

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

Parisa Feizi¹, Yahya Maghsoudlou^{2*}, Hoda Shahiri Tabarestani³,
Seyed Mahdi Jafari⁴, Amir Bahri⁵

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 merguensis*) 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 merguensis*), yielding a maximum amount of 76.30 ± 1.09 mg/ml. This result highlighted shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) 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 merguensis*) calculated at 95% and 59%, respectively. The total carotenoid content for shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) 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 merguensis*) 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 merguensis*) 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 merguensis*) 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

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 شهری 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.maghsoodlou@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 آزاد اسلامی، بندرعباس

اطلاعات مقاله چکیده

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

آنتی اکسیدان طبیعی

ضایعات میگو

سابقه و هدف: آستاگزانتین رنگدانه کاروتنوئیدی بارنگ نارنجی-قرمز است که به دلیل داشتن اتم‌های کربن، هیدروژن و اکسیژن در ساختار خود، در گروه گرانوفیل‌ها 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 کاروتنوئیدهایی 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 قرار گرفته است. بنابراین این مطالعه باهدف مقایسه استخراج آستاگزانتین 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 میکروامولسیون 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*) $1/09 \pm 76/30$ 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 بر این یافته‌ها نشان داد که روش اولتراسوند نسبت به روش خیساندن کارایی بالاتری دارد و بازده استخراج برای میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) با استفاده از روش اولتراسوند و خیساندن به ترتیب ۹۵٪ و ۵۹٪ بود. مقدار کاروتنوئید کل برای میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) به روش خیساندن و اولتراسوند به ترتیب $77/98 \pm 1/33$ و $79/77 \pm 0/46$ میلی‌لیتر بر گرم بود. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده از روش سنتی بالاتر از روش اولتراسوند بود از طرف دیگر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT با افزایش غلظت همواره فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین در هر دو روش پایین‌تر از BHT بود.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی 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 merguensis*) 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؛ شهری طبرستانی، هدی؛ جعفری، سیدمهدی؛ بحری، امیر. (۱۴۰۳). مقایسه روش اولتراسوند و خیساندن برای استخراج رنگدانه آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک میکروامولسیون مایع یونی در آب. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۶ (۲)، ۵۳-۶۶.

DOI: 10.22069/fppj.2024.21715.1778



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

رنگ، به عنوان یکی از مشخصات مهم مواد غذایی، به وسیله بینایی درک شده و از نظر پذیرش مصرف کننده بسیار مهم است زیرا تقریباً تمام مواد غذایی، از هنگامی که به صورت خام بوده تا زمانی که به غذای کامل تبدیل شوند با یک رنگ قابل قبول برای مصرف کننده شناخته می شوند (۲). رنگ ها از متداول ترین افزودنی های غذایی هستند و تقاضای جهانی جهت استفاده از آن ها روبه افزایش است. با این وجود، امروزه مصرف کنندگان به دلیل آگاهی از اثرات نامطلوب مواد افزودنی سنتزی تمایل بیشتری به مصرف رنگ های طبیعی دارند. رنگ ها با منشأ طبیعی، برخلاف رنگ های سنتزی اثرات آلرژیک، موتاژنیک و سرطان زایی نداشته و حتی برخی از آن ها ویژگی های مفید آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی نیز دارند (۳). آستاگزانتین رنگدانه کاروتنوئیدی با رنگ نارنجی-قرمز است که به دلیل داشتن اتم های کرین، هیدروژن و اکسیژن در ساختار خود، در گروه گزانتوفیل ها طبقه بندی می شود. این رنگدانه در بین مشتقات اکسیژن دار کاروتنوئیدی بالاترین میزان را دارا است (۴). بازیابی کاروتنوئیدهایی 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 به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۵). این رنگدانه به طور طبیعی به صورت ترکیب شده با پروتئین و چربی در پوسته خرچنگ دریایی، میگو و سایر سخت پوستان در رنگ آبی روشن وجود دارد که پس از دنا توره شدن پروتئین طی فرآیند حرارتی آزاد شده و به رنگ صورتی دیده می شود. از بین سخت پوستان، گاماروس یک سخت پوست ناجورپا و گونه تجاری مهم در برخی کشورها است و غلظت بالای مواد کاروتنوئیدی، پروتئینی، انواع

