

## اثر هیدرولیز آنزیمی و فراصوت بر فعالیت زیستی آستاگزانتین استخراج شده از زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*)

سجاد برزگرزاده<sup>۱</sup>، سمانه پزشکی<sup>۱\*</sup>، حبیب‌اله یونسی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست شناسی دریا-گرایش زیست فناوری دریا، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲. گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

### چکیده

زایدات حاصل از فرآوری میگو منبعی ارزشمند از ترکیبات زیست فعال به ویژه کاروتنوئیدها از جمله آستاگزانتین محسوب می‌شوند. هدف این پژوهش بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی و فراصوت بر استخراج آستاگزانتین و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های حاصل از زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) بود. استخراج آستاگزانتین با استفاده از روش‌های مختلف شامل استخراج با حلال، هیدرولیز آنزیمی در غلظت‌های مختلف آنزیم (۱/۵ و ۱۰/۵ درصد) و ترکیب هیدرولیز آنزیمی با فراصوت در توان ۱۰۰ وات انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از آزمون‌های مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و آزمون توان احیاکنندگی آهن ارزیابی گردید و برای بررسی گروه‌های عاملی موجود از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FTIR) استفاده شد. نتایج نشان داد استخراج با حلال بیشترین بازده آستاگزانتین ( $0.06 \pm 64/82$  میکروگرم/میلی لیتر) را فراهم کرد، در حالی که تیمارهای آنزیمی و تیمارهای آنزیمی همراه با فراصوت فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نشان دادند. در آزمون DPPH، تیمار آنزیمی ۱/۵ درصد همراه با فراصوت ۱۵ دقیقه کمترین مقدار  $IC_{50}$  ( $0.01 \pm 5/89$  میکروگرم/میلی لیتر) را نشان داد که به طور معنی‌داری بیانگر قدرت مهار رادیکالی بالاتر بود. همچنین در آزمون ABTS و آزمون توان احیاکنندگی آهن، تیمارهای آنزیمی-فراصوتی نسبت به سایر تیمارها عملکرد بهتری داشتند. نتایج FTIR نیز حضور گروه‌های عاملی مرتبط با ساختار کاروتنوئیدها را تأیید کرد. به طور کلی، ترکیب هیدرولیز آنزیمی و فراصوت می‌تواند رویکردی مؤثر برای آزادسازی آستاگزانتین و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های حاصل از زایدات میگو باشد.

**کلید واژه‌ها:** آستاگزانتین؛ زایدات میگو؛ هیدرولیز آنزیمی؛ فراصوت؛ فعالیت آنتی اکسیدانی

### مقدمه

در بسیاری از اختلالات زیستی، نقش تخریبی واکنش‌های اکسیداسیونی به عنوان یک عامل مهم شناخته می‌شود. در شرایطی که تعادل بین سیستم‌های تولیدکننده گونه‌های واکنش‌پذیر و سامانه‌های دفاعی آنتی اکسیدانی به نفع گونه‌های واکنش‌پذیر برهم بخورد، استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد. این وضعیت می‌تواند به آسیب ماکرومولکول‌ها از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA منجر شود و در نهایت کارکرد طبیعی سلول را تحت تأثیر قرار دهد (Engel et al., 2022). به همین دلیل، توسعه و ارزیابی ترکیبات طبیعی با ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش اثرات اکسیداسیونی به عنوان یک راهبرد پژوهشی و کاربردی مورد توجه قرار گرفته است.

کاروتنوئیدها به عنوان گروهی از رنگدانه‌های طبیعی، به علت ساختار شیمیایی ویژه خود توانایی مقابله با اثرات اکسیداسیونی را نشان می‌دهند. این ترکیبات می‌توانند با جذب انرژی و حذف گونه‌های فعال، از سیستم‌های زیستی در برابر آسیب‌های ناشی از اکسیداسیون محافظت کنند. در میان کاروتنوئیدها، آستاگزانتین به عنوان یک ترکیب زیست فعال برجسته مطرح است؛ زیرا به طور مؤثر در فرآیندهای مرتبط با خنثی‌سازی رادیکال‌ها و مقابله با اکسیداسیون نقش ایفا می‌کند (Nishida et al., 2023). همچنین گزارش شده است که آستاگزانتین نسبت به برخی کاروتنوئیدهای دیگر قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری دارد و به همین علت توجه گسترده‌ای به آن در حوزه‌های غذایی، دارویی و فرآوری زیستی شده است (Ambati et al., 2014). آستاگزانتین به دلیل ساختار دارای پیوندهای دوگانه مزدوج و وجود گروه‌های کتو و هیدروکسیل، توانایی بالایی در

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۰

بازنگری: ۱۴۰۵/۰۴/۰۵

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۱۳

چاپ الکترونیکی:

۱۴۰۵/۰۵/۳۰

\*نویسنده مسئول:

s.pezeshek@modares.ac.ir

مهار رادیکال‌ها و جلوگیری از اکسیداسیون دارد. با توجه به تقاضای رو به افزایش برای آستاگزانتین طبیعی، منابع دریایی به‌ویژه پسماندهای صنعت آبی‌پروری و فرآوری میگو به‌عنوان گزینه‌ای ارزشمند مطرح شده‌اند.

زایدات میگو که عمدتاً شامل پوسته و سر هستند، غنی از آستاگزانتین متصل به پروتئین‌ها و ساختارهای کروتاسین می‌باشند و بازیافت آن‌ها علاوه بر کاهش بار زیست‌محیطی، منبعی مقرون‌به‌صرفه برای تولید ترکیبات زیست‌فعال به شمار می‌رود (Naguib, 2000). در ایران، گونه میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های تجاری جنوب کشور است که در سواحل خلیج فارس، به‌ویژه در استان‌های بوشهر و هرمزگان، صید قابل توجهی دارد. بر اساس آمار فائو، میزان صید طبیعی میگو در ایران در سال ۲۰۲۲ به ۸۵۷۰ تن رسید که نشان‌دهنده اهمیت تداوم بهره‌برداری از منابع میگو در کشور است (FAO, 2022). همچنین، در فرایند فرآوری نیز حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد وزن میگو به زایدات، عمدتاً شامل سر و پوسته، تبدیل می‌شود (Ravanipour et al., 2021). بنابراین، فعالیت گسترده صنایع فرآوری این گونه، مقدار قابل توجهی زایدات زیستی تولید می‌کند که می‌تواند به‌عنوان یک منبع بومی و ارزشمند برای استخراج آستاگزانتین مورد استفاده قرار گیرد. این موضوع، علاوه بر مزیت اقتصادی، با رویکرد پایداری و مدیریت بهینه پسماندهای دریایی نیز همسو است.

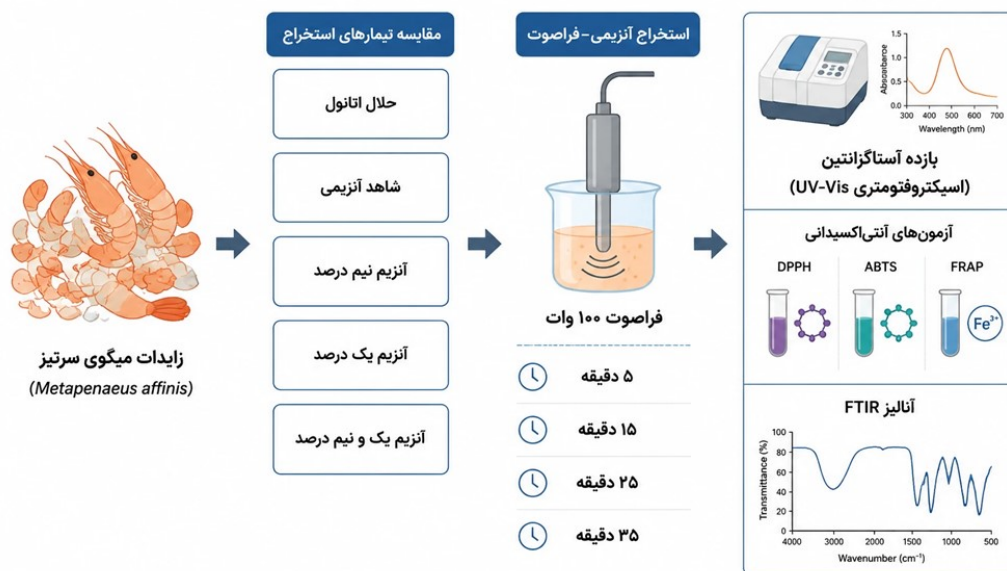
روش‌های مختلفی برای استخراج آستاگزانتین از زایدات میگو گزارش شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به استخراج با حلال‌های آلی و هیدرولیز آنزیمی اشاره کرد. در میان حلال‌ها، ترکیباتی مانند استون، هگزان و به‌ویژه اتانول به دلیل کارایی مناسب در استخراج کاروتنوئیدها و سمیت کمتر، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ هرچند این روش‌ها ممکن است با محدودیت‌هایی مانند باقی‌ماندن حلال و ملاحظات زیست‌محیطی همراه باشند. از سوی دیگر، هیدرولیز آنزیمی رویکردی کارآمد به شمار می‌آید؛ زیرا آنزیم‌ها با تجزیه ماتریکس پروتئینی و شکستن پیوندهای میان آستاگزانتین و پروتئین‌های حامل، آزادسازی ترکیب را تسهیل می‌کنند. در این راستا، Zahid و همکاران (2026) نشان دادند که پیش‌تیمار آنزیمی پوسته میگو پیش از استخراج، با تخریب ماتریکس زیستی، بازیابی آستاگزانتین را بهبود می‌بخشد. مزیت مهم این روش، انجام واکنش‌ها در شرایط ملایم و افزایش میزان دسترسی زیستی آستاگزانتین است. با این حال، سرعت فرآیند و راندمان استخراج ممکن است محدود بماند. از نظر اقتصادی، استخراج با حلال به دلیل سادگی فرایند و هزینه اولیه کمتر، متداول‌تر است؛ اما هزینه‌های مربوط به مصرف و بازیابی حلال، ایمنی و ملاحظات زیست‌محیطی از محدودیت‌های آن به شمار می‌رود. برای رفع این محدودیت‌ها، استخراج با کمک امواج فراصوت به‌عنوان یک روش نوین معرفی شده است. این روش با ایجاد کاویتاسیون تخریب ساختارهای سلولی و افزایش انتقال جرم را ممکن می‌سازد و می‌تواند بازده استخراج را به طور قابل توجهی افزایش دهد (Chi Hai et al., 2025). همچنین، Sharayei و همکاران (2022) در بهینه‌سازی استخراج فراصوتی آستاگزانتین از پوسته میگوی سبز (*Penaeus semisulcatus*) گزارش کردند که این روش موجب افزایش بازده استخراج و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره شد. Rezaei و همکاران (2022) نیز در مطالعه روی میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) نشان دادند که تیمار فراصوت کوتاه‌مدت، در مقایسه با زمان‌های طولانی‌تر، بازده آستاگزانتین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری ایجاد می‌کند. ترکیب فراصوت با هیدرولیز آنزیمی نیز یک رویکرد دوگانه محسوب می‌شود که در آن آزادسازی اولیه آستاگزانتین توسط آنزیم و تسریع فرایند توسط اولتراسوند، می‌تواند کارایی استخراج را بهبود بخشد و از تخریب حرارتی ترکیب نیز جلوگیری کند.

