Comparison Astaxanthin extraction of *Fenneropenaeus merguiensis* and *Pontogammarus maeoticus* by using organic solvent, sunflower oil and ionic liquid micro emulsion

Introduction

Astaxanthin is a widely used carotenoid pigment in the food industry which is extracted from various natural and synthetic sources. Nowadays, due to the adverse effects of organic solvents, the use of green solvents which are non-toxic, non-volatile and environmentally friendly has become common. Therefore, This study focuses on comparison the extraction of astaxanthin under soaking conditions for 24 hours with organic solvent (combination of ethanol with ethyl acetate), green solvent (microemulsion of ionic liquid in water) and vegetable oil (sunflower oil) from shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) and Gammarus (*Pontogammarus maeoticus*) . Ionic liquid microemulsion in water was considered as a new solvent for astaxanthin extraction. Determination of density, conductivity and diameter were the characteristics of microemulsion test. In extraction, solvent to sample ratios of 5x, 12.5x and 20x were used for the sample and compared with the control sample.

Materials and Methods

F. Merguiensis and *P. Maeoticus* With species approval were procured from Persian Gulf Ecology Research Institute (Iran). Commercial astaxanthin(>98 % purity),α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH),and butylated hydroxytoluene (BHT)were procured from Sigma-Aldrich (USA). The HPLC grade ethanol, propanol, ethyl acetate,, tributyl octyl phosphonium bromide, Triton X-100 with purity, and n-butanol were obtained from Merck Chemicals Co. (Germany). Refined sunflower oil which was antioxidant-free ,was also purchased from Hayat company (Iran). The shell of *F. Merguiensis* and *P. Maeoticus* were carefully washed with distilled water, then freeze-dried (Christ-Alpha 1–4, LD freeze dryer, Germany)for 48 h at -50 °C. After sieving the powders with a laboratory sieve with a mesh smaller than 15 µm. The obtained powders were kept at Refrigerator. All the experiments were done in the Food and Drug Administration Department of Hormozgan University of Medical Sciences.

Results and Discussion

The best method and conditions for astaxanthin extraction and the best source for extractionby using solvents and the highest amount of astaxanthin were determined and ratios of solvent to sample 5 times, 12.5 times and 20 times and in order to analyze the results and compare the average SPSS software was used , comparison based on highest amount of extracted astaxanthin was measured with a spectrophotometer. The content of total carotenoids, percentage of astaxanthin recovery, DPPH radical scavenging activity were other tests that were performed to check the extracted astaxanthin. According to the results, the density of the microemulsion was determined in the range of 0.97151 g/cm3, its diameter was 15.8 nanometers and the conductivity was 312 microsiemens at a temperature of 27.1 degrees Celsius. The results of astaxanthin extraction with different solvents in the comparison with control solvent were statistically significant ($p < 0.05$). According to the results obtained from the extraction of astaxanthin from two sourcesof shrimp

and gammarus, shrimp was selected as the source with the highest amount of extracted astaxanthin. The use of green solvent (ionic liquid microemulsion in water) in a 12.5 times ratio of solvent to sample was also chosen as the optimal method. The amount of astaxanthin extracted under optimal conditions was 77.44 ± 1.09 mg/ml. The results of DPPH radical inhibition by astaxanthin extracted using ionic, oily and organic solvent compared to synthetic antioxidant BHT showed that antioxidant activity increases with increasing concentration of astaxanthin, but this increase was always lower than BHT.

Conclusion

In general, the results of this research show that the use of microemulsion based on ionic liquids is a suitable alternative to conventional methods in extracting and recovering astaxanthin from natural biological sources.

Acknowledgement

We are grateful to the Honorable Vice-Chancellor of Hormozgan Food and Drug Administration, who helped us in conducting this doctoral thesis research.

Keywords: Astaxanthin, ionic liquid micro emulsion, Fenneropenaeus merguiensis ,

Pontogammarus maeoticus

نسخه پیش انتشار

مقایسه استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*)و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک حلال آلی، روغن آفتابگردان و میکرواملسیون مایع یونی در آب

پریسا فیضی- یحیی مقصودلو- هدی شهیری طبرستانی- سید مهدی جعفری- امیر بحری

چکیده

آستاگزانتین رنگدانه‌ی کاروتنوئیدی پرکاربرد در صنایع غذایی است که از منابع مختلف طبیعی و سنتزی به روش‌های گوناگون استخراج می‌شود. امروزه باتوجه به اثرات نامطلوب حلال‌های آلی استفاده از حلال‌های سبز رایج شده است. زیرا این حلال‌ها نسبت به حلال‌های آلی دوستدار محیط زیست بوده و ویژگی‌هایی مانند فراریت و سمی بودن را ندارند. بنابراین این پژوهش با هدف استخراج آستاگزانتین تحت شرایط خیساندن به مدت ۲۴ساعت با حلال آلی (مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲))، حلال سبز (میکرواملسیون مایع یونی در آب) و روغن گیاهی (روغن آفتابگردان) از پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) انجام شد. میکرو امولسیون مایع یونی در آب به عنوان حلالی جدید برای استخراج آستاگزانتین در نظر گرفته شد. تعیین چگالی، رسانایی و قطر از جمله ویژگی‌های مورد آزمون میکرواملسیون بودند. بهترین شرایط برای استخراج ،بیشترین میزان آستاگزانتین است که با به کارگیری حلال‌ها و نسبت های حلال به نمونه ۵ برابر، ۱۲/۵ برابر و ۲۰ برابر تعیین شد. میزان آستاگزانتین، کاروتنوئید کل، درصد بازیافت و فعالیت مهار رادیکال DPPH آزمون‌هایی بودند که برای بررسی آستاگزانتین استخراجی انجام شدند. طبق نتایج چگالی میکرواملسیون در محدوده ۰/۹۷۱۵۱ گرم بر سانتی متر مکعب، قطر آن ۱۵/۸ نانومتر و رسانایی ۳۱۲ میکرو زیمنس در دمای ۲۷/۱ درجه سانتی گراد تعیین شد. نتایج حاصل از استخراج آستاگزانتین با حلال‌های مختلف در مقایسه با حلال اتانول بعنوان شاهد از لحاظ آماری معنی دار بود. با توجه به نتایج بدست آمده از استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی و سخت پوست گاماروس، میگوی موزی به عنوان منبع با بالاترین میزان آستاگزانتین استخراجی انتخاب شد. استفاده از حلال سبز(میکرو امولسیون مایع یونی در آب) در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه نیز به عنوان بهترین روش انتخاب شد. مقدار آستاگزانتین استخراج شده در بهترین شرایط ۱/۰۹ ± ۷۷/۴۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH توسط آستاگزانتین استخراج شده به کمک حلال‌های ذکر شده 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 فعالیت آنتی اکسیدانیBHT بود. به طور کلی نتایج حاصل ازاین پژوهش نشان داد که استفاده از میکرواملسیون مبتنی برمایع یونی جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم دراستخراج و بازیابی آستاگزانتین ازمنابع زیستی طبیعی است.

کلمات کلیدی: آستاگزانتین، میکرو امولسیون مایع یونی، میگوی موزی، سخت پوست گاماروس

۱-مقدمه

رنگ‌ها، یکی از مهم‌ترین افزودنی‌های مواد غذایی می‌باشند که تأثیر بسزایی بر بازارپسندی محصول تولید شده، دارند. به همین دلیل، استفاده از ترکیبات مولد رنگ در صنایع مختلف از جمله صنعت غذا از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است.کـاروتنوئیـدهـا، یکی از مهم‌ترین رنـگ‌هـای طبیعی، هســـتنـد که به طور طبیعی در کلروپلاســـت و یا کروموپلاســـت گیاهان و برخی از ارگانیســـم‌های فتوســـنتزکننده مثل جلبک‌ها وجود دارند(Norshazila, Irwandi, Othman, & Zuhanis, 2012). آستاگزانتین[1] کتوکاروتنوئیدی از گروه گزانتوفیل‌ها و یکی از معروف‌ترین رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌باشد، که درحالت آزاد به رنگ‌های صورتی تا قرمز دیده می‌شود. این کارتنوئید رنگدانه محلول در چربی است و در حلال‌هایی مانند استون، اتانول و کلروفرم حل می‌شود. آستاگزانتین حاوی زنجیره بلند از پیوند دوگانه مزدوج و گروه‌های کتونی می‌باشد. این ویژگی در آستاگزانتین موجب می‌گردد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایش یابد و بتواند رادیکال‌های آزاد را به‌سرعت غیر فعال کند. در مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین با سایر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، محققان به این نتیجه رسیدند که آستاگزانتین در خنثی سازی رادیکال‌های آزاد مطلوب تر از سایر کاروتنوئیدها نظیر بتاکاروتن عمل می‌کند و در جلوگیری از پراکسیداسیون استرهای متیلی اسیدهای چرب اشباع نشده موثرتر است(Ambati, Siew Moi, Ravi, & Aswathanarayana, 2014). مطالعات نشان داده است که قدرت آنتی اکسیدانی کاروتنوئید آستاگزانتین ۱۰ برابر بیشتر ازسایر کاروتنوئیدها (مانند زئاگزانتین،لوتئین،کانتاگزانتین، بتاکاروتن) و ۱۰۰ برابر بیشتر از آلفاتوکوفرول می‌باشد(Silva, Rodrigues, Silva, & Rodrigues, 2018). آستاگزانتین از منابع مختلف طبیعی و سنتزی به روش‌های گوناگون قابل استخراج است. آستاگزانتین سنتتیک از منابع پتروشیمی تولید می‌شود که به دلیل ارزان‌تر بودن (هر کیلوگرم حدود ۱۰۰۰ دلار) بیش از ۹۵ ٪ از این بازار را به خود اختصاص داده است. اما به دلیل مسائل مربوط به ایمنی مواد غذایی (مسمومیت بالقوه در محصول نهایی) و آلودگی، تا به امروز فقط به‌عنوان یک افزودنی برای تغذیه ماهی (برای اهداف رنگدهی) استفاده شده است و برای مصرف مستقیم انسانی در غذاها یا مکمل‌ها تائید نشده است(Pérez-López *et al.*, 2014). آستاگزانتین طبیعی از برخی جلبک‌ها، ماهی قزل‌آلا، پوسته میگو و غیره استحصال می‌شود و قابلیت استفاده در صنایع غذایی (نوشیدنی‌ها، بستنی، دسر، آبنبات و تولیدات گوشتی) علاوه بر مصارف تغذیه حیوانات آبزی و حیوانات خانگی را دارد(Delgado-Vargas & Paredes-Lopez, 2002). تحقیقات مختلف اثرات درمانی و دارویی آستاگزانیتن را بررسی و نتایج مثبتی گزارش کرده‌اند. این رنگدانه دارای فعالیت ضد سرطانی است و در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و التهابی و بهبود سلامت چشم نیز کارائی دارد. اثرات ضد التهابی و ضد دیابتی آستاگزانتین نیز ثابت شده است(Brandão, Coêlho, Souza, & Silva, 2019). با توجه به خواص مذکور در آستاگزانتین، استخراج آن از منابع طبیعی جهت کاربرد در آبزی‌پروری و صنایع غذایی ضرورت می‌یابد. برای استخراج آستاگزانتین از میگو تحقیقات بسیاری از جمله استخراج به وسیله حلال‌های مختلف با کمک فراصوت، تخمیر میکروبی، استخراج با روغن، مایع یونی، خیساندن، سوکسله و فراصوت، سیال فوق بحرانی، فراصوت به روش حلال سبز و روش‌های استخراج آنزیمی، مایکروویو و پالس الکتریکی مورد مطالعه قرار گرفته است(Saini & Keum, 2018). به طور کلی، چندین فناوری می‌تواند در فرآیند استخراج کارآمد آستاگزانتین مورد استفاده قرار گیرد. Hushmand و همکاران (۲۰۲۱)، در بررسی بهینه سازی استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ آبی *(Portunus pelagicus)* و میگوی ببری سبز *(Penaeus semisulcatus)* به کمک امواج فراصوت و مایکروویو نشان دادند، ضایعات خرچنگ و میگو می‌توانند به عنوان ارزان ترین مواد اولیه جهت استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی استفاده شوند(Hooshmand, Shabanpour, Moosavi-Nasab, Alishahi, & Golmakani, 2021). مایعات یونی دارای خواص فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی مانند فشاربخارناچیز، غیرقابل اشتعال بودن، پایداری حرارتی بالا و تجدیدپذیری هستند(مشابه مایع یونی مورد استفاده در این تحقیق). ازسوی دیگر، دوزهای پایین مایعات یونی درآزمایشات حیوانی وآزمایشگاهی منجربه آسیب سلولی نشده است. درنتیجه، مایعات یونی جایگزین‌های بالقوه‌ای برای حلال‌های آلی فرار درصنایع غذایی

[1] Astaxanthin

هستند(Martins, Braga, & de Rosso, 2017). با این حال، ویسکوزیته اکثر مایعات یونی بیشتر از حلال‌های آلی است که در نتیجه منجر به کاهش نرخ انتقال جرم می‌شود. میکروامولسیون روشی امیدورکننده است که امکان استخراج انتخابی مولکول‌های زیستی را درصنایع غذایی و شیمیایی فراهم می‌کند(Amiri-Rigi & Abbasi, 2019). از لحاظ تعریف، امولسیون یک سامانه نامتجانس از دو مایع غیرقابل امتزاج است که در چنین سامانه‌ای یکی از مایع‌ها در مایع دیگر به صورت 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 (به عنوان فاز پیوسته) امولسیون از نوع روغن در آب (O/W) تشکیل می‌شود و اگر قطرات آب در روغن پراکنده شوند، امولسیون از نوع آب در روغن (W/O) خواهد بود، در حالی که میکروامولسیون‌ها نوعی سامانه امولسیونی هستند که برخلاف امولسیون‌ها از لحاظ ترمودینامیکی پایدارند و اندازه فاز پراکنده در آن‌ها حدود ۱۰۰-۱۰ نانومتراست. اصولاً برای تهیه یک سامانه میکروامولسیونی 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 میکروامولسیون به خودی خود شکل می‌گیرد. درنتیجه، میکروامولسیون‌ها 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 (رادی و عباسی،۱۳۹۲). میکروامولسیون‌ها ویژگی‌های مطلوبی از جمله پایداری کامل، ویسکوزیته کم و ظرفیت انحلال‌پذیری زیاد برای ترکیبات آبدوست و چربی دوست دارند(Amiri-Rigi, Abbasi, & Scanlon, 2016). تا به امروز، میکروامولسیون‌ها برای استخراج پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها و عناصرکمیاب استفاده شده‌اند. Gao و همکاران (۲۰۲۰)، مطالعه‌ای با هدف بازیابی آستاگزانