Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Comparison of ultrasound with soaking method for extracting astaxanthin pigment from shrimp *(Fenneropenaeus merguiensis)* and gammarus *(Pontogammarus maeoticus)* using ionic liquid microemulsion in water

Parisa Feizi[1], Yahya Maghsoudlou[2*], Hoda Shahiri Tabarestani[3], Seyed Mahdi Jafari[4], Amir Bahri[5]

[1] Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

[2] Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: y.maghsoudlou@gau.ac.ir

[3] Assistant Professor , Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

[4] Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

[5] Associate Professor, Department of Fisheries, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2023-09-06
Revised: 2023-12-24
Accepted: 2024-02-12

Keywords:
Astaxanthin
Ultrasound
Green extraction
Natural antioxidant
Shrimp waste

ABSTRACT

Background and objectives: Astaxanthin, an orange-red carotenoid pigment belonging to the xanthophyll group, is characterized by the presence of carbon, hydrogen, and oxygen atoms in its structure. Within oxygenated carotenoid derivatives, it holds the highest concentration. Astaxanthin sources can be categorized into two main groups: natural and synthetic. Extensive research has focused on the recovery of carotenoids, including astaxanthin, from solid by-products of shrimp and crustaceans. This interest stems from its potential applications in pharmaceuticals, chemicals, food, and animal feed industries, attributed to its notable coloring and antioxidant properties. This study aims to compare the extraction of astaxanthin from the shells of shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) and Gammarus (*Pontogammarus maeoticus*). Two methods, the traditional soaking method and an ultrasound method utilizing a microemulsion of ionic liquid in water, were employed for the extraction process.

Materials and methods: The initial step involved the preparation of sample powder using a freeze dryer. Subsequently, the extraction process was initiated by combining the prepared samples with an ionic liquid microemulsion in water, maintaining a 5:1 ratio of solvent to sample. Two distinct methods were employed for extraction: the traditional soaking method conducted at room temperature for 24 hours and the ultrasound method, carried out at ambient temperature, utilizing a power of 60 watts for a duration of 30 minutes. The assessment of astaxanthin extraction was conducted through a spectrophotometer. Various parameters, including astaxanthin extraction amount, total carotenoid amount, extraction efficiency percentage, and antioxidant activity, were scrutinized. The antioxidant activity was measured using the DPPH method.

Results: The ultrasound method proved to be highly effective in extracting astaxanthin from shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*), yielding a maximum amount of 76.30 ± 1.09 mg/ml. This result highlighted shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) as a superior source for astaxanthin extraction compared to Gammarus (*Pontogammarus maeoticus*). Moreover, the study demonstrated the superior efficiency of the ultrasound method over the soaking method, with extraction efficiencies for shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) calculated at 95% and 59%, respectively. The total carotenoid content for shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) was measured at 77.98±1.33 ml/g and 79.77±0.46 ml/g using the soaking and ultrasound methods, respectively. Notably, the antioxidant activity of astaxanthin extracted through the traditional soaking method surpassed that of the ultrasound method. However, when compared to the synthetic antioxidant BHT, astaxanthin exhibited lower antioxidant activity at increasing concentrations in both methods.In summary, the ultrasound method demonstrated its superiority in astaxanthin extraction, with shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) emerging as a more favorable source. Despite its lower antioxidant activity compared to BHT, astaxanthin's natural origin and extraction efficiency make it a promising candidate for various applications.

Conclusion: In general, the results of this research showed the importance of waste and new methods in extracting valuable compounds. In the context of extracting astaxanthin from two selected sources, shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) emerged as a superior source compared to Gammarus (*Pontogammarus maeoticus*). Furthermore, the study highlighted the ultrasound method as a promising alternative to traditional extraction methods, exhibiting superior performance and efficiency. These findings contribute to the broader understanding of sustainable practices and advanced techniques in maximizing the extraction of valuable compounds from natural sources.

Cite this article: Feizi, P., Maghsoudlou, Y., Shahiri Tabarestani, H., Jafari, S.M., Bahri, A. 2024. Comparison of ultrasound with soaking method for extracting astaxanthin pigment from shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) and gammarus (*Pontogammarus maeoticus*) using ionic liquid microemulsion in water. *Food Processing and Preservation Journal*, 16 (2), 53-66.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/fppj.2024.21715.1778
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵۴۴-۲۴۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲۴۲۳

مقایسه روش اولتراسوند و خیساندن برای استخراج رنگدانه آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک میکروامولسیون مایع یونی در آب

پریسا فیضی[۱]، یحیی مقصودلو[۲*]، هدی شهیری طبرستانی[۳]، سیدمهدی جعفری[۴]، امیر بحری[۵]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۲] استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، رایانامه:y.maghsoudlou@gau.ac.ir
[۳] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۴] استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۵] دانشیار، گروه علوم شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاداسلامی، بندرعباس

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

واژه‌های کلیدی:
آستاگزانتین
اولتراسوند
استخراج سبز
آنتی‌اکسیدان طبیعی
ضایعات میگو

چکیده

سابقه و هدف: آستاگزانتین رنگدانه کارتنوئیدی بارنگ نارنجی-قرمز است که به دلیل داشتن اتم‌های کربن، هیدروژن و اکسیژن در ساختار خود، در گروه گزانتوفیل‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این رنگدانه در بین مشتقات اکسیژن دار کاروتنوئیدی بالاترین میزان را دارا است. منابع آستاگزانتین را می‌توان به دو گروه عمده طبیعی و سنتزی تقسیم کرد. بازیابی کارتنوئیدهایی مانند آستاگزانتین از محصولات جانبی جامد میگو و سخت پوستان به دلیل کاربرد آن در صنایع دارویی، شیمیایی، غذایی و خوراک دام، به علت رنگ دهی و خواص آنتی اکسیدانی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرارگرفته است. بنابراین این مطالعه باهدف مقایسه استخراج آستاگزانین از پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک روش سنتی خیساندن و روش اولتراسوند با استفاده از میکروامولسیون مایع یونی در آب انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا پودر نمونه‌ها با استفاده از خشک‌کن انجمادی تهیه شدند. پس از تهیه نمونه‌ها و میکرو امولسیون مایع یونی در آب با نسبت ۵ برابر حلال به نمونه، فرایند استخراج به کمک روش خیساندن در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت و روش اولتراسوند تحت دمای محیط با توان ۶۰ وات و زمان ۳۰ دقیقه انجام شد. آنالیز استخراج آستاگزانتین به کمک اسپکتروفتومتر انجام شد. آزمون‌های مقدار استخراج آستاگزانتین، مقدار کاروتنوئید کل، درصد بازده استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفتند. برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی از روش DPPH استفاده شد.

یافته‌ها: بیشترین میزان آستاگزانتین استخراج شده از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) ۱/۰۹± ۷۶/۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به کمک روش اولتراسوند به دست آمد. بنابراین میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) نسبت به سخت‌پوست گاماروس

(*Pontogammarus maeoticus*) منبع بهتری برای استخراج آستاگزانتین بود. علاوه براین یافته‌ها نشان داد که روش اولتراسوند نسبت به روش خیساندن کارایی بالاتری دارد و بازده استخراج برای میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) با استفاده از روش اولتراسوند و خیساندن به‌ترتیب ۹۵ ٪ و ۵۹ ٪ بود. مقدار کاروتنوئید کل برای میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) به روش خیساندن و اولتراسوند به ترتیب ۱/۳۳±۷۷/۹۸ و ۰/٤٦±۷۹/۷۷ میلی‌لیتر بر گرم بود. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده از روش سنتی بالاتر از روش اولتراسوند بود ازطرف‌دیگر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با افزایش غلظت همواره فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین در هر دو روش پایین‌تر از BHT بود.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی نتایج حاصل از این پژوهش اهمیت ضایعات و روش‌های نوین در استخراج ترکیبات با ارزش را نشان داد. طوری که از بین دو منبع انتخاب شده برای استخراج آستاگزانتین میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) نسبت به سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) منبع بهتری بود. از طرف دیگر یافته‌ها نشان داد که روش اولتراسوند می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی استخراج باشد زیرا عملکرد و کارایی بالاتری داشت.

استناد: فیضی، پریسا؛ مقصودلو، یحیی؛ شهیری طبرستانی، هدی؛ جعفری، سیدمهدی؛ بحری، امیر. (۱٤۰۳). مقایسه روش اولتراسوند و خیساندن برای استخراج رنگدانه آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک میکروامولسیون مایع یونی در آب. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱٦ (۲)، ٦٦-۵۳.

DOI: 10.22069/fppj.2024.21715.1778

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

رنگ، به‌عنوان یکی از مشخصات مهم مواد غذایی، به‌وسیله بینایی درک شده و از نظر پذیرش مصرف‌کننده بسیار مهم است زیرا تقریباً تمام موادغذایی، از هنگامی‌که به‌صورت خام بوده تا زمانی که به غذای کامل تبدیل شوند با یک رنگ قابل‌قبول برای مصرف‌کننده شناخته می‌شوند(۲). رنگ‌ها از متداول‌ترین افزودنی‌های غذایی هستند و تقاضای جهانی جهت استفاده از آن‌ها روبه افزایش است بااین‌وجود، امروزه مصرف‌کنندگان به دلیل آگاهی از اثرات نامطلوب مواد افزودنی سنتزی تمایل بیشتری به مصرف رنگ‌های طبیعی دارند. رنگ‌ها با منشأ طبیعی، برخلاف رنگ‌های سنتزی اثرات آلرژیک، موتاژنیک و سرطان‌زایی نداشته و حتی برخی از آن‌ها ویژگی‌های مفید آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی نیز دارند (۳). آستاگزانتین رنگدانه کارتنوئیدی بارنگ نارنجی-قرمز است که به دلیل داشتن اتم‌های کربن، هیدروژن و اکسیژن در ساختار خود، در گروه گزانتوفیل‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این رنگدانه در بین مشتقات اکسیژن دار کاروتنوئیدی بالاترین میزان را دارا است (٤). بازیابی کارتنوئیدهایی مانند آستاگزانتین از محصولات جانبی جامد میگو به دلیل کاربرد آن در صنایع دارویی، شیمیایی و غذایی و خوراک دام، به علت رنگ دهی و خواص آنتی اکسیدانی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است(۵). این رنگدانه به طور طبیعی به‌صورت ترکیب شده با پروتئین و چربی در پوسته خرچنگ دریایی، میگو و سایر سخت پوستان در رنگ آبی روشن وجود دارد که پس از دناتوره شدن پروتئین طی فرآیند حرارتی آزاد شده و به رنگ صورتی دیده می‌شود. از بین سخت پوستان، گاماروس یک سخت‌پوست ناجورپا و گونه تجاری مهم در برخی کشورها است و غلظت بالای مواد کاروتنوئیدی، پروتئینی، انواع مختلف آنزیم‌ها و اسیدهای چرب ضروری غیراشباع را دارا می‌باشد (٦). برای استخراج آستاگزانتین از حلال‌ها، اسیدها، روغن‌های خوراکی، روش‌های آنزیمی، ماکروویو، اولتراسوند، سیالات فوق بحرانی، مایعات یونی، سوکسله، تخمیر میکروبی، فرایند فشار بالا، میدان مغناطیسی و غیره استفاده می‌شود (۷). از طرفی، عوامل متعددی می‌تواند استخراج رنگدانه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد که شامل ویژگی‌های رنگدانه هدف، نوع ماتریس نمونه، فناوری‌های موجود و هزینه روش مورد نظر می‌باشد (۸). در سال‌های اخیر در جهت کاهش اثرات حلال‌های فرار و سمی، از مایعات یونی[1] آب‌دوست به‌عنوان حلال پخش‌کننده و مایعات یونی آب‌گریز به‌عنوان حلال استخراج کننده استفاده شده است. مایع یونی یک نمک در حالت مایع است که به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی قابل تنظیم، پایداری شیمیایی و حرارتی بالا و فشار بخار ناچیز در دمای اتاق، ازجمله حلال های سبز در نظر گرفته شده و دارای ساختار مولکولی متشکل از کاتیون‌ها و آنیون‌های مختلف است (۹). بااین‌حال، ویسکوزیته اکثر مایعات یونی بیشتر از حلال‌های آلی است که در نتیجه منجر به کاهش نرخ انتقال جرم می‌شود. میکرو امولسیون روشی امیدوارکننده است که امکان استخراج انتخابی بیومولکول‌ها را در صنایع غذایی و شیمیایی فراهم می‌کند (۱۰). ازلحاظ تعریف، امولسیون یک سامانه نامتجانس از دو مایع غیرقابل‌امتزاج است که در چنین سامانه‌ای یکی از مایع‌ها در مایع دیگر به‌صورت قطره‌هایی با قطر بیش از ۰/۱ میکرون پراکنده می‌شود. در سامانه‌های غذایی این دو مایع اغلب روغن و آب هستند؛ در صورت پراکنده شدن قطرات روغن در فاز آب (به‌عنوان فاز پیوسته) امولسیون از نوع روغن در آب (O/W) تشکیل می شود و اگر قطرات آب در روغن