با وجود انجام پژوهش‌های متعدد درباره استخراج آستاگزانتین از منابع مختلف، اطلاعات سیستماتیک درباره بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبی آنزیمی-فراصوت از زایدات میگوی سرتیز بومی (*Metapenaeus affinis*) و ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل همچنان محدود است. از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی کارایی رویکرد استخراج ترکیبی آنزیمی-فراصوت در استحصال آستاگزانتین از زایدات میگوی سرتیز و ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل انجام شد. همچنین تلاش شد با مقایسه تیمارهای مختلف، شرایط مناسب برای افزایش بازده استخراج و بهبود ویژگی‌های زیست‌فعال عصاره تعیین شود.

## مواد و روش‌ها

## آماده سازی مواد اولیه

زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) از شرکت فرآوری میگو در استان بوشهر تهیه و در محفظه‌های ایزوله و زنجیره سرد به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. به منظور جلوگیری از تخریب اکسیداتیو نوری ترکیبات کاروتنوئیدی، کلیه مراحل آماده‌سازی نمونه در شرایط تاریک انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت تحت فرایند فریزدرای قرار گرفتند تا رطوبت به‌طور کامل حذف شود. پس از آن، زایدات خشک‌شده با استفاده از خردکن آزمایشگاهی (پاناسونیک MX-1515G2، ساخت ژاپن) آسیاب و پودر حاصل از الک با اندازه مش ۱۰۰ میکرومتر عبور داده شد. پودر یکنواخت به‌دست‌آمده در کیسه‌های زیپ‌کیپ نگهداری و برای جلوگیری از اکسیداسیون، گاز نیتروژن به داخل کیسه‌ها تزریق شد. سپس کیسه‌ها در پوشش پلاستیکی مشکی قرار داده شده و تا زمان انجام آزمایش‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شماتیک کلی طراحی آزمایش و مراحل پژوهش در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱- نمای شماتیک طراحی آزمایشی و مراحل استخراج آستاگزانتین از زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) به روش ترکیبی آنزیمی-فراصوت.

Figure 1- Schematic representation of the experimental design and the steps of astaxanthin extraction from banana shrimp (*Metapenaeus affinis*) by-products using a combined enzymatic-ultrasound method.

## فرایندهای استخراج با حلال آلی، آنزیمی و فراصوت

برای استخراج کاروتنوئیدها، حدود ۵ گرم از پودر خشک‌شده زایدات برای هر تیمار آماده گردید، که در این تیمار، پودر نمونه بدون هیچ‌گونه پیش‌فرایند، با اتانول مطلق (۱۰۰ درصد) (Merck، ساخت آلمان) و در نسبت ۱:۱۰ (وزن/حجم) مخلوط شد. عصاره‌گیری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و تحت هم‌زدن مغناطیسی انجام گرفت. به منظور دستیابی به حداکثر بازده، به منظور دستیابی به حداکثر بازده، این فرایند ۳ بار تکرار شد و عصاره‌های حاصل پس از هر مرحله با یکدیگر ترکیب شدند.

در بخش تیمار آنزیمی، پودر خشک‌شده با نسبت ۱ به ۶ در بافر تریس با pH برابر ۷ پراکنده گردید. آنزیم پروتاماز (Protamax)، (Sigma-Aldrich، ساخت آمریکا) با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد وزنی به مخلوط افزوده شد. مرحله هیدرولیز آنزیمی در دمای کنترل‌شده ۴۰ درجه

سانتی گراد و به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. پس از پایان هیدرولیز، به منظور توقف فعالیت آنزیم و جلوگیری از تخریب حرارتی رنگدانه، اتانول به عنوان عامل غیرفعال کننده به مخلوط واکنش افزوده شد. تیمار شاهد آنزیمی نیز با رعایت تمام شرایط فوق و بدون افزودن آنزیم تهیه گردید (Zahid et al., 2026).

برای تیمار آنزیمی-فراصوت، ابتدا نمونه‌ها در بافر تریس (pH برابر با ۷) پراکنده شدند. تیمار فراصوت با استفاده از پروب دستگاه اولتراسوند (همگام‌ساز فراصوت UHP-400، ساخت ایران) با توان خروجی ۱۰۰ وات و در دمای ثابت ۱۰ درجه سانتی‌گراد اعمال گردید. امواج فراصوت به صورت پالسی (۲ ثانیه روشن - ۳ ثانیه خاموش) و برای زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه اعمال شدند. بر اساس نتایج پیش‌آزمایش‌ها، غلظت بهینه آنزیم پروتئاز که منجر به بیشترین بازده آستاگزانتین گردید انتخاب و پس از پایان تیمار فراصوت، به نمونه افزوده شد. مراحل هیدرولیز و استخراج پس از افزودن آنزیم مطابق روش تیمار آنزیمی انجام گرفت. در تمامی تیمارها، پس از پایان عصاره‌گیری، نمونه‌ها سانتریفیوژ (یونیور سال مدل PIT320، ساخت ایران) و سوپرناتانت جمع‌آوری شد. مراحل شستشو تا شفاف شدن نسبی سوپرناتانت ادامه یافت. سپس حلال توسط دستگاه روتاری (Heidolph، ساخت آلمان) در شرایط خلأ تبخیر و عصاره کاروتنوئیدی تغلیظ گردید. عصاره نهایی در ظروف شیشه‌ای تیره ریخته شده و تا زمان انجام آنالیزها در دمای یخچال نگهداری شد تا از تخریب نوری و حرارتی ترکیب جلوگیری شود (Sharayei et al., 2021).

### اندازه‌گیری آستاگزانتین

جهت تعیین کمی آستاگزانتین، ابتدا طیف جذب عصاره‌های حاصل توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis (مدل ۶۳۰۵، ساخت JENWAY انگلستان) در بازه طول موجی ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر، با فواصل اندازه‌گیری ۲ نانومتر، ثبت گردید. طول موج حداکثر جذب برای آستاگزانتین در این مطالعه، ۴۷۰ نانومتر تعیین شد. جذب نوری در این طول موج برای تمامی نمونه‌ها، در شرایط تاریک و با استفاده از کووت‌های مناسب اندازه‌گیری شد تا از تخریب نوری احتمالی جلوگیری به عمل آید. برای تعیین مقدار آستاگزانتین استخراج شده، عصاره غلیظ شده آستاگزانتین با حلال استاندارد (اتانول مطلق) مخلوط شد تا حجم نهایی مشخصی به دست آید. میزان جذب نور عصاره در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار آستاگزانتین (بر حسب میکروگرم در هر گرم از ماده اولیه) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (De Aguiar Saldanha, Pinheiro et al., 2023):

$$\text{ضرب محلول} \times \text{حجم عصاره (میلی لیتر)} \times \text{عدد جذبی در طول موج 470 نانومتر} = \frac{\text{بازده (میکروگرم بر گرم)}}{0/2 \times \text{وزن نمونه (گرم)}}$$

### ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شناسایی ساختاری عصاره‌ها (FTIR)

برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده، آزمون‌های رادیکال آزاد DPPH، ABTS و ارزیابی توان احیاکنندگی آهن انجام شد. در آزمون DPPH، کاهش جذب محلول DPPH در حضور عصاره‌های مختلف به عنوان شاخص فعالیت آنتی‌اکسیدانی تفسیر شد و نتایج به صورت درصد مهار رادیکال در طول موج ۵۱۹ نانومتر گزارش گردید (Foti et al., 2011). همچنین، با رسم منحنی درصد مهار در برابر غلظت عصاره، غلظت مهار ۵۰ درصد (IC50) برای هر نمونه محاسبه شد. جهت اطمینان از دقت نتایج، آزمون با استفاده از اسکوریک اسید به عنوان کنترل مثبت و در حضور کنترل حلال انجام شد و داده‌ها پس از ۳ بار تکرار تجزیه و تحلیل گردیدند.