مختلف آنزیم ها و اسیدهای چرب ضروری غیراشباع را دارا می باشد (۶). برای استخراج آستاگزانتین از حلال ها، اسیدها، روغن های خوراکی، روش های آنزیمی، ماکروویو، اولتراسوند، سیالات فوق بحرانی، مایعات یونی، سوکسله، تخمیر میکروبی، فرایند فشار بالا، میدان مغناطیسی و غیره استفاده می شود (۷). از طرفی، عوامل متعددی می تواند استخراج رنگدانه ها را تحت تأثیر قرار دهد که شامل ویژگی های رنگدانه هدف، نوع ماتریس نمونه، فناوری های موجود و هزینه روش مورد نظر می باشد (۸). در سال های اخیر در جهت کاهش اثرات حلال های فرار و سمی، از مایعات یونی^۱ آب دوست به عنوان حلال پخش کننده و مایعات یونی آب گریز به عنوان 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، از جمله حلال های سبز در نظر گرفته شده و دارای ساختار مولکولی متشکل از کاتیون ها و آنیون های مختلف است (۹). با این حال، ویسکوزیته اکثر مایعات یونی بیشتر از حلال های آلی است که در نتیجه منجر به کاهش نرخ انتقال جرم می شود. میکرو امولسیون روشی امیدوارکننده است که امکان استخراج انتخابی بیومولکول ها را در صنایع غذایی و شیمیایی فراهم می کند (۱۰). از لحاظ تعریف، امولسیون یک سامانه نامتجانس از دو مایع غیر قابل امتزاج است که در چنین سامانه ای یکی از مایع ها در مایع دیگر به صورت قطره هایی با قطر بیش از ۰/۱ میکرون پراکنده می شود. در سامانه های غذایی این دو مایع اغلب روغن و آب هستند؛ در صورت پراکنده شدن قطرات روغن در فاز آب (به عنوان 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، درحالی که میکرو امولسیون ها نوعی سامانه امولسیونی هستند که برخلاف امولسیون ها از لحاظ ترمودینامیکی پایدارند و اندازه فاز پراکنده در آن ها 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 نسبت های مناسب از این اجزاء، سامانه میکرو امولسیون به خودی خود شکل می گیرد. در نتیجه، میکرو امولسیون ها سامانه هایی با ظاهری شفاف، با گرانیوی کم و بسیار پایدارند و برخلاف امولسیون ها، با مصرف مقدار بسیار کم انرژی یا بدون مصرف انرژی شکل می گیرند (۱). میکرو امولسیون ها ویژگی های مطلوبی از جمله پایداری ترمودینامیکی، ویسکوزیته کم و ظرفیت انحلال پذیری زیاد برای ترکیبات آب دوست و چربی دوست را دارند (۱۱). تا به امروز، از میکرو امولسیون ها برای استخراج پروتئین ها، رنگ دانه ها و عناصر کمیاب استفاده کرده اند. از طرف دیگر، استفاده از امواج فراصوت، با ویژگی مصرف انرژی کم، جهت کاهش هزینه عملیات، فرآوری در مقیاس بزرگ و افزایش میزان استخراج مفید می باشد. اصل استفاده از امواج فراصوت به دلیل نیروی برشی بالا ناشی از حباب های کاویتاسیون امواج فراصوت همراه با برش مکانیکی است که استخراج مولکول های زیستی مانند پروتئین ها، لیپیدها و کاروتنوئیدها را به مقدار زیاد افزایش می دهد (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 قابل توجه استخراج آستاگزانتین به دلیل برهمکنش های الکترواستاتیک قوی تر و