1. Ionic liquids

پراکنده شوند، امولسیون از نوع آب در روغن (W/O) خواهد بود، درحالی‌که میکرو امولسیون‌ها نوعی سامانه امولسیونی هستند که برخلاف امولسیون‌ها از لحاظ ترمودینامیکی پایدارند و اندازه فاز پراکنده در آن‌ها حدود ۱۰۰-۱۰ نانومتر است. اصولاً برای تهیه یک سامانه میکرو امولسیونی به سه جزء اساسی شامل آب، روغن و سورفاکتانت (معمولاً همراه با یک کوسورفاکتانت) نیاز است؛ با مخلوط کردن نسبت‌های مناسب از این اجزاء، سامانه میکرو امولسیون به‌خودی‌خود شکل می‌گیرد. درنتیجه، میکرو امولسیون‌ها سامانه‌هایی با ظاهری شفاف، با گرانروی کم و بسیار پایدارند و برخلاف امولسیون‌ها، با مصرف مقدار بسیار کم انرژی یا بدون مصرف انرژی شکل می‌گیرند(۱). میکروامولسیون‌ها ویژگی‌های مطلوبی ازجمله پایداری ترمودینامیکی، ویسکوزیته کم و ظرفیت انحلال پذیری زیاد برای ترکیبات آب دوست و چربی دوست را دارند (۱۱). تا به امروز، از میکرو امولسیون‌ها برای استخراج پروتئین‌ها، رنگ‌دانه‌ها و عناصر کمیاب استفاده کرده‌اند. ازطرف‌دیگر، استفاده از امواج فراصوت، با ویژگی مصرف انرژی کم، جهت کاهش هزینه عملیات، فرآوری در مقیاس بزرگ و افزایش میزان استخراج مفید می‌باشد. اصل استفاده از امواج فراصوت به دلیل نیروی برشی بالا ناشی از حباب‌های کاویتاسیون امواج فراصوت همراه با برش مکانیکی است که استخراج مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و کاروتنوئیدها را به مقدار زیاد افزایش می‌دهد(۱۲). در همین راستا، Gao و همکاران در سال ۲۰۲۰، به استخراج آستاگزانتین از ضایعات میگو با استفاده از امواج اولتراسوند و میکرو امولسیون مایع یونی پرداختند. میکرو امولسیون حاوی تری بوتیل اوکتیل فسفونیوم بروماید، باعث افزایش قابل‌توجه استخراج آستاگزانتین به دلیل برهمکنش‌های الکترواستاتیک قوی‌تر و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی شد. در این روش ترکیب استخراج با امواج اولتراسونیک (۵۰ وات، ۶۰ دقیقه) و استفاده از میکروامولسیون مایع یونی تری بوتیل اوکتیل فسفونیوم بروماید در آب، نتایج راندمان استخراج خوبی برای آستاگزانتین به دست آورد که حاکی از این واقعیت است که میکرو امولسیون‌های مبتنی بر مایعات یونی، جایگزین مناسبی برای حلال‌های مرسوم در استخراج و بازیابی این رنگدانه طبیعی هستند (۱۳). در همین راستا، Sharayei و همکارانش در سال ۲۰۲۱، از امواج اولتراسوند برای بهینه‌سازی کارایی استخراج آستاگزانتین از پوسته میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* استفاده کردند. آستاگزانتین با استفاده از حلال‌های غیر قطبی/قطبی (پترولیوم اتر، ان-هگزان، اتانول، استون) به‌طور جداگانه و در مخلوط‌های سه‌تایی اتر، استون، آب به نسبت‌های ۱۵:۵۰:۳۵، ۵:۴۵:۵۰ و ۱۰:۷۵:۱۵ در زمان‌های مختلف (۲، ۴ و ۶ ساعت) استخراج شد. نتایج نشان داد که حلال‌هایی با قطبیت بالاتر برای استخراج آستاگزانتین مناسب‌تر بودند و افزایش زمان استخراج از ۲ به ۶ ساعت باعث بهبود عملکرد استخراج شد(۱۴). بررسی سایر مطالعات انجام شده نشان داد که از میکرو امولسیون‌ها برای استخراج سایر رنگ‌دانه‌ها نیز استفاده می‌شود. Qin و همکارانش در سال ۲۰۲۲، از ترکیب روش استخراج به کمک میکرو امولسیون و تخلیه الکتریکی ولتاژ بالا برای استخراج رنگ‌دانه‌های طبیعی نفتوکینون از پوسته سبز گردو و به حداکثر رساندن ارزش این محصول جانبی کشاورزی پرداختند. ابتدا از بین ۱۷ میکرو امولسیون تهیه شده با نسبت‌های مختلف، فرمولاسیون بهینه برای استخراج رنگ‌دانه‌ها انتخاب شد. بالاترین بازده نفتوکینون ۶۷/۱ ± ۰/۳ میکروگرم بر گرم گزارش شد. بنابراین ترکیب دو روش پیشنهادی ذکر شده باعث افزایش راندمان استخراج ۱/۵۲ برابری رنگدانه شد