به منظور، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده با استفاده از آزمون ABTS، ابتدا رادیکال کاتیونی  $ABTS^{\bullet+}$  با نسبت ۱:۱ از واکنش محلول ABTS با پرسولفات پتاسیم (Merck، ساخت آلمان) تهیه و در شرایط تاریک و دمای اتاق نگهداری شد تا تشکیل کامل رادیکال پایدار حاصل گردد. پس از آن، محلول  $ABTS^{\bullet+}$  با رقت‌های مناسب تنظیم شد به طوری که جذب نوری آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر در محدوده

۰/۰±۷/۰۲ قرار گیرد. آزمون آنتی اکسیدانی با افزودن غلظت‌های مختلف عصاره به محلول رادیکال و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق انجام شد. سپس، کاهش جذب نوری در ۷۳۴ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis اندازه‌گیری گردید. کاهش جذب نوری به عنوان شاخص ظرفیت مهار رادیکال آزاد و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها گزارش شد (Borazjani et al., 2017). در این آزمون نیز از اسکوریک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و نتایج پس از ۳ بار تکرار تجزیه و تحلیل گردیدند.

فعالیت احیاکنندگی (توان احیاءکنندگی) عصاره‌های استخراج‌شده بر اساس روش احیای فری سیانید پتاسیم (Merck، ساخت آلمان) ارزیابی شد. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۲۵۰ میکرولیتر فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد افزوده و نمونه‌ها در ۱۶۵۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن، ۲۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت با ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط و ۵۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد اضافه شد. مخلوط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد و جذب نوری آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. افزایش جذب نوری نشان‌دهنده افزایش توان احیاءکنندگی و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها بود (Samarakoon & Madhuranga, 2023).

ساختار شیمیایی و گروه‌های عاملی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه FTIR در بازه موج‌نگاشت ۴۰۰۰ تا ۴۰۰ (cm<sup>-1</sup>) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، حدود ۱-۲ میلی‌گرم از نمونه پودر شده با ۱۰۰ میلی‌گرم پتاسیم برمید کاملاً مخلوط و فشرده شد تا یک صفحه نازک و شفاف حاصل گردد. در نهایت، طیف نوری حاصل ثبت و جهت تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (Ahmadkelayeh et al., 2023).

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویک و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. سپس، مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن برای مقایسه‌های چندگانه انجام گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ < p در نظر گرفته شد.

## نتایج

### بازدهی آستاگزانتین

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که روش‌های مختلف استخراج تأثیر معنی‌داری (p < ۰/۰۵) بر میزان بازده آستاگزانتین استخراج‌شده از زایدات میگوی سرتیز داشتند (جدول ۱). بر اساس مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان استخراج مربوط به تیمار حلال صرف با مقدار ۶۴/۸۲±۰/۰۶ (میکروگرم/گرم) بود که به طور معنی‌داری در بالاترین سطح قرار گرفت. در بررسی تیمارهای هیدرولیز آنزیمی (بدون کاربرد فراصوت)، مشاهده شد که با افزایش غلظت آنزیم از ۰/۵ درصد به ۱/۵ درصد، بازده استخراج افزایش یافت. در این میان، تیمار حاوی ۱/۵ درصد آنزیم با بازده ۳۷/۱۰±۰/۰۳ (میکروگرم/گرم)، بالاترین مقدار را در بین تیمارهای آنزیمی به خود اختصاص داد و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد آنزیمی (۰/۰۳±۱۶/۹۲ میکروگرم/گرم) نشان داد. در ارزیابی اثر ترکیبی آنزیم (۱/۵ درصد) و امواج فراصوت (۱۰۰ وات)، نتایج نشان داد که بیشترین بازده در زمان ۵ دقیقه اعمال فراصوت، با مقدار ۲۵/۸۴±۰/۰۳ (میکروگرم/گرم) به دست آمد، در حالی که با افزایش زمان فراصوت تا ۲۵ دقیقه، میزان آستاگزانتین استخراج‌شده روند کاهشی یافت. با این حال، در زمان ۳۵ دقیقه افزایش نسبی و معنی‌داری مشاهده شد.

جدول ۱- مقایسه بازده استخراج آستاگزانتین (میکروگرم/گرم) تحت تیمارهای مختلف شامل استخراج با حلال، هیدرولیز آنزیمی و هیدرولیز آنزیمی-فراصوت در زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*). حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ < p می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار گزارش شدند.

Table 1- Comparison of astaxanthin extraction yield (μg/g) under different treatments, including solvent extraction, enzymatic hydrolysis, and enzymatic-ultrasound extraction from *Metapenaeus affinis* shrimp by-product.

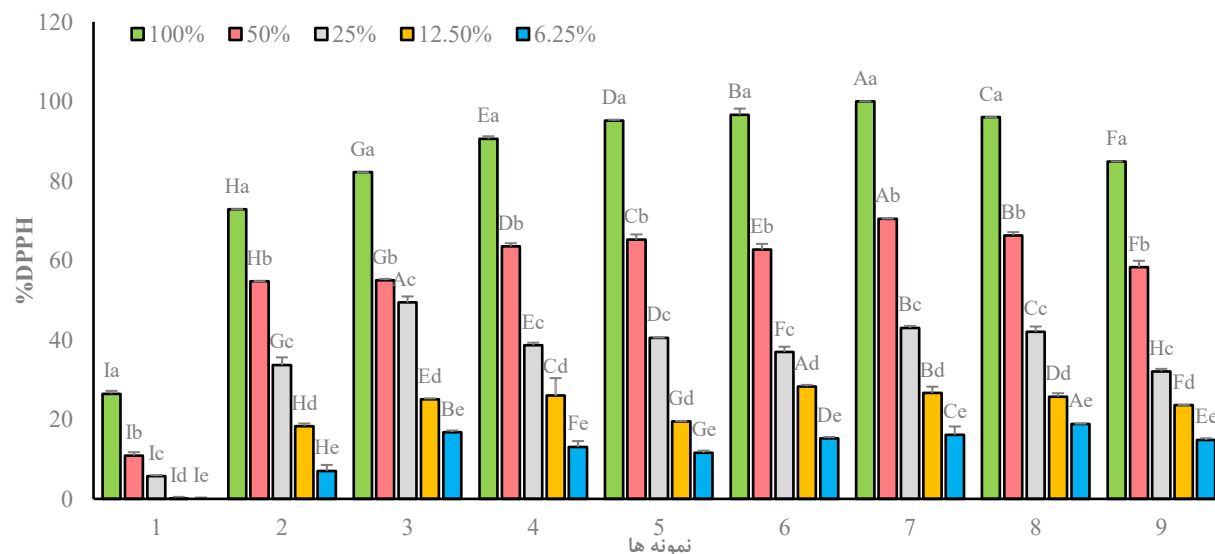
| تیمار | شرایط         | آنزیم | فراصوت            | بازده آستاگزانتین (میکروگرم/گرم) |
|-------|---------------|-------|-------------------|----------------------------------|
| ۱     | حلال صرف      | -     | -                 | ۶۴/۸۲ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>        |
| ۲     | شاهد آنزیمی   | -     | -                 | ۱۶/۹۲ ± ۰/۰۳ <sup>h</sup>        |
| ۳     | آنزیمی        | ۰/۵٪  | -                 | ۱۵/۸۹ ± ۰/۰۳ <sup>i</sup>        |
| ۴     | آنزیمی        | ۱٪    | -                 | ۳۴/۵۴ ± ۰/۰۳ <sup>c</sup>        |
| ۵     | آنزیمی        | ۱/۵٪  | -                 | ۳۷/۱۰ ± ۰/۰۳ <sup>b</sup>        |
| ۶     | آنزیمی-فراصوت | ۱/۵٪  | ۱۰۰ وات، ۵ دقیقه  | ۲۵/۸۴ ± ۰/۰۳ <sup>d</sup>        |
| ۷     | آنزیمی-فراصوت | ۱/۵٪  | ۱۰۰ وات، ۱۵ دقیقه | ۲۳/۰۷ ± ۰/۰۳ <sup>f</sup>        |
| ۸     | آنزیمی-فراصوت | ۱/۵٪  | ۱۰۰ وات، ۲۵ دقیقه | ۱۷/۵۵ ± ۰/۰۳ <sup>g</sup>        |
| ۹     | آنزیمی-فراصوت | ۱/۵٪  | ۱۰۰ وات، ۳۵ دقیقه | ۲۳/۸۷ ± ۰/۰۳ <sup>e</sup>        |

### ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی

نتایج آزمون مهار رادیکال DPPH نشان داد که در تمامی تیمارها، فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت بوده (۱۰۰ درصد: ۱۰/۸، ۵۰ درصد: ۵/۴، ۲۵ درصد: ۲/۷، ۱۲/۵ درصد: ۱/۳۵ و ۶/۲۵ درصد: ۰/۶۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر) و با کاهش غلظت نمونه، درصد مهار رادیکال نیز به طور معنی داری ( $p < ۰/۰۵$ ) کاهش یافت (شکل ۲). معادلات رگرسیون خطی به دست آمده نیز این روند را تأیید می کند و نشان دهنده رابطه مستقیم بین افزایش غلظت و افزایش توان مهار رادیکال است.