برهمکنش های پیوند هیدروژنی شد. در این روش ترکیب استخراج با امواج اولتراسونیک (۵۰ وات، ۶۰ دقیقه) و استفاده از میکرو امولسیون 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 امولسیون های مبتنی بر مایعات یونی، جایگزین مناسبی برای حلال های مرسوم در استخراج و بازیابی این رنگدانه طبیعی هستند (۱۳). در همین راستا، Sharayei و همکارانش در سال ۲۰۲۱، از امواج اولتراسوند برای بهینه سازی کارایی استخراج آستاگزانتین از پوسته میگوی ببری سبز *Penaeus semisulcatus* استفاده کردند. آستاگزانتین با استفاده از حلال های غیر قطبی/قطبی (پترولیوم اتر، ان-هگزان، اتانول، استون) به طور جداگانه و در مخلوط های سه تایی اتر، استون، آب به نسبت های ۱۵:۵۰:۳۵، ۵۰:۴۵:۵ و ۱۵:۷۵:۱۰ در زمان های مختلف (۲، ۴ و ۶ ساعت) استخراج شد. نتایج نشان داد که حلال هایی با قطبیت بالاتر برای استخراج آستاگزانتین مناسب تر 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 امولسیون ها برای استخراج سایر رنگ دانه ها نیز استفاده می شود. Qin و همکارانش در سال ۲۰۲۲، از ترکیب روش استخراج به کمک میکرو امولسیون و تخلیه الکتریکی ولتاژ بالا برای استخراج رنگ دانه های 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 نسبت های مختلف، فرمولاسیون بهینه برای استخراج رنگ دانه ها انتخاب شد. بالاترین بازده نفتوکینون $67/1 \pm 0/3$ میکرو گرم 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 حلال های (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 روش ها

مواد اولیه: میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با تأیید نوع گونه از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس تهیه شدند. رنگدانه آستاگزانتین تجاری با خلوص $>98\%$ DPPH و BHT^۱ از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شدند. پروپانول با درجه تجزیه ای HPLC و مایع یونی تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید^۲ (p4448)Br و تریتون ایکس ۱۰۰^۳ با خلوص $>99\%$ درصد و نرمال بوتانول با خلوص $99/9\%$ درصد از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شدند. کلیه آزمایش ها در معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان انجام گرفت.

آماده سازی نمونه ها: پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با آب مقطر به خوبی شسته شدند و در خشک کن انجمادی (Christ-Alpha، LD freeze dryer، آلمان)، در -50°C درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس پودر شدند. پودرهای حاصل با الک آزمایشگاهی دارای مش کوچک تر از ۱۵ میکرومتر الک شده و در یخچال نگهداری شدند (۱۳).

آماده سازی 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 نسبت های جرمی ۰/۱۳: ۰/۲۵: ۰/۶۲ مخلوط شدند. این ترکیبات فاز غیر قطبی، سورفاکتانت-کمک سورفاکتانت و فاز قطبی میکرو امولسیون را شامل می شوند. 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 نمونه ها مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت روش خیساندن در دمای محیط قرار گرفت. استخراج در حمام اولتراسوند (Sono، سوئیس) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و دمای $41/1^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی گراد در نسبت ۵ برابر حلال به نمونه، توان ۶۰ وات و زمان ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس مخلوط حاصله به مدت ۱۰ دقیقه با 8500 rpm دور در دقیقه تحت دمای محیط سانتریفیوژ (سانتریفیوژ یخچال دار (Eppendorf، آلمان) شد، قسمت بالایی نمونه را جدا کرده و قسمت ته نشین شده به شیوه قبل مجدداً تحت استخراج قرار گرفت (جهت در نظر گرفتن بقایای احتمالی ته نشین شده) و پس از سانتریفیوژ، بخش بالایی آن با مقدار قبل ترکیب شده و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شد تا برای آنالیز آماده گردد (۱۶).

آزمون ها: ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل): محتوای کاروتنوئید کل با استفاده از اندازه گیری های اسپکتروفتومتری طبق روش گزارش شده توسط Haque و همکاران (۲۰۱۶) تعیین

1. Butylated hydroxytoluene
2. Tributyl octyl phosphonium Bromide
3. Triton X-100

مقدار آستاگزانتین کل نمونه (با توجه به توضیحات در بخش ۲-۵-۱) طبق معادله (۴) حاصل شد (۱۹).

$$\text{معادله (۴)} \quad 100 \times \frac{\text{عصاره آستاگزانتین}}{\text{آستاگزانتین کل}} = \text{بازایی}$$

فعالیت مهار رادیکال ۲،۲-دی فیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH): آستاگزانتین‌های استخراج شده را در یخچال نگهداری کرده تا جهت بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی 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 میلی لیتر 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 با قابلیت آنتی اکسیدانی، آنتی اکسیدان سنتزی BHT به عنوان شاهد در غلظت‌های مشابه مقایسه شد (۲۰).