(۱۵). با توجه به نتایج برتر استخراج آستاگزانتین در روش خیساندن توسط میکرو امولسیون مایع یونی بین حلال‌های (اتانول، اتانول: اتیل استات(۱:۲)، روغن آفتابگردان و میکرو امولسیون مایع یونی) (۱). این مطالعه باهدف مقایسه روش سنتی خیساندن به کمک حلال میکرو امولسیون مایع یونی در آب با روش دستگاهی التراسوند انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با تأیید نوع گونه از پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس تهیه شدند. رنگدانه آستاگزانتین تجاری با خلوص >۹۸٪، DPPH و BHT[1] از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. پروپانول با درجه تجزیه‌ای HPLC و مایع یونی تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید[2] (p٤٤٨)Br) و تریتون ایکس ۱۰۰[3] با خلوص >۹۹ درصد و نرمال بوتانول با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند. کلیه آزمایش‌ها در معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان انجام گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها: پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با آب مقطر به‌خوبی شسته شدند و در خشک‌کن انجمادی (LD freeze dryer ،Christ-Alpha، آلمان)، در ۵۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت خشک و سپس پودر شدند. پودرهای حاصل با الک آزمایشگاهی دارای مش کوچک‌تر از ۱۵ میکرومتر الک شده و در یخچال نگهداری شدند (۱۳).

آماده‌سازی حلال: حلال مورد استفاده میکرو امولسیون مایع یونی در آب است که با توجه به تشکیل خود به خودی میکرو امولسیون بدون صرف انرژی و فقط با هم زدن به روش زیر تهیه شد(۱۳): تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید: تریتون ایکس ۱۰۰- نرمال بوتانول (با نسبت ۳ به ۱ تریتون ایکس ۱۰۰ به نرمال بوتانول): آب، به ترتیب با نسبت‌های جرمی۰/۱۳: ۰/۲۵: ۰/٦۲ مخلوط شدند. این ترکیبات فاز غیر قطبی، سورفاکتانت-کمک سورفاکتانت و فاز قطبی میکرو امولسیون را شامل می‌شوند. این حلال در دمای اتاق قابل نگهداری است.

نحوه استخراج در روش سنتی و استخراج با اولتراسوند: برای استخراج آستاگزانتین به روش سنتی، حلال میکرو امولسیون مایع یونی در آب در دمای محیط به نسب ۵ برابر با پودر نمونه‌ها مخلوط شد و به مدت ٢٤ ساعت تحت روش خیساندن در دمای محیط قرار گرفت. استخراج در حمام اولتراسوند (Sono، سوئیس) با فرکانس ٤٠ کیلوهرتز و دمای ٤١/١ درجه سانتی‌گراد در نسبت ۵ برابر حلال به نمونه، توان ٦٠ وات و زمان ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس مخلوط حاصله به مدت ۱۰ دقیقه با ۸۵۰۰ دور در دقیقه تحت دمای محیط سانتریفیوژ (سانتریفیوژ یخچال‌دار (Eppendorf، آلمان) شد، قسمت بالایی نمونه را جدا کرده و قسمت ته‌نشین شده به شیوه قبل مجدداً تحت استخراج قرار گرفت(جهت در نظر گرفتن بقایای احتمالی ته‌نشین شده) و پس از سانتریفیوژ، بخش بالایی آن با مقدار قبل ترکیب شده و با فیلتر ۰/٤۵ میکرومتری فیلتر شد تا برای آنالیز آماده گردد (١٦).

آزمون‌ها: ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل): محتوای کاروتنوئید کل با استفاده از اندازه‌گیری‌های اسپکتروفتومتری طبق روش گزارش شده توسط Haque و همکاران (٢٠١٦) تعیین

1. Butylated hydroxytoluene
2. Tributyloctylphosphonium Bromide
3. Triton X-100

شد. جهت تعیین محتوای کل کاروتنوئیدها، جذب ٤ میلی‌لیتر از محلول‌های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر[1] (دستگاه اسپکتوفتومتر UV-Vis (Shimadzu، ژاپن) در طول‌موج ٤٥٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و از ضریب خاموشی ویژه آستاگزانتین 2100 استفاده شد. براساس مطالعات پیشین انجام شده در این رابطه، محتوای کاروتنوئید کل در این طول‌موج، آستاگزانتین کل در نظر گرفته شد. بازده محتوای‌آستاگزانتین کل[2] (TAC) با استفاده از معادله (۱) برآورد شد که در آن، V حجم (ml) حلال مورد استفاده A جذب و W وزن خشک (gr) ماده مورد نظر در حلال تعیین شد (۱۷).

معادله (۱) $$TAC = \frac{V \times A \times ۱۰۰}{۲۱ \times W}$$

آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر: منحنی استاندارد آستاگزانتین با تهیه رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص در غلظت‌های ۰-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با استفاده از ۲-پروپانول به‌عنوان حلال رنگدانه خالص آستاگزانتین رسم گردید. جذب آستاگزانتین عصاره‌ها در طول‌موج ٤٧٨ نانومتر ($OD_{٤٧٨}$) دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS اندازه‌گیری و در سه تکرار ثبت شد. میزان آستاگزانتین عصاره‌ها با استفاده از معادله (۲) محاسبه گردید. در این فرمول C مربوط به غلظت آستاگزانتین در ۲-پروپانول است(۱۸).

معادله (۲) $$C(mg/ml) = \frac{OD_{478}}{1.97}$$

معادله (۳) $$y = 1.97X$$

محاسبه درصد بازیافت آستاگزانتین: برای این منظور عصاره‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصدآستاگزانتین استخراج شده تحت هریک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل نمونه (با توجه به توضیحات در بخش ۲-۵-۱) طبق معادله (٤) حاصل شد (۱۹).

معادله (٤) $$\text{٪بازیابی} = \frac{\text{عصاره آستاگزانتین}}{\text{آستاگزانتین کل}} \times ۱۰۰$$

فعالیت مهار رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH): آستاگزانتین‌های استخراج شده را در یخچال نگهداری کرده تا جهت بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین مورد استفاده قرار گیرند. محلول اتانولی DPPH در غلظت ۰/۲ میلی مولار تهیه شد. ۲ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها با ۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH ترکیب شدند. جذب نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط و شرایط تاریکی در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت مهار رادیکال DPPH بر اساس معادله (۵) محاسبه شد. این آزمون باقابلیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT به‌عنوان شاهد در غلظت‌های مشابه مقایسه شد(۲۰).

معادله (۵)

$$\text{٪فعالیت مهار رادیکال DPPH} = \left[A0 - \left(A - \frac{Ab}{A0}\right)\right] \times 100$$

A_0: جذب محلول DPPH بدون نمونه

A: جذب نمونه مخلوط با محلول DPPH

A_b: جذب نمونه بدون محلول DPPH

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به‌صورت تصادفی با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (one-wayANOVA) در سطح خطای ۰/۰۵ با نرم‌افزار SPSS 26.0 انجام گرفت. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. رسم نمودارها در نرم افزار Excel.2010 انجام شد. تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل): نتایج مربوط به محتوای کل کارتنوئید

1. Spectrophotometr
2. Total astaxanthin content

(آستاگزانتین کل) استخراج شده از نمونه‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با استفاده از روش‌های استخراج سنتی (خیساندن) و اولتراسوند به کمک میکرو امولسیون مایع یونی در آب (نسبت ۵ برابر حلال به نمونه) در جدول ۱، نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده از جدول ۱، میزان کل کارتنوئید استخراج شده از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در روش اولتراسوند بالاتر از روش سنتی خیساندن می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که محتوای کل کاروتنوئید استخراج شده از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) در هر دو روش بیشتر از سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. Chemat و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند که امواج اولتراسوند، مراحل فرایند استخراج ترکیبات گیاهی یعنی تورم بافت به‌منظور جذب حلال و نیز خروج ترکیبات از بافت به حلال را از طریق ایجاد تخلخل و منافذ در دیواره سلول‌ها بهبود می‌بخشند و انتقال جرم را تسهیل و تسریع می‌کنند. همچنین برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت‌زمان کوتاه شده و عصاره‌ی گیاهی در طول دیواره سلولی انتشار می‌یابد (۲۱). نتایج حاصل از پژوهش حاضر با این گزارش مطابقت دارد. در راستای همین پژوهش Gao و همکاران در سال ۲۰۲۰، به استخراج آستاگزانتین از ضایعات میگو با استفاده از اولتراسوند و حلال میکرو امولسیون مایع یونی پرداختند. نتایج نشان داد که میزان استخراج کارتنوئید کل به دلیل برهمکنش‌های الکترواستاتیک قوی‌تر و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی با استفاده از میکرو امولسیون مایع یونی به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (۱۳). Bi و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از مایعات یونی و روش اولتراسوند آستاگزانتین را از ضایعات میگو استخراج نمودند. نتایج نشان داد که میزان آستاگزانتین استخراج‌شده به ۹۸ درصد رسید و نسبت به روش معمولی افزایش یافت(۲۲). این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.

جدول ۱- محتوای کل کارتنوئیدها (میلی‌لیتر بر گرم) در سخت‌پوست گاماروس و میگوی موزی با استفاده از خیساندن (روش سنتی) و اولتراسوند

Table 1. The content of total carotenoids (ml/g) in *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* using soaking (traditional method) and ultrasound

روش استخراج Extraction method	میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis*	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus*
	5	5
خیساندن	77.98 ± 1.33^{bA}	74.07 ± 0.67^{bB}
اولتراسوند	79.77 ± 0.46^{aA}	76.26 ± 1.62^{aB}

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار(n=3) گزارش شده‌اند. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین روش‌ها است (p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) در نمونه ها است.

