [40]. احتمال می‌رود نتایج متفاوت در آزمون‌های مختلف ضد اکسیدانی تحت تاثیر چندین متغیر از جمله دشوار بودن مقایسه نتایج، بسترها، شرایط واکنش و روش‌های کمی سازی قرار گیرد [41].

نتایج مشابه توسط Sowmya و Sachindra [42] گزارش شده است که آستازانتین از زائادات میگو پرورشی سفید هندی (*Penaeus indicus*) فعالیت آنتی اکسیدانی قوی نشان داده است. از طرفی Sidhu و Sherief [43] توضیح دادند که نسبت بالاتر آستازانتین دی استر و اسیدهای چرب غیر اشباع پلی (PUFAs) در عصاره کاروتنوئید به دست آمده از پوسته *Aristeus alcocki* مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر است. بنابراین، خاصیت آنتی اکسیدانی قوی عصاره کاروتنوئیدی را می‌توان به هم افزایی آنتی اکسیدانی آستازانتین و PUFA های موجود در تیمار نسبت داد.

با توجه به نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر فراصوت به طور کلی باعث افزایش بازده استخراج و خواص آنتی اکسیدانی آن شد با این حال، با افزایش زمان به ۱۵ دقیقه افت خواص آنتی اکسیدانی و بازده آستازانتین مشاهده شد که ممکن است استفاده از مدت زمان طولانی تر منجر به افزایش ناخالصی‌های استخراج شود که احتمالاً به دلیل شکل‌گیری بیش از حد حباب‌ها که مانع انتشار امواج فراصوت می‌شود [37,38] یا به دلیل گرمای تولید شده توسط قدرت مافوق صوت ممکن است به طور کامل از بین نرود که در مدت زمان کوتاهی منجر به کاهش کاروتنوئیدها می‌شود و نتیجتاً کاهش خواص آنتی اکسیدانی را منجر می‌شود [26].

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که آستازانتین موجود در میگوی موزی (*F. merguensis*) فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS و کاهندگی یون آهن قابل قبولی دارا می‌باشد. استخراج با کمک حلال آلی استون و فرآیند کمکی فراصوت باعث استخراج بهتر در بازه ی مشخصی شده و به همراه آن خواص آنتی اکسیدانی را افزایش داده است و همچنین با افزایش توان فراصوت نتیجه ی معکوس حاصل گردیده است. نتایج نشان داد که فراصوت توان ۴۰۰ در زمان ۱۰ دقیقه بهترین تیمار برای عملکرد آنتی اکسیدانی می‌باشد. به طور کلی با نتایج بدست آمده می‌توان به استفاده از فراصوت در استخراج صنعتی آستازانتین با بازده بیشتر و خواص آنتی اکسیدانی بهتری امیدوار بود.

منابع

1. IMARC. (2020). Shrimp market: global industry trends, share, size, growth, opportunity and 990 forecasts.
2. Amiguet, E., Moortèle, B.V.D., Cordier, P., Hilaire, N., and Reynard, B. (2012). Deformation mechanisms and rheology of serpentines in experiments and in nature. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 119, pp.4640–4655.
3. Kaur, S. and Dhillon, G.S. (2013). Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes; a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), pp. 44-61.
4. Cheong, J.Y., Muskhazli, M., Nor Azwady, A.B., Ahmad, S.A. and Adli, A.A. (2020). Three-dimensional optimisation for the enhancement of astaxanthin recovery from shrimp shell wastes by *Aeromonas hydrophila*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, pp.101649.
5. Galasso, C., Corinaldesi, C., and Sansone, C. (2017). Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Biological Functions and Industrial Applications. Antioxidants*, 6(4), 96.
6. Ambati, R.R., Moi, P.S., Ravi, S. and Aswathanarayana, R.G. (2014). Review Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. *Marine Drugs*, 12(1), pp.128–152.
7. Kuan, A.T., Phelps, J.S., Thomas, L.A., Nguyen, T.M., Han, J., Chen, C.L., Azevedo, A.W., Tuthill, J.C., Funke, J., Cloetens, P., Pacureanu, A., and Lee, W.C.A. (2020). Dense neuronal reconstruction through X-ray holographic nano-tomography. *Nature Neuroscience*, 23, pp.1637-1643.