معادله (۵)

$$\text{DPPH} \quad \% \text{ فعالیت مهار رادیکال DPPH} = \left[A_0 - \left(A - \frac{A_b}{A_0} \right) \right] \times 100$$

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 به صورت تصادفی با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA) در سطح خطای ۰/۰۵ با نرم افزار SPSS 26.0 انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ 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 کاروتنوئید

شد. جهت تعیین محتوای کل کاروتنوئیدها، جذب ۴ میلی لیتر از محلول‌های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر^۱ (دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis (Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۴۵۰ 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 طول موج، آستاگزانتین کل در نظر گرفته شد. بازده محتوای آستاگزانتین کل^۲ (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).

$$\text{معادله (۱)} \quad TAC = \frac{V \times A \times 100}{21 \times W}$$

آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر: منحنی استاندارد آستاگزانتین با تهیه رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص در غلظت‌های ۰-۱ میلی گرم بر میلی لیتر با استفاده از ۲-پروپانول به عنوان حلال رنگدانه خالص آستاگزانتین رسم گردید. جذب آستاگزانتین عصاره‌ها در طول موج ۴۷۸ نانومتر (OD_{478}) 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).

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

$$\text{معادله (۳)} \quad y = 1.97X$$

محاسبه درصد بازافت آستاگزانتین: برای این منظور عصاره‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. درصد بازافت آستاگزانتین با محاسبه درصد آستاگزانتین استخراج شده تحت هریک از شرایط استخراج از

1. Spectrophotometr
2. Total astaxanthin content

دیواره سلول‌ها بهبود می‌بخشند و انتقال جرم را تسهیل و تسریع می‌کنند. همچنین برخلاف شیوه‌های مرسوم، امواج صوتی باعث تخریب دیواره سلولی در یک مدت زمان 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.

(آستاگزانتین کل) استخراج شده از نمونه‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) 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 merguensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در روش اولتراسوند بالاتر از روش سنتی خیساندن می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که محتوای کل کارتنوئید استخراج شده از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) 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

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 merguensis* using soaking (traditional method) and ultrasound

روش استخراج Extraction method	میگوی موزی <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	سخت پوست گاماروس <i>Pontogammarus maeoticus</i>
	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 نمونه‌ها 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.

خطی جهت به دست آوردن معادله خط استفاده شد. ضرایب تعیین (R²) مقدار (۰/۹۹۵۲) خطی بودن

آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر: در پژوهش حاضر برای محاسبه منحنی استاندارد از رگرسیون

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.

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 merguensis*) در هردو روش بالاتر از آستاگزانتین موجود در سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. علاوه بر این 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

جدول ۲- آستاگزانتین استخراج شده (میلی گرم بر میلی لیتر) از سخت‌پوست گاماروس و میگوی موزی با استفاده

از خیساندن (روش سنتی) و اولتراسوند

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

روش استخراج Extraction method	میگوی موزی <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	سخت پوست گاماروس <i>Pontogammarus maeoticus</i>
	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<0.05). حروف بزرگ در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری (p<0.05) در نمونه‌ها 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.

آمده درصد بازیافت آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) بالاتر از سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. علاوه بر این 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

درصد بازیافت آستاگزانتین: درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصد آستاگزانتین استخراج شده تحت هریک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل نمونه (TAC) با توجه به معادله ۴، به دست آمد و نتایج حاصل از درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) 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

سولفات و کلر بر روی کیست‌های ۹۰ روزه جلبک در دمای اتاق (۲۸ درجه سانتیگراد) انجام شد و راندمان استخراج به اندازه ۱۴/۲-۹/۶٪ پایین بود. درحالی‌که استفاده از امواج اولتراسوند و نانوصفحه‌های آلفا-کوارتز، سبب تخریب دیواره سلولی کیست‌ها در مدت زمان 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 (۲۶). بنابراین نتایج حاصل از این پژوهش را تأیید می‌نمایند.