بر اساس مقادیر  $IC_{50}$  (جدول ۲)، استخراج صرف با حلال (تیمار ۱) کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد، در حالی که تیمارهای آنزیمی (تیمارهای ۳ تا ۵) فعالیت بالاتری نسبت به شاهدها داشتند. با افزایش غلظت آنزیم از ۰/۵ به ۱/۵ درصد، بهبود معنی داری ( $p < ۰/۰۵$ ) در مهار رادیکال مشاهده شد.

اعمال فراصوت بر تیمار ۱/۵ درصد آنزیمی (تیمارهای ۶ تا ۹) نیز موجب تغییر در فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها گردید. در میان همه تیمارها، تیمار ۷ (آنزیمی-فراصوت، ۱/۵ درصد آنزیم، ۱۰۰ وات، ۱۵ دقیقه) با مقدار  $IC_{50}$  برابر ۵/۸۹ میکروگرم بر میلی لیتر قوی ترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد. این موضوع بیانگر آن است که ترکیب تیمار آنزیمی با فراصوت و زمان دهی مناسب می تواند به طور قابل توجهی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره را افزایش دهد.



شکل ۲- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره های آستاگزانتین حاصل از زایدات میگوی سرتیز در غلظت های مختلف. تیمارها شامل: (۱) استخراج با حلال، (۲) شاهد آنزیمی، (۳) آنزیمی ۰/۵ درصد، (۴) آنزیمی ۱ درصد، (۵) آنزیمی ۱/۵ درصد، ۶-۹ آنزیمی-فراصوت با ۱/۵

درصد آنزیم در زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه به ترتیب، می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک غلظت مشخص و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در یک تیمار واحد است ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از سه تکرار گزارش شدند.

Figure 2- DPPH free radical scavenging activity of astaxanthin extracts obtained from *Metapenaeus affinis* shrimp by-product at different concentrations. Treatments included (1) solvent extraction, (2) enzymatic control, (3) enzymatic extraction with 0.5% enzyme, (4) enzymatic extraction with 1% enzyme, (5) enzymatic extraction with 1.5% enzyme, and (6-9) enzyme-ultrasound treatments with 1.5% enzyme for 5, 15, 25, and 35 minutes, respectively. Different uppercase letters indicate significant differences among treatments at a given concentration, whereas different lowercase letters indicate significant differences among concentrations within the same treatment ( $p < .05$ ).

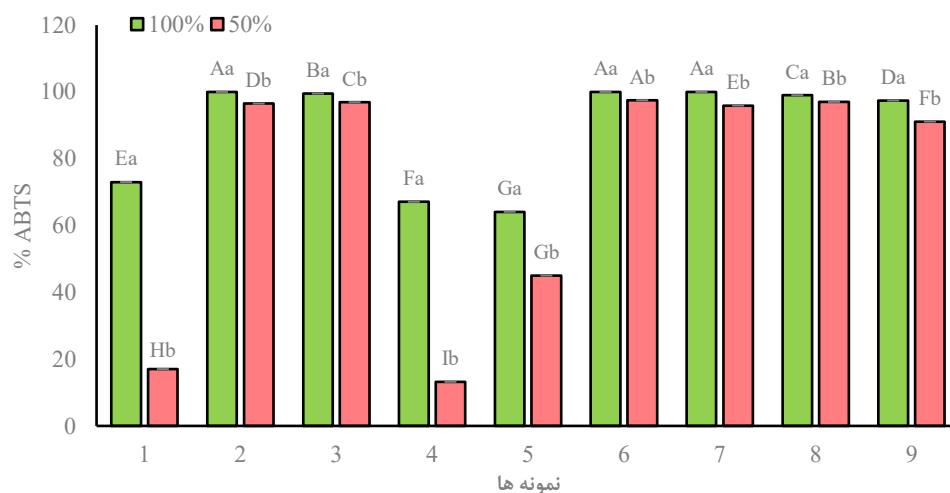
جدول ۲- مقادیر  $IC_{50}$  فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در عصاره‌های حاصل از تیمارهای مختلف استخراج آستاگزانتین از زایادات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*). (۱) استخراج با حلال، (۲) شاهد آنزیمی، (۳) آنزیمی ۰/۵ درصد، (۴) آنزیمی ۱ درصد، (۵) آنزیمی ۱/۵ درصد، (۶-۹) آنزیمی-فراصوت با ۱/۵ درصد آنزیم در زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه به ترتیب، می‌باشد. حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح  $p < 0.05$  می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از سه تکرار گزارش شدند.

Table 2-  $IC_{50}$  values of DPPH free radical scavenging activity in extracts obtained from different astaxanthin extraction treatments from *Metapenaeus affinis* shrimp by-product. Treatments included (1) solvent extraction, (2) enzymatic control, (3) enzymatic extraction with 0.5% enzyme, (4) enzymatic extraction with 1% enzyme, (5) enzymatic extraction with 1.5% enzyme, and (6-9) enzyme-ultrasound treatments with 1.5% enzyme for 5, 15, 25, and 35 minutes, respectively. Different letters within each row indicate significant differences among groups at  $p < 0.05$ . Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates.

| تیمار                          | ۱                 | ۲                 | ۳                 | ۴                 | ۵                 | ۶                 | ۷                 | ۸                 | ۹                 |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $IC_{50}$ (میکروگرم/میلی لیتر) | $30.8 \pm 0.01^a$ | $9.09 \pm 0.00^h$ | $7.31 \pm 0.01^f$ | $6.84 \pm 0.00^e$ | $6.77 \pm 0.00^d$ | $6.51 \pm 0.00^c$ | $5.89 \pm 0.01^a$ | $6.17 \pm 0.00^b$ | $7.67 \pm 0.00^g$ |

نتایج آزمون مهار رادیکال ABTS در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ درصد نشان داد که الگوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی میان تیمارهای مختلف متفاوت بوده و تغییرات معنی‌داری بین نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۳). همان‌طور که در شکل مشخص است، در غلظت ۱۰۰ درصد، تیمارهای ۲، ۶ و ۷ بیشترین مقدار مهار ABTS را نشان دادند؛ به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بین این سه تیمار مشاهده نشد و عملکرد آن‌ها برتر از سایر گروه‌ها بود. در مقابل، تیمار ۱ (استخراج معمولی با حلال) کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت.

در غلظت ۵۰ درصد نیز الگوی متفاوتی مشاهده شد؛ به‌گونه‌ای که تیمار ۶ بالاترین مقدار مهار رادیکال را نشان داد. با این حال، در تمامی تیمارها کاهش غلظت نمونه موجب کاهش معنی‌دار فعالیت مهارکنندگی ( $p < 0.05$ ) گردید. در همین غلظت، تیمارهای ۱ و ۴ کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. این کاهش قابل توجه در تیمارهای ضعیف‌تر بیانگر حساسیت آزمون ABTS به میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌هاست.

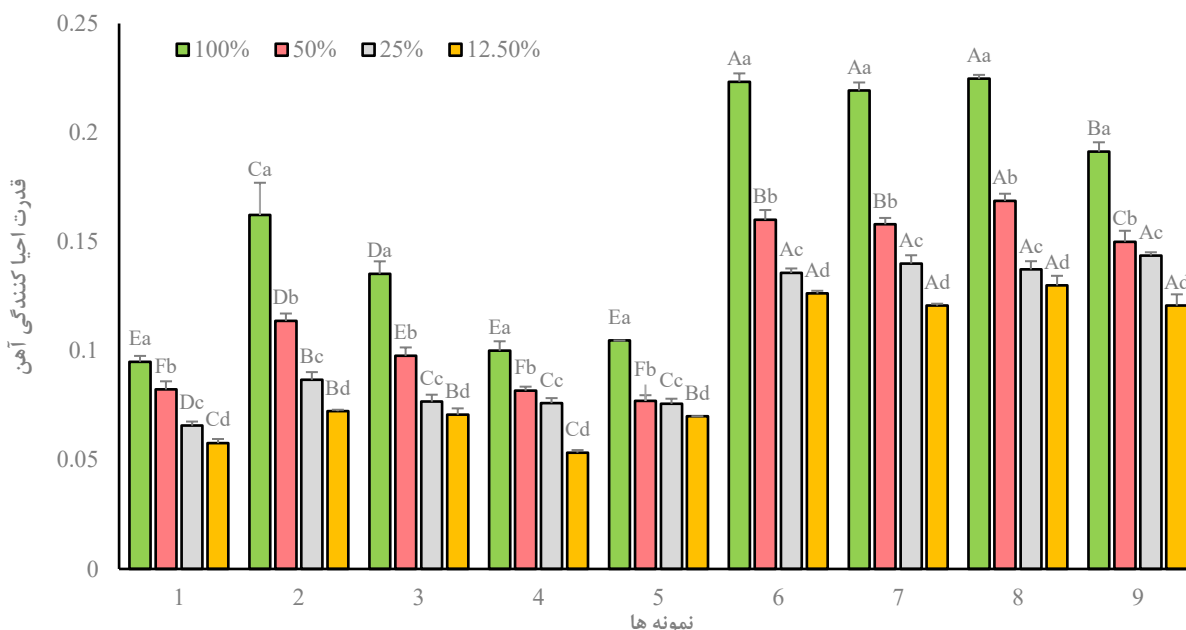


شکل ۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS عصاره‌های آستاگزانتین حاصل از زایدات میگوی سر تیز (*Metapenaeus affinis*) در غلظت‌های مختلف. تیمارها شامل: (۱) استخراج با حلال، (۲) شاهد آنزیمی، (۳) آنزیمی ۰/۵ درصد، (۴) آنزیمی ۱ درصد، (۵) آنزیمی ۱/۵ درصد، ۹-۶ (آنزیمی-فراصوت با ۱/۵ درصد آنزیم در زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه به ترتیب می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک غلظت مشخص و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در یک تیمار واحد است ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از سه تکرار گزارش شدند.

Figure 3- ABTS free radical scavenging activity of astaxanthin extracts obtained from *Metapenaeus affinis* shrimp by-product at different concentrations. Treatments included (1) solvent extraction, (2) enzymatic control, (3) enzymatic extraction with 0.5% enzyme, (4) enzymatic extraction with 1% enzyme, (5) enzymatic extraction with 1.5% enzyme, and (6-9) enzyme-ultrasound treatments with 1.5% enzyme for 5, 15, 25, and 35 minutes, respectively. Different uppercase letters indicate significant differences among treatments at a given concentration, whereas different lowercase letters indicate significant differences among concentrations within the same treatment ( $p < .05$ ).

یافته‌های مربوط به آزمون توان احیاکنندگی عصاره نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف در شکل ۴ ارائه شده است. طبق نتایج، اثر تیمار و غلظت بر توان احیاکنندگی نمونه‌ها معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). به‌طور کلی، توان احیاکنندگی با افزایش غلظت عصاره افزایش معنی‌داری نشان داد، اما الگوی این تغییر در میان تیمارها متفاوت بود. نمونه‌های آنزیمی-فراصوت (تیمارهای ۶، ۷ و ۸) بیشترین توان احیاکنندگی را در تمامی سطوح غلظتی نشان دادند، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ درصد، این سه تیمار به‌طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) جذب نوری بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند.





شکل ۴- قدرت احیا کنندگی آهن عصاره‌های آستاگزانتین حاصل از زایادات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) در غلظت‌های مختلف. تیمارها شامل: (۱) استخراج با حلال، (۲) شاهد آنزیمی، (۳) آنزیمی ۰/۵ درصد، (۴) آنزیمی ۱ درصد، (۵) آنزیمی ۱/۵ درصد، (۶-۹) آنزیمی-فراصوت با ۱/۵ درصد آنزیم در زمان‌های ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه به ترتیب، می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک غلظت مشخص و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در یک تیمار واحد است ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از سه تکرار گزارش شدند.

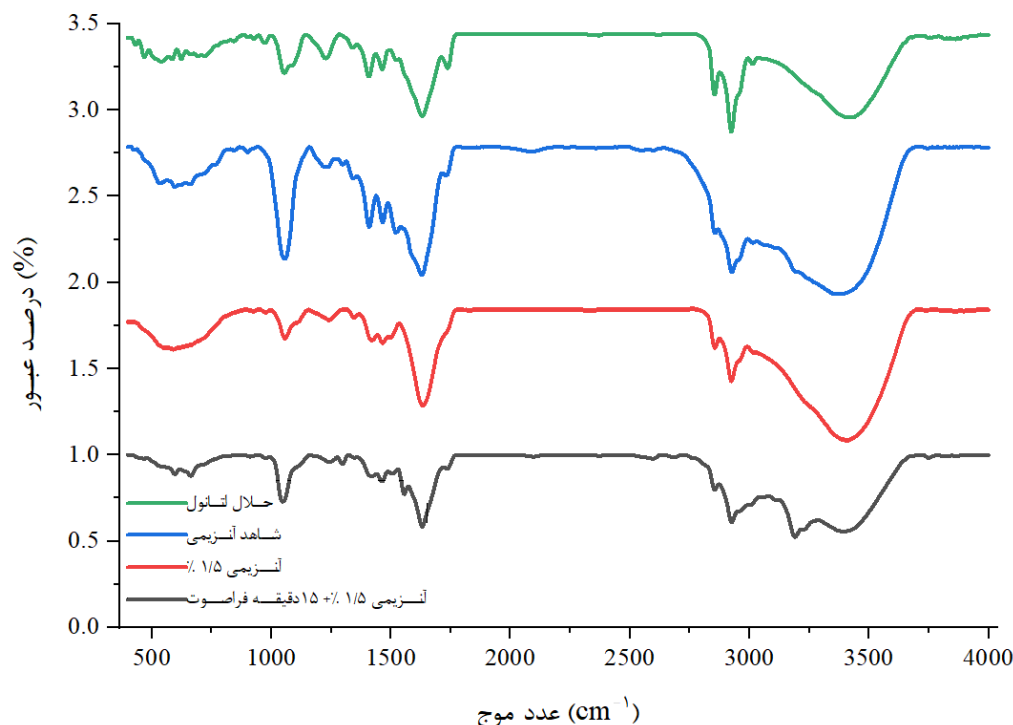
Figure 4- Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of astaxanthin extracts obtained from *Metapenaeus affinis* shrimp by-product at different concentrations. Treatments included (1) solvent extraction, (2) enzymatic control, (3) enzymatic extraction with 0.5% enzyme, (4) enzymatic extraction with 1% enzyme, (5) enzymatic extraction with 1.5% enzyme, and (6-9) enzyme-ultrasound treatments with 1.5% enzyme for 5, 15, 25, and 35 minutes, respectively. Different uppercase letters indicate significant differences among treatments at a given concentration, whereas different lowercase letters indicate significant differences among concentrations within the same treatment ( $p < .05$ ).

### آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

طیف‌های FTIR مربوط به نمونه‌های حاصل از چهار تیمار شامل شاهد آنزیمی، حلال صرف، تیمار آنزیمی ۱/۵ درصد و تیمار آنزیمی ۱/۵ درصد همراه با فراصوت ۱۵ دقیقه در شکل ۵ ارائه شده است. تمامی نمونه‌ها الگوی طیفی مشابهی نشان دادند که حاکی از حضور ترکیبات دارای گروه‌های عاملی مشابه در تمامی عصاره‌ها است.

در تمام طیف‌ها، یک باند پهن در محدوده  $3300-3400 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد که معمولاً به ارتعاش کششی پیوندهای O-H نسبت داده می‌شود. وجود این باند می‌تواند نشان‌دهنده حضور اجزای قطبی یا مقادیر اندکی از حلال باقی‌مانده در نمونه باشد. باندهای مشخص در ناحیه  $1650-1600 \text{ cm}^{-1}$  نیز مشاهده شد که معمولاً به ارتعاش‌های کششی C=C در سیستم‌های دارای پیوندهای مزدوج یا به C=O ضعیف نسبت داده می‌شوند. این ناحیه از نظر شیمیایی با ساختارهای مزدوجی که در ترکیبات کاروتنوئیدی دیده می‌شود سازگار است. همچنین باندهایی در بازه  $1200-1000 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده گردید که بیانگر ارتعاش‌های کششی پیوندهای C-O است. این الگو در تمامی تیمارها دیده شده و نشان‌دهنده

حضور ترکیبات دارای اسکلت اکسیژنه مشابه می‌باشد. با وجود حفظ موقعیت باندهای شاخص در تمام نمونه‌ها، تفاوت‌هایی در شدت نسبی باندهای O-H و C-O بین تیمارها مشاهده شد که احتمالاً به اختلاف در میزان و ترکیب اجزای همراه استخراج‌شده مربوط است.



شکل ۵- طیف FTIR عصاره‌های آستاگزانتین حاصل از زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) تحت تیمارهای مختلف.

Figure 5- FTIR spectra of astaxanthin extracts obtained from *Metapenaeus affinis* shrimp by-product under different extraction treatments (enzymatic control, 1.5% enzymatic extraction, enzyme-ultrasound treatment for 15 minutes, and solvent extraction).