Data are reported as mean±standard deviation (n=3).Small dissimilar letters in each column indicate a significant difference between the methods ($p<0.05$). Capital letters in each row indicate a significant difference ($p<0.05$) in the samples.

آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر: در پژوهش حاضر برای محاسبه منحنی استاندارد از رگرسیون خطی جهت به دست آوردن معادله خط استفاده شد. ضرایب تعیین(R^2) مقدار (۰/۹۹۵۲) خطی بودن

مطلوب را در محدوده انتخاب شده برای آستاگزانتین نشان می‌دهد. نتایج حاصل از استخراج آستاگزانتین با استفاده از روش سنتی خیساندن و اولتراسوند به کمک میکرو امولسیون مایع یونی در آب در جدول ۲، نشان داده شده است. طبق نتایج آستاگزانتین موجود در میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) در هردو روش بالاتر از آستاگزانتین موجود در سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. علاوه براین نتایج نشان می‌دهد که روش اولتراسوند بهتر از روش سنتی می‌باشد. در همین راستا، Sharayei و همکارانش در سال ۲۰۲۱، از امواج اولتراسوند برای بهینه‌سازی کارایی استخراج آستاگزانتین از پوسته میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* استفاده کردند. نتایج نشان داد که با استفاده از امواج اولتراسوند میزان استخراج آستاگزانتین افزایش می‌یابد (۱۴). Zhang و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه‌ای بر روی استخراج آستاگزانتین از محصولات جانبی میگو با استفاده از حلال یوتکتیک عمیق و امواج فراصوت انجام دادند. نتایج استخراج با استفاده از حلال یوتکتیک نشان داد که آستاگزانتین به‌دست‌آمده از پوسته میگو با افزایش زمان فراصوت افزایش یافت(۲۳). بنابراین استفاده از امواج اولتراسوند به‌عنوان یک روش مؤثر در استخراج آستاگزانتین می‌تواند استفاده شود.

جدول ۲- آستاگزانتین استخراج شده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از سخت‌پوست گاماروس و میگوی موزی با استفاده از خیساندن (روش سنتی) و اولتراسوند

Table 2. Astaxantin extracted (mg/ml) from *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* using soaking (traditional method) and ultrasound

روش استخراج Extraction method	میگوی موزی *Fenneropenaeus* merguiensis	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus*
	5	5
خیساندن	54.22 ± 0.91^{bA}	36.39 ± 1.35^{bB}
اولتراسوند	76.30 ± 1.09^{aA}	68.14 ± 0.48^{aB}

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده‌اند. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین روش‌ها است($p<۰/۰۵$). حروف بزرگ در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در نمونه ها است.

Data are reported as mean±standard deviation (n=3). Small dissimilar letters in each column indicate a significant difference between the methods ($p<0.05$). Capital letters in each row indicate a significant difference ($p<0.05$) in the samples.

درصد بازیافت آستاگزانتین: درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصدآستاگزانتین استخراج شده تحت هریک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل نمونه (TAC) با توجه به معادله ٤، به دست آمد و نتایج حاصل از درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با استفاده از روش سنتی خیساندن و روش اولتراسوند در جدول ۳، نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده درصد بازیافت آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) بالاتر از سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. علاوه براین بازده استخراج آستاگزانتین در روش اولتراسوند بالاتر از روش خیساندن می‌باشد. این نتایج کارایی بالای روش اولتراسوند در استخراج آستاگزانتین و افزایش بازده استخراج در مقایسه با روش سنتی را نشان می‌دهد. Khoo و همکاران (۲۰۲۱) از مایعات یونی به‌عنوان یک حلال مطلوب برای نفوذ به دیواره سلولی جلبک

H. pluvialis جهت استخراج آستاگزانین استفاده نمودند. نتایج نشان داد که استفاده از مایعات یونی باعث افزایش بازده استخراج آستاگزانتین می‌شود (۲٤). در مطالعه مشابهی Qin و همکاران (۲۰۲۲)، از ترکیب روش استخراج به کمک میکرو امولسیون و تخلیه الکتریکی ولتاژ بالا برای استخراج رنگدانه‌های طبیعی نفتوکینون از پوسته سبز گردو و به حداکثر رساندن ارزش این محصول جانبی کشاورزی پرداختند. نتایج نشان داد ترکیب دو روش پیشنهادی ذکر شده باعث افزایش راندمان استخراج ۱/۵۲ برابری رنگدانه می‌شود (۱۵). Lee و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بررسی امکان استخراج آستاگزانتین در دمای اتاق از *Haematococcus lacustris* با ساختار دیواره سلولی ضخیم و پیچیده، با استفاده از ترکیب نانوصفحه‌های آلفا-کوارتز فوق نازک با مایع یونی مبتنی بر اتیلن-۳-متیل ایمیدازولیوم پرداختند. استخراج آستاگزانتین با استفاده از چهار نوع مختلف مایع یونی بر پایه اتیلن-۳-متیل ایمیدازولیوم با آنیون‌های تیوسیانات، دی اتیل فسفات، هیدروژن سولفات و کلر بر روی کیست‌های ۹۰ روزه جلبک در دمای اتاق (۲۸ درجه سانتیگراد) انجام شد و راندمان استخراج به‌اندازه ۱٤/۲-۹/٦ ٪ پایین بود. درحالی‌که استفاده از امواج اولتراسوند و نانوصفحه‌های آلفا-کوارتز، سبب تخریب دیواره سلولی کیست‌ها در مدت‌زمان کوتاه (۵ دقیقه) شد و راندمان استخراج آستاگزانتین به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نانوصفحه‌های آلفا-کوارتز و فناوری التراسونیک می‌توانند به‌عنوان عوامل قوی تخریب کننده دیواره سلولی برای استخراج آستاگزانتین به‌واسطه مایعات یونی، در دمای اتاق، از سلول‌های جلبک عمل کنند(۲۵). zou و همکاران (۲۰۱۳) استخراج آستاگزانتین به کمک اولتراسوند از هماتوکوکوس پلویالیس را مطالعه کردند. نتایج نشان داد که استفاده از امواج فراصوت باعث کاهش زمان استخراج و افزایش درصد بازیافت آستاگزانتین می‌شود(۲٦). بنابراین نتایج حاصل از این پژوهش را تأیید می‌نمایند.

جدول ۳- درصد بازیافت آستاگزانتین از سخت‌پوست گاماروس و میگوی موزی با استفاده از خیساندن (روش سنتی) و اولتراسوند

Table 3. Astaxanthin recovery percentage from *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* using soaking (traditional method) and ultrasound

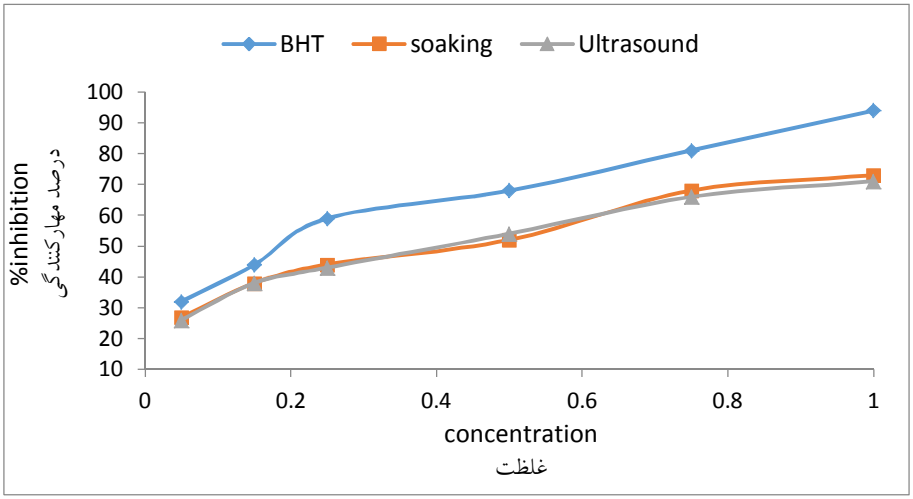
روش استخراج Extraction method	میگوی موزی *Fenneropenaeus* merguiensis	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus*
	5	5
خیساندن	59.23 ± 0.41^{bA}	46.00 ± 1.00^{bB}
اولتراسوند	95.33 ± 0.57^{aA}	89.33 ± 1.00^{aB}

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده‌اند. حروف غیرمشابه کوچک در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین روش‌ها است (p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) در نمونه ها است.

Data are reported as mean±standard deviation (n=3). Small dissimilar letters in each column indicate a significant difference between the methods ($p<0.05$). .Capital letters in each row indicate a significant difference ($p<0.05$) in the samples.

فعالیت مهار رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH): آستاگزانتین به دلیل ساختمان مولکولی، خواص شیمیایی بسیار خاصی داشته و نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد و فلزات سنگین دارد. حضور قسمت‌های کتو بر روی حلقه یونی مسئول خواص آنتی‌اکسیدانی بالا این ترکیب می‌باشد. آستاگزانتین هم در قسمت زنجیره کنژوگه غیراشباع (پلی-انی) و هم در قسمت حلقه‌های ترمینال (حلقه-

های C3) رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازد(۲۷). فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین‌های استخراج شده با روش اولتراسوند و روش سنتی در مقایسه با فعالیت آنتی اکسیدانی BHT با استفاده از DPPH اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH توسط آستاگزانتین و BHT در شکل ۱، نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده با استفاده از روش سنتی خیساندن بالاتر از روش اولتراسوند می‌باشد که علت آن را می‌توان به دمای بالاتر فرایند استخراج در روش اولتراسوند و پدیده کاویتاسیون و آسیب‌های ناشی از آن در مقایسه با روش خیساندن نسبت داد. علاوه براین فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده در هر دو روش پایین‌تر از فعالیت آنتی اکسیدانی BHT می‌باشد.



شکل ۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH آستاگزانتین استخراج شده با روش خیساندن و اولتراسوند در مقایسه با BHT

Figure 1. DPPH radical scavenging activity of astaxanthin extracted by soaking and ultrasound compared to BHT.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که در استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس(*Pontogammarus maeoticus*)، میگوی موزی به‌عنوان منبع با بالاترین میزان آستاگزانتین استخراجی می‌باشد. علاوه براین مقایسه دو روش استخراج خیساندن و اولتراسوند برای استخراج آستاگزانتین نشان داد که روش اولتراسوند نسبت به روش خیساندن روش کارآمدتری می‌باشد و بازده استخراج آستاگزانتین را به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. بنابراین می‌تواند یک روش جایگزین مناسب برای روش سنتی استخراج باشد. همچنین نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط دو روش مورد استفاده در این آزمون در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT نشان داد که با افزایش غلظت آستاگزانتین فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد اما این افزایش همواره کمتر از BHT بود. ازطرف دیگر در بین آستاگزانتین‌های استخراج شده توسط روش‌های ذکر شده آستاگزانتین استخراجی توسط روش خیساندن بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت که علت آن را می‌توان به حفاظت بهتر رنگدانه و عدم آسیب در روش خیساندن نسبت داد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم غذا و داروی هرمزگان که ما را در انجام این پژوهش رساله دکترا یاری دادند کمال تشکر را داریم.

References

۱. فیضی، پریسا، مقصودلو، یحیی، شهیری طبرستانی، هدی، جعفری، سیدمهدی و بحری، امیر. (۱۴۰۲). مقایسه استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک حلال آلی، روغن آفتابگردان و میکروامولسیون مایع یونی در آب، *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*.

2. Poorniammal, R., Prabhu, S., Dufossé, L., & Kannan, J. (2021). Safety evaluation of fungal pigments for food applications. Journal of Fungi, 7(9), 692.
3. Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. LWT-Food Science and Technology, 64(2), 645-649.
4. Stachowiak, B., &Szulc, P. (2021). Astaxanthin for the food industry. Molecules, 26(9), 2666.
5. Oslan, S. N. H., Tan, J.S., Oslan, S.N., Matanjun, P., Mokhtar, R.A.M., Shapawi, R., & Huda, N. (2021). Haematococcuspluvialis as a potential source of astaxanthin with diverse applications in industrial sectors: Current research and future directions. Molecules, 26(21), 6470.
6. Escobar-Lux, R.H., Parsons, A.E., Samuelsen, O.B. & Agnalt, A-L. 2020. Short-term exposure to hydrogen peroxide induces mortality and alters exploratory behaviour of European lobster (Homarus gammarus). Ecotoxicology and Environmental Safety. 204: 111111.
7. Sitko, R., Zawisza, B., &Malicka, E. (2013). Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 51, 33-43.
8. Pagels, F., Pereira, R.N., Vicente, A.A., & Guedes, A.C. (2021). Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria—A review on current methodologies. Applied Sciences, 11(11), 5187.
9. Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from Haematococcuspluvialis. Bioresource technology, 288, 121606.
10. Amiri-Rigi, A. and Abbasi, S. 2019. Extraction of lycopene using a lecithin-based olive oil microemulsion. Food Chemistry. 272: 568-573.
11. Amiri-Rigi, A., Abbasi, S., &Emmambux, M. N. (2022). Background, limitations, and future perspectives in food grade microemulsions and nanoemulsions. Food Reviews International, 1-39.
12. Gao, J., Fang, C.L., Lin, Y. Z., Nie, F. H., Ji, H. W. & Liu, S. C. 2020. Enhanced extraction of astaxanthin using aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and potassium phosphate. Food Chemistry. 309: 125672.
13. 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
14. 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.
15. Qin, D., Xiang, B., Zhou, X., Qiu, S., & Xi, J. (2022). Microemulsion as solvent for naphthoquinones extraction from walnut (Juglans mandshurica Maxim) green husk using high voltage electrical discharge. Separation and Purification Technology, 281, 119983.
16. Parjikolaei, B. R., Errico, M., El-Houri, R. B., Christensen, K. V., & Fretté, X. C. (2016). Green Approaches to Extract Astaxanthin from Shrimp Waste: Process Design and

Economic Evaluation. In Computer Aided Chemical Engineering (Vol. 38, pp. 649-654): Elsevier.
17. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y. W. (2016). Intensified green production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Food and BioproductsProcessing, 99, 1-11 .
18. Khoo, K. S., Chew, K. W., Yew, G. Y., Manickam, S., Ooi, C. W., & Show, P. L. (2020). Integrated ultrasound-assisted liquid biphasicflotation for efficient extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Ultrasonics sonochemistry, 67, 105052 .
19. Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., Pavasant, P., Ruen-ngam, D., Shotipruk, A. and Pavasant, P. 2010. Comparison of Extraction Methods for Recovery of Astaxanthin from Haematococcuspluvialis. Separation Science and Technology. 46(1): 64-70.
20. Zhao, X., Zhang, X., Fu, L., Zhu, H., & Zhang, B. (2016). Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Food and Bioproducts Processing, 99, 197-203. doi:https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.05.007
21. Chemat, F., Vian, M. A., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Jambrak, A. R., Munekata, P. E., ... &Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. Green Chemistry, 22(8), 2325-2353.
22. Khoo, K. S., Ooi, C. W., Chew, K. W., Foo, S. C., Lim, J. W., Tao, Y., ... & Show, P. L. (2021). Permeabilization of Haematococcuspluvialis and solid-liquid extraction of astaxanthin by CO2-based alkyl carbamate ionic liquids. Chemical Engineering Journal, 411, 128510.
23. Bi, W., Tian, M., Zhou, J., & Row, K. H. (2010). Task-specific ionic liquid-assisted extraction and separation of astaxanthin from shrimp waste. Journal of Chromatography B, 878(24), 2243–2248. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.06.034.
24. Zhang, Y., Liu, Z., Li, Y., & Chi, R. (2014). Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of isoflavones from Radix puerariae by response surface methodology. Separation and Purification Technology, 129, 71-79. https://doi.org/10.1016/j.seppur. 2014.03.022.
25. Lee, N., Narasimhan, A. L., Moon, G., Kim, Y. E., Park, M., Kim, B., ... & Oh, Y. K. (2022). Room-Temperature Cell Disruption and Astaxanthin Recovery from Haematococcuslacustris Cysts Using Ultrathin α-Quartz Nanoplates and Ionic Liquids. Applied Sciences, 12(4), 2210.
26. Zou, T. B., Jia, Q., Li, H. W., Wang, C. X., & Wu, H. F. (2013). Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Marine drugs, 11(5), 1644-1655. https://doi.org/10.3390/md11051644.
27. Kishimoto, Y., Tani, M., Uto-Kondo, H., Iizuka, M., Saita, E., Sone, H., . . . Kondo, K. (2010). Astaxanthin suppresses scavenger receptor expression and matrix metalloproteinase activity in macrophages. European Journal of Nutrition, 49(2), 119-126. doi:10.1007/s00394-009-0056-4