H. pluvialis جهت استخراج آستاگزانتین استفاده نمودند. نتایج نشان داد که استفاده از مایعات یونی باعث افزایش بازده استخراج آستاگزانتین می‌شود (۲۴). 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

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 merguensis* using soaking (traditional method) and ultrasound

روش استخراج Extraction method	میگوی موزی <i>Fenneropenaeus merguensis</i>	سخت پوست گاماروس <i>Pontogammarus maeoticus</i>
	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 نمونه‌ها است.

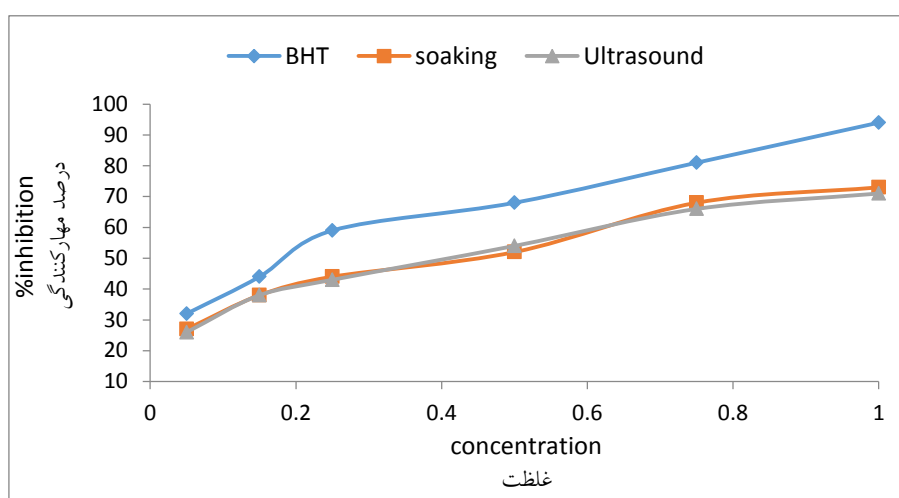
Data are reported as mean±standard deviation (n=3). Small dissimilar letters in each column indicate a significant difference between the methods (p<0.05). Capital letters in each row indicate a significant difference (p<0.05) in the samples.

دارد. حضور قسمت‌های کتو بر روی حلقه یونی مسئول خواص آنتی‌اکسیدانی بالا این ترکیب می‌باشد. آستاگزانتین هم در قسمت زنجیره کتوگه غیراشباع (پلی-انی) و هم در قسمت حلقه‌های ترمینال (حلقه-

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

روش سنتی خیساندن بالاتر از روش اولتراسوند می‌باشد که علت آن را می‌توان به دمای بالاتر فرایند استخراج در روش اولتراسوند و پدیده کایتاسیون 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.

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



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.

برای روش سنتی استخراج باشد. همچنین نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH یا فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط دو روش مورد استفاده در این آزمون در مقایسه با آنتی اکسیدان سنتتیک BHT نشان داد که با افزایش غلظت آستاگزانتین فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد اما این افزایش همواره کمتر از BHT بود. از طرف دیگر در بین آستاگزانتین‌های استخراج شده توسط روش‌های ذکر شده آستاگزانتین استخراجی توسط روش خیساندن بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را داشت که علت آن را می‌توان به حفاظت بهتر رنگدانه و عدم آسیب در روش خیساندن نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که در استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) 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

تشکر و قدردانی

در انجام این پژوهش رساله دکترا یاری دادند کمال

تشکر را داریم.

از معاونت محترم غذا و داروی هرمزگان که ما را

References

۱. فیضی، پریسا، مقصودلو، یحیی، شهیری طبرستانی، هدی، جعفری، سیدمهدی و بحری، امیر. (۱۴۰۲). مقایسه استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguensis*) 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). *Haematococcus pluvialis* 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 *Haematococcus pluvialis*. *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., Fabiano-Tixier, 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. Parjikolaie, 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 Bioprocess Technology*, 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 biphasic flotation 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 *Haematococcus pluvialis*. *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 Bioprocess Technology*, 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., Jembrak, 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 *Haematococcus pluvialis* 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 *Haematococcus lacustris* 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