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که روش استخراج تأثیر قابل توجهی بر بازده آستاگزانتین استخراج‌شده از زایدات میگوی سرتیز (*Metapenaeus affinis*) دارد. در میان تیمارهای مورد بررسی، استخراج با حلال بیشترین بازده را نشان داد (جدول ۱)، که احتمالاً به ماهیت نسبتاً چربی‌دوست آستاگزانتین مربوط است؛ به طوری که حلال‌های آلی قادرند این رنگدانه را با کارایی بیشتری حل کرده و از ماتریکس زیستی استخراج کنند. نفوذ مناسب حلال در بافت و افزایش جرم نیز می‌تواند آزادسازی مؤثرتر این کاروتنوئید را تسهیل کند (Jiang et al., 2024). در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی بدون فراصوت، افزایش غلظت آنزیم موجب افزایش معنی‌دار بازده استخراج شد (جدول ۱)، که احتمالاً به تجزیه اجزای ساختاری بافت نظیر پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها و در نتیجه آزادسازی ترکیبات محبوس از جمله کاروتنوئیدها مربوط است. روند مشابهی توسط Sowmya و همکاران گزارش شده است (Sowmya et al., 2014)؛ آن‌ها نشان دادند که افزایش غلظت آنزیم در طی هیدرولیز آنزیمی زایدات میگو باعث بهبود قابل توجه بازده استخراج می‌شود. در زایدات میگو، آستاگزانتین عمدتاً در قالب کمپلکس‌های کاروتنوپروتئینی با پروتئین‌های پوسته و بافت‌های جانبی وجود دارد؛ بنابراین هیدرولیز آنزیمی می‌تواند با شکستن این ساختارهای پروتئینی، آزادسازی آستاگزانتین از ماتریکس زیستی را تسهیل کند (Chen & Meyers, 1983; Sedyaaw et al., 2025). با این حال، بازده استخراج در این تیمارها همچنان کمتر از استخراج با حلال باقی ماند که می‌تواند به حلالیت محدود آستاگزانتین در محیط‌های آبی سیستم‌های آنزیمی و باقی ماندن بخشی از آن در

ماتریکس لیپیدی نسبت داده شود (Abd El-Ghany et al., 2023; In et al., 2008). با این حال، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که استخراج به کمک آنزیم می‌تواند بازده بازیابی آستاگزانتین بالاتری نسبت به استخراج متداول با حلال داشته باشد (Abd El-Ghany et al., 2023; Gogate & Nadar, 2015). این اختلاف در نتایج می‌تواند ناشی از به‌کارگیری شرایط بهینه هیدرولیز در برخی مطالعات باشد؛ از جمله زمان‌های انکوباسیون طولانی‌تر، استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک اختصاصی، pH کنترل‌شده و شرایط دمایی مناسب که آزادسازی کاروتنوئیدها را تسهیل کرده و در عین حال تخریب اکسیداتیو آن‌ها را به حداقل می‌رساند. در تیمارهای ترکیبی آنزیم و فراصوت نیز تغییراتی در بازده مشاهده شد؛ به طوری که اعمال فراصوت در زمان‌های کوتاه‌تر باعث افزایش بازده استخراج شد که احتمالاً ناشی از پدیده کاویتاسیون و افزایش انتقال جرم است (Gogate & Nadar, 2015; Rezaei et al., 2022). در مقابل، کاهش بازده در زمان‌های طولانی‌تر فراصوت ناشی از قرار گرفتن کاروتنوئیدها در شرایط تنش‌زای بالاست. قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض فراصوت، دمای موضعی بالا و نیروهای برشی شدید ایجاد می‌کند و از طریق سونولیز آب (تجزیه آب با فراصوت)، منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. این گونه‌های فعال می‌توانند به سیستم پلی‌انی (زنجره پیوندهای دوگانه) آستاگزانتین حمله کرده و باعث تخریب یا تجزیه آن شوند، در نتیجه بازده کلی کاهش می‌یابد (Serpone & Colarusso, 1994). در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که کارایی استخراج آستاگزانتین به شدت تحت تأثیر شرایط فرایندی نظیر نوع روش استخراج، غلظت آنزیم و زمان اعمال فراصوت قرار دارد.

اگرچه استخراج با حلال منجر به بازده بالاتر آستاگزانتین شد، اما عصاره‌های حاصل از تیمارهای آنزیمی و فراصوت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری را در آزمون‌های DPPH، ABTS و توان احیاکنندگی آهن نشان دادند (شکل‌های ۲ تا ۴). این نتایج بیانگر آن است که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها صرفاً تابع مقدار آستاگزانتین استخراج‌شده نیست، بلکه به کیفیت شیمیایی عصاره و نیز حضور همزمان سایر ترکیبات زیست‌فعال و برهم‌کنش‌های آن‌ها نیز وابسته است (Panagiotakopoulos & Nasopoulou, 2024). هیدرولیز آنزیمی با شکستن ساختارهای پروتئینی می‌تواند موجب رهاسازی آستاگزانتین متصل و افزایش دسترسی پذیری آن شود. افزون بر این، هیدرولیز پروتئین‌ها می‌تواند پپتیدهای با وزن مولکولی پایین تولید کند که خود دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Messina et al., 2021). از منظر ماهیت مولکولی آستاگزانتین نیز این احتمال وجود دارد که شرایط استخراج تا حدی بر وضعیت ایزومری یا پایداری این رنگدانه تأثیر بگذارد. گزارش شده است که آستاگزانتین می‌تواند در اثر شرایط فرایندی مختلف دچار ایزومریزاسیون (trans/cis) یا تا حدی اکسیداسیون شود، که این تغییرات ممکن است بر خواص آنتی‌اکسیدانی آن اثرگذار باشند (Snell & Carberry, 2022).

در آزمون DPPH (شکل ۲)، تیمارهای آنزیمی و به‌ویژه تیمارهای ترکیبی آنزیمی-فراصوت، درصد مهار رادیکال بالاتری نسبت به تیمار حلال نشان دادند. از آن‌جا که آزمون DPPH بیشتر نسبت به ترکیبات لیپوفیلیک حساس است، این نتیجه می‌تواند نشان‌دهنده آزادسازی مؤثرتر ترکیبات کاروتنوئیدی فعال یا بهبود دسترسی پذیری آن‌ها در اثر تیمارهای زیستی باشد (Panagiotakopoulos & Nasopoulou, 2024). همچنین، افزایش غلظت عصاره منجر به افزایش درصد مهار رادیکال شد که به افزایش تعداد مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی در دسترس برای خنثی‌سازی رادیکال‌ها مربوط می‌شود. با این حال، شدت این افزایش در همه تیمارها یکسان نبود؛ موضوعی که احتمالاً ناشی از تفاوت در ترکیب عصاره‌ها و نسبت میان آستاگزانتین، پپتیدها و سایر ترکیبات زیست‌فعال است. نتایج مشابهی در پژوهش Sharayei و همکاران (2021) نیز گزارش شده است؛ به طوری که استفاده از فراصوت در استخراج آستاگزانتین از پوسته میگو باعث بهبود ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره شد. بررسی مقادیر IC<sub>50</sub> نیز این تفاوت کیفی را تأیید کرد (جدول ۲). در مطالعه حاضر، در میان همه تیمارها، تیمار ۷ (آنزیمی-فراصوت، ۱/۵ درصد آنزیم، ۱۰۰ وات، ۱۵ دقیقه) قوی‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. گزارش‌های پیشین نشان داده‌اند که روش استخراج، نوع ماتریکس زیستی، گونه مورد بررسی و شرایط فرایندی، از جمله نوع آنزیم،

زمان هیدرولیز و شدت فراصوت، می‌توانند تأثیر قابل توجهی بر مقدار IC50 داشته باشند. در بسیاری از این پژوهش‌ها، استفاده از روش‌های کمکی مانند هیدرولیز آنزیمی و فراصوت با کاهش IC50 و در نتیجه افزایش توان آنتی‌اکسیدانی همراه بوده است (Rezaei et al., 2022). با این حال، اختلاف مقادیر IC50 بین مطالعات مختلف را باید با توجه به تفاوت در شرایط استخراج، نوع نمونه، ترکیب شیمیایی عصاره و شرایط انجام آزمون تفسیر کرد.

در آزمون ABTS نیز الگوی مشابهی مشاهده شد (شکل ۳)، با این تفاوت که در برخی تیمارها پاسخ آنتی‌اکسیدانی حتی برجسته‌تر بود. این موضوع می‌تواند به ماهیت این آزمون مربوط باشد؛ زیرا ABTS قادر است فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آب‌دوست و چربی‌دوست را به‌طور هم‌زمان ارزیابی کند. بنابراین، حضور پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئینی در کنار آستاگزانتین ممکن است نقش مهمی در افزایش فعالیت مشاهده شده در این آزمون داشته باشد. افزایش فعالیت با بالا رفتن غلظت عصاره نیز منطقی است، زیرا با افزایش غلظت، احتمال برهم‌کنش میان مولکول‌های آنتی‌اکسیدان و رادیکال‌های آزاد بیشتر می‌شود. یافته حاضر با گزارش Ratnawaty و همکاران (2025) هم‌راستا است که نشان داد پاسخ آزمون ABTS می‌تواند تحت تأثیر حضور هم‌زمان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با ماهیت متفاوت قرار گیرد.

در آزمون توان احیاکنندگی آهن نیز اثر هر دو فاکتور تیمار و غلظت معنی‌دار بود (شکل ۴). به‌طور کلی، توان احیاکنندگی با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت که این امر می‌تواند ناشی از افزایش غلظت ترکیبات دهنده الکترون در محیط واکنش باشد. با این حال، الگوی پاسخ در میان تیمارها یکسان نبود؛ به‌طوری‌که تیمارهای آنزیمی-فراصوت (۶، ۷ و ۸) در تمامی سطوح غلظتی بالاترین توان احیاکنندگی را نشان دادند و در غلظت 100 درصد به‌طور معنی‌داری جذب نوری بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشتند ( $p < 0.05$ ). این برتری احتمالاً ناشی از اثر هم‌افزای هیدرولیز آنزیمی و فراصوت در آزادسازی ترکیبات احیاکننده، از جمله کاروتنوئیدها و پپتیدهای زیست‌فعال، است (Messina et al., 2021). نتایج مشابهی در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است که در آن‌ها کاربرد روش‌های سبز استخراج منجر به بهبود ظرفیت احیاکنندگی عصاره‌های حاصل شده است (Sharayei et al., 2021; Rezaei et al., 2022). به‌طور کلی، کاویتاسیون فراصوت با ایجاد ریزترک‌ها و تخریب فیزیکی بافت، نفوذپذیری را افزایش داده و انتقال جرم را بهبود می‌دهد؛ بنابراین می‌تواند آزادسازی ترکیبات محبوس در ماتریکس سخت‌پوستی (از جمله آستاگزانتین متصل و ترکیبات پروتئینی/پپتیدی) را تسریع کند و به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی منجر شود. با این حال، باید در نظر داشت که اعمال فراصوت به‌ویژه در شدت و زمان‌های بالاتر ممکن است با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد (برای مثال از طریق سونولیز آب) همراه باشد؛ پدیده‌ای که می‌تواند به اکسیداسیون رنگدانه‌ها و کاهش کارایی آنتی‌اکسیدانی یا کاهش مقدار آستاگزانتین در شرایط نامطلوب منجر شود (Marques et al., 2024; Meena et al., 2024). بنابراین، اثر نهایی فراصوت به یک تعادل بین افزایش آزادسازی و انتقال جرم از یک سو و احتمال تخریب اکسیداتیو از سوی دیگر وابسته است.

بررسی طیف‌های FTIR نشان داد (شکل ۵)، که موقعیت باندهای اصلی در تمامی تیمارها مشابه بوده و وجود گروه‌های عاملی سازگار با ساختار کاروتنوئیدها را تأیید می‌کند (Lóránd et al., 2002). با این حال، تفاوت در شدت نسبی برخی باندها نشان می‌دهد که ترکیبات همراه موجود در عصاره‌ها تحت تأثیر روش استخراج قرار گرفته‌اند. در تیمار شاهد، شدت باند O-H در محدوده ۳۳۰۰-۳۴۰۰  $\text{cm}^{-1}$  بیشتر بود که می‌تواند نشان‌دهنده حضور ترکیبات قطبی نظیر قندها، پلی‌ال‌ها یا بقایای پروتئینی باشد (Carpenter & Crowe, 1989). کاهش نسبی این باند در عصاره اتانولی و تیمار آنزیمی ۱/۵ درصد بیانگر حذف بخشی از اجزای قطبی ماتریکس اولیه در این فرآیندها است، در حالی که کمترین شدت آن در تیمار آنزیمی همراه با فراصوت مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده کاهش ترکیبات قطبی همراه باشد. در ناحیه ۱۲۰۰-۱۰۰۰  $\text{cm}^{-1}$  مربوط به ارتعاش‌های C-O نیز اختلافاتی میان تیمارها مشاهده شد؛ به‌طوری‌که شدت این باند در تیمار شاهد و عصاره اتانولی بیشتر بود، در حالی که در تیمارهای آنزیمی، به‌ویژه همراه با فراصوت، کاهش یافت. این الگو می‌تواند بیانگر کاهش ترکیبات اکسیژنه غیرهدف یا پلی‌ساکاریدهای همراه در طی فرآیندهای آنزیمی باشد (Rahimpour & Taghian Dinani, 2018). در مقابل، باندهای مربوط به سیستم‌های مزدوج C=C در

ناحیه ۱۶۵۰-۱۶۰۰ ( $\text{cm}^{-1}$ ) در تمامی تیمارها پایدار باقی ماندند که نشان می‌دهد ساختار مولکولی اصلی کاروتنوئیدها دچار تغییر قابل توجهی نشده است. همچنین مشاهده باندهای جذبی در محدوده‌های آمیدی (Amide I و Amide II) می‌تواند نشان‌دهنده حضور اجزای پروتئینی یا پپتیدی در برخی عصاره‌ها باشد که احتمالاً ناشی از هیدرولیز ساختارهای کاروتنوپروتئینی طی تیمار آنزیمی است (Britton, 1995).

به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد که هرچند ماهیت گروه‌های عاملی اصلی در تمامی عصاره‌ها مشابه است، پروفایل ترکیبات همراه به طور قابل توجهی تحت تأثیر نوع تیمار قرار می‌گیرد؛ به ویژه تیمار آنزیمی همراه با فراصوت که کاهش بیشتری در باندهای مرتبط با ترکیبات قطبی نشان داده و می‌تواند بیانگر خلوص نسبی بالاتر عصاره حاصل باشد.

### نتیجه گیری نهایی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که نوع فرآیند استخراج، بر بازده آستاگزانتین و ویژگی‌های زیست‌فعال عصاره‌های به‌دست‌آمده از زایدات میگوی سرتیز اثرگذار است. استخراج با حلال، بازده بالاتری از آستاگزانتین ایجاد کرد، اما تیمارهای هیدرولیز آنزیمی، به‌ویژه در ترکیب با فراصوت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نشان دادند. این تفاوت می‌تواند به نقش آنزیم‌ها در آزادسازی آستاگزانتین از ساختارهای کاروتنوپروتئینی و همچنین حضور اجزای هم‌استخراج‌شده مانند پپتیدها در عصاره مرتبط باشد که ممکن است به افزایش فعالیت زیستی کمک کنند. نتایج FTIR نیز تغییراتی در الگوی گروه‌های عاملی را نشان داد که می‌تواند بیانگر تفاوت ترکیب عصاره‌ها تحت تیمارهای مختلف باشد. در مجموع، استفاده از هیدرولیز آنزیمی همراه با فراصوت می‌تواند رویکردی مناسب برای بازیابی ترکیبات زیست‌فعال از زایدات میگو و افزایش ارزش افزوده این پسماندها برای کاربردهای بالقوه در صنایع غذایی، دارویی و مکمل‌ها باشد. با این حال، برای تصمیم‌گیری درباره کاربرد صنعتی، بررسی‌های تکمیلی درباره پایداری آستاگزانتین در شرایط نگهداری و فرآوری و نیز ارزیابی‌های ایمنی و کارایی در ماتریس‌های واقعی پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفته است که بدین‌وسیله از آن دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را داریم. **تأییدیه اخلاقی:** در صورت کار با موجودات زنده، تأییدیه اخلاقی باید ذکر شود. در غیر اینصورت جمله، موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است، نوشته شود.

**تعارض منافع:** نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی در رابطه با انجام این پژوهش و انتشار نتایج آن وجود ندارد.

**منابع مالی:** در صورت وجود ذکر شوند. توجه فرمایید که ذکر جمله از محل هزینه‌های شخصی امکان پذیر نیست.

**سهم نویسندگان:** سجادبرزگرزاده: انجام کارهای آزمایشگاهی، جمع‌بندی داده‌ها، نگارش اولیه مقاله. سمانه پزشک: استاد راهنما، طراحی پژوهش، تجزیه تحلیل داده‌ها، نگارش مقاله. حبیب اله یونسی: استاد مشاور، تجزیه تحلیل داده‌ها، ویرایش مقاله.

### منابع

- [1] Abd El-Ghany, M. N., Hamdi, S. A., Elbaz, R. M., Aloufi, A. S., El Sayed, R. R., Ghonaim, G. M., & Farahat, M. G. (2023). Development of a Microbial-Assisted Process for Enhanced Astaxanthin Recovery from Crab Exoskeleton By-product. *Fermentation*, 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060505>
- [2] Ahmadkelayeh, S., Cheema, S. K., & Hawboldt, K. (2023). Evaluation of conventional solvent processes for lipid and astaxanthin extraction from shrimp processing by-products. *Chemical Engineering Communications*, 210(3), 398–411. <https://doi.org/10.1080/00986445.2022.2050711>
- [3] Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>

- [4] Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S., & 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, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.128>
- [5] Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551–1558. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.15.8529834>
- [6] Carpenter, J. F., & Crowe, J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28(9), 3916–3922. <https://doi.org/10.1021/bi00435a044>
- [7] Chen, H., & Meyers, S. P. (1983). Ensilage Treatment of Crawfish By-product for Improvement of Astaxanthin Pigment Extraction. *Journal of Food Science*, 48(5), 1516–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb03528.x>
- [8] Chi Hai, T., Van Man, P., & Anh, L. T. H. (2025). Microwave-assisted extraction of astaxanthin from shrimp shell by-products (*Penaeus monodon*) using deep eutectic solvents and evaluation of antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 19(7), 4796–4811. <https://doi.org/10.1007/s11694-025-03292-9>
- [9] De Aguiar Saldanha Pinheiro, A. C., Martí-Quijal, F. J., Barba, F. J., Benítez-González, A. M., Meléndez-Martínez, A. J., Castagnini, J. M., Tappi, S., & Rocculi, P. (2023). Pulsed Electric Fields (PEF) and Accelerated Solvent Extraction (ASE) for Valorization of Red (*Aristeus antennatus*) and Camarote (*Melicerus kerathurus*) Shrimp Side Streams: Antioxidant and HPLC Evaluation of the Carotenoid Astaxanthin Recovery. *Antioxidants*, 12(2), 406. <https://doi.org/10.3390/antiox12020406>
- [10] Engel, T., Jiménez-Mateos, E. M., & Diaz-Hernandez, M. (2022). Purinergic Signalling and Inflammation-Related Diseases. *Cells*, 11(23), 3748. <https://doi.org/10.3390/cells11233748>
- [11] FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [12] Foti, M. C., Daquino, C., DiLabio, G. A., & Ingold, K. U. (2011). Kinetics of the Oxidation of Quercetin by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•). *Organic Letters*, 13(18), 4826–4829. <https://doi.org/10.1021/ol2019086>
- [13] Gogate, P. R., & Nadar, S. G. (2015). Ultrasound-assisted Intensification of Extraction of Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. *Indian Chemical Engineer*, 57(3–4), 240–255. <https://doi.org/10.1080/00194506.2015.1026947>
- [14] In, M.-J., Choi, J.-H., Kim, S.-Y., Chae, H.-J., & Kim, D.-H. (2008). Enhanced Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using enzyme treatments. *Applied Biological Chemistry*, 51(3), 247–249.
- [15] Jiang, Y., Ye, J., Hu, Y., Zhang, J., Li, W., Zhou, X., Yu, M., Yu, Y., Yang, J., Yang, W., Jiang, J., Cui, J., & Hu, Y. (2024). Extraction and Synthesis of Typical Carotenoids: Lycopene,  $\beta$ -Carotene, and Astaxanthin. *Molecules*, 29(19), 4549. <https://doi.org/10.3390/molecules29194549>
- [16] Lóránd, T., Deli, J., Molnár, P., & Tóth, G. (2002). FT-IR Study of Some Carotenoids. *Helvetica Chimica Acta*, 85(6), 1691–1697. <https://doi.org/10.1002/1522-2675>
- [17] Marques, L. P., Bernardo, Y. A. A., & Conte-Junior, C. A. (2024). Applications of high-intensity ultrasound on shrimp: Potential, constraints, and prospects in the extraction and retrieval of bioactive compounds, safety, and quality. *Journal of Food Science*, 89(6), 3148–3166. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17093>
- [18] Meena, L., Gowda, N. N., Sunil, C. K., Rawson, A., & Janghu, S. (2024). Effect of ultrasonication on food bioactive compounds and their bio-accessibility: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 126, 105899. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105899>
- [19] Messina, C. M., Manuguerra, S., Arena, R., Renda, G., Ficano, G., Randazzo, M., Fricano, S., Sadok, S., & Santulli, A. (2021). In Vitro Bioactivity of Astaxanthin and Peptides from Hydrolysates of Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) By-Products: From the Extraction Process to Biological Effect Evaluation, as Pilot Actions for the Strategy “From By-product to Profit.” *Marine Drugs*, 19(4), 216. <https://doi.org/10.3390/md19040216>
- [20] Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
- [21] Nishida, Y., Berg, P., Shakersain, B., Hecht, K., Takikawa, A., Tao, R., Kakuta, Y., Urugami, C., Hashimoto, H., Misawa, N., & Maoka, T. (2023). Astaxanthin: Past, Present, and Future. *Marine Drugs*, 21(10), 514. <https://doi.org/10.3390/md21100514>
- [22] Panagiotakopoulos, I., & Nasopoulou, C. (2024). Extraction Methods, Encapsulation Techniques, and Health Benefits of Astaxanthin. *Sustainability*, 16(24), 10859. <https://doi.org/10.3390/su162410859>

- [23] Rahimpour, S., & Taghian Dinani, S. (2018). Lycopene extraction from tomato processing by-product using ultrasound and cell-wall degrading enzymes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2394–2403. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9856-7>
- [24] Ratnawaty, G. J., Indrawati, R., Wahdaniah, W., & Rakhman, K. A. (2025). An overview of advanced 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) analysis techniques. *Walisongo Journal of Chemistry*, 8(2), 138–152. <https://doi.org/10.21580/wjc.v8i2.26028>
- [25] Ravanipour, M., Bagherzadeh, R., & Mahvi, A. H. (2021). Fish and shrimp waste management at household and market in Bushehr, Iran. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 23, 1394–1403. <https://doi.org/10.1007/s10163-021-01219-2>
- [26] Rezaei, D., Rezaie, M., & Pezeshk, S. (2022). Application of ultrasound in extracting astaxanthin from banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) and investigating its antioxidant properties. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 12(1), 54–66. (In Persian)
- [27] Samarakoon D. N. A. W., & Madhuranga H. D. T., (2023). Advancing In vitro Antioxidant Activity Assessment: A Comprehensive Methodological Review and Improved Approaches for DPPH, FRAP and H2O2 Assays. *Journal of Natural & Ayurvedic Medicine*, 7(4), 1–7. <https://doi.org/10.23880/jonam-16000431>
- [28] Sedyaw, P., Kalluri, S., Meshre, S. D., Bhatkar, V. R., Bhaladhare, D. R., Kamble, P. A., Kawade, S. S., Janbandhu, S., & Alam, Md. S. (2025). A Review on Advances in Extraction Technologies, Analytical Characterization, and Various Applications of Astaxanthin Derived from Seafood By-product. *International Journal of Bio-Resource and Stress Management*, 16(12), 01–13. <https://doi.org/10.23910/1.2025.6627>
- [29] Serpone, N., & Colarusso, P. (1994). Sonochemistry I. Effects of ultrasounds on heterogeneous chemical reactions – a useful tool to generate radicals and to examine reaction mechanisms. *Research on Chemical Intermediates*, 20(6), 635–679. <https://doi.org/10.1163/156856794X00261>
- [30] Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S., & Ramaswamy, H. S. (2021). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105666. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105666>
- [31] Snell, T. W., & Carberry, J. (2022). Astaxanthin Bioactivity Is Determined by Stereoisomer Composition and Extraction Method. *Nutrients*, 14(7), 1522. <https://doi.org/10.3390/nu14071522>
- [32] Sowmya, R., Ravikumar, T. M., Vivek, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. M. (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp by-product for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3199–3207. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0815-8>
- [33] Zahid, U., Rezaei, K., & Saldaña, M. D. A. (2026). Upcycling shrimp shells using supercritical CO2 assisted by enzymatic pretreatment: astaxanthin, protein, and amino acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 418, 1679–1695. <https://doi.org/10.1007/s00216-025-06148-9>

## Effects of Enzymatic Hydrolysis and Ultrasound Treatment on the Bioactivity of Astaxanthin Extracted from Jinga Shrimp (*Metapenaeus affinis*) by-products

Sajjad Barzegarzadeh <sup>1</sup>, Samaneh Pezeshk <sup>1\*</sup>, Habibollah Younesi <sup>2</sup>

1. Department of Marine Biology, Marine Biotechnology Division, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

2. Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

### ABSTRACT

Shrimp processing by-product is considered a valuable source of bioactive compounds, particularly carotenoids such as astaxanthin. The aim of this study was to investigate the effects of enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment on astaxanthin extraction and antioxidant activity of extracts obtained from Jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*) by-product. Astaxanthin extraction was performed using different methods including solvent extraction, enzymatic hydrolysis at different enzyme concentrations (0.5, 1, and 1.5%), and a combination of enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment at 100 W. The antioxidant activity of the extracts was evaluated using DPPH and ABTS radical scavenging assays as well as ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was also employed to identify the functional groups present in the extracts. The results showed that solvent extraction provided the highest astaxanthin yield ( $64.82 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ), whereas enzymatic and enzymatic-ultrasound treatments exhibited higher antioxidant activity. In the DPPH assay, the 1.5% enzymatic treatment combined with 15 min ultrasound showed the lowest  $\text{IC}_{50}$  value ( $5.89 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ), indicating significantly greater radical scavenging activity. Similarly, in both ABTS and FRAP assays, enzymatic-ultrasound treatments demonstrated superior performance compared with the other treatments. FTIR analysis also confirmed the presence of functional groups associated with carotenoid structures. Overall, the combination of enzymatic hydrolysis and ultrasound treatment can be considered an effective approach for enhancing astaxanthin release and improving the antioxidant capacity of extracts derived from shrimp by-product.

**KEYWORDS:** Astaxanthin; shrimp by-product; enzymatic hydrolysis; ultrasound; antioxidant activity

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

**Received:** 31 May 2026

**Revised:** 26 June 2026

**Accepted:** 03 August 2026

**Published Online:** 20 August 2026

\* Corresponding Author:

Email address: s.pezeshk@modares.ac.ir

Tel: 011 4499 8000

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513