8. Davinelli, S., Nielsen, M.E., Scapagnini, G. (2018). Astaxanthin in skin health, repair and disease: a comprehensive review. *Nutrients*, 10, pp.522–534.
9. Brotosudarmo, T.H.P., Limantara, L., Setiyono, E. and Heriyanto, L. (2020). Structures of astaxanthin and their consequences for therapeutic application: review article. *International Journal of Food Science*, 23(6), pp.1-16.
10. Kishimoto, K., Kouzai, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., and Nishizawa, Y. (2010). Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus. *Magnaporthe oryzae in rice*, 64(2), pp. 343–354.
11. Leung, P. and Engle, C. (2006). *Shrimp culture economics, market, and trade*. Blackwell Publishing, Oxford.
12. Sourinejad, L., Kalbassi, M.R., and Martinez, P. (2014). Mixed milt fertilization of endangered Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* influences effective population size of breeder. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(2), pp. 393-408.
13. Lee, S.Y., Show, P.L., Ling, T.C. and Chang, J.S. (2018). Single-step disruption and protein recovery from *Chlorella vulgaris* using ultrasonication and ionic liquid buffer aqueous solutions as extractive solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 124, pp.26-35.
14. Saini, R.K., and Keum, Y.S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, pp.90–103.
15. Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40 (3), pp.173–289.
16. Wang, M., Yuan, W., Jiang, X., Jing, Y. and Wang, Z. (2014). Disruption of microalgal cells using high frequency focused ultrasound. *Bioresource Technology*, 153, pp.315-321.
17. Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., FabianoTixier, A.S. and Vian, M.A. (2017). Review Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrason Sonochem*, 34, pp.540-560.
18. Gao, J., You, J., Kang, J., Nie, F., Ji, H. and Liu, S. (2020). Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic assisted extraction using ionic liquid in water microemulsion. *Food Chemistry*, 325, pp.126850.
19. Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S. and Ramaswamy, H.S. (2020). Optimization of ultrasonic assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, pp.105666.
20. Jiang, H.L., Yang, J.L., and Shi, Y.P. (2016). Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, pp.325-331.
21. Sachindra, N.M., Bhaskar, N. and Mahendrakar, N.S. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Manage*, 26, pp.1092–1098.
22. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), pp.25-30.
23. Borazjani, N.J., Tabarsa, M., You, S. and Rezaei, M. (2017). Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. *International journal of biological macromolecules*, 101, pp.703-71.
24. Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and Khoo, K.S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), pp.1067-1072.
25. Vimala, S., and Paul, V.I. (2009). Utilization of crustacean fishery waste as a source of carotenoids. *J. Exp. Zool. Ind*, 12(2), pp.377-380.
26. Xu, Y., and Pan, S. (2013). Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.), *Ultrason. Sonochem*, 20 (4), pp.1026–1032.
27. Zhang H, Tang B, Row KH. (2014). A green deep eutectic solventbased ultrasound-assisted method to extract astaxanthin from shrimp byproduct. *Analytical Letters* 47: 742–749.

28. Liu, X., Osawa, T. (2007). Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 357, pp.187–193.
29. Holanda, H.D.D., Netto, F.M. (2006). Recovery of components from shrimp (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.*, 71(5), pp.298-303.
30. Yolmeh, M., Najafi, M.B.H. and Farhoosh, R., (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food chemistry*, 155, pp.319-324.
31. Tsiaka, T., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V., Makris, C., Heropoulos, G., and Calokerinos, A. (2015). Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp, *Anal. Chim.*, 877, pp.100–110.
32. Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., and Hu, X. (2006). Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin, *J. Agric. Food Chem.*, 54(21), pp.8346–8351.
33. Jaeschke, D.P., Rech, R., Marczak, L.D.F., and Mercali, G.D. (2017). Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*, *Bioresour. Technol.*, 224, pp.753–757.
34. Solva, A.K.N., Rddrogues, B.D., Solva, L.H.M., Rddrogues, A.M.C. (2018). Drying and extraction of astaxanthin from pink shrimp waste (*Farfantepenaeus subtilis*): the applicability of spouted beds. *Food Sci Technol*, 38, pp.454-461.
35. Dalei, J., and Sahoo, D. (2015). Extraction and Characterization of Astaxanthin from the Crustacean Shell Waste from Shrimp Processing Industries. *Int J Pharm Sci Res* 2015; 6(6), pp.2532-2537.
36. Oancea, S., Grosu, C., Ketney, O., and Stoia, M. (2013). Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chimica Slovenica*, 60(2), pp.383-389.
37. Entezari, M.H., and Kruus, P. (1996). Effect of frequency on sonochemical reactions II. Temperature and intensity effects, *Ultrason. Sonochem.*, 3, pp.19–24.
38. Lou, Z., Wang, H., Zhang, M., and Wang, Z. (2010). Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system, *J. Food Eng.*, 98, pp.13–18.
39. Chintong, Sutasinee; Phatvej, Wipaporn; Rerk-Am, Ubon; Waiprib, Yaowapha; Klaypradit, Wanwimol (2019). In Vitro Antioxidant, Antityrosinase, and Cytotoxic Activities of Astaxanthin from Shrimp Waste. *Antioxidants*, 8(5), pp.128.
40. Yuan, C., Du, L., Jin, Z., and Xu, X. (2013). Storage stability and antioxidant activity of complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrate polymers*, 91(1), pp.385-389.
41. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), pp.1841-1856.
42. Saini, R.K., and Keum, Y.S. (2017). Carotenoid extraction methods: a review of recent developments, *Food Chem.*, 200, pp.81–86.
43. Sowmya, R., and Sachindra, N.M. (2012). Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing by products by in vitro assays and in membrane model system. *Food Chem.*, 134, pp.308–314.
44. Sindhu, S., Sherief, P. (2011). In Extraction, characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of carotenoids from the shell waste of arabian red shrimp *Aristeus alcocki*, ramadan 1938. *Open Conf. Proc. J.*, 2, pp.95–103.

Application of ultrasound in extracting astaxanthin from banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) and investigating its antioxidant properties

Danial Rezaei; Masoud Rezaei*; Samaneh Pezeshk

Seafood Processing Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

ABSTRACT

The aim of this study was to extract astaxanthin from banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) using ultrasound assisted method and to investigate its antioxidant properties. Extraction with organic acetone solvent was performed by soaking on a magnetic stirrer at room temperature for 5, 10, and 15 minutes, as well as neutralization tests of DPPH and ABTS free radicals. Fe^{3+} ion reduction was carried out. One-way analysis of variance was used for statistical analysis of the data. The best astaxanthin yield was 79.5 ± 0.012 $\mu\text{g/g}$ in the conditions of 20 minutes of magnetic stirrer at ambient temperature with 400 watts of ultrasound for 10 minutes, and the lowest average yield was observed in the condition of 15 minutes of magnetic stirrer at ambient temperature with 400 watts of ultrasound with a time of 15 minutes with a value of 69.3 ± 0.049 $\mu\text{g/g}$. The findings of all three ABTS, DPPH, and Fe^{3+} ion reduction tests revealed that the settings were 20 minutes of magnetic stirrer at ambient temperature followed by 10 minutes of 400 watts of ultrasound. In summary, the results of this study demonstrated that using ultrasound for a shorter period of time has a better effect, while increasing the time diminishes the yield and antioxidant qualities.

KEYWORDS: Banana shrimp, Astaxanthin, Ultrasound, Antioxidant properties

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 3 Oct. 2022

Accepted: 22 Nov. 2022

ePublished: 3 Mar. 2023

* Corresponding Author:

Email address: rezai_ma@modares.ac.ir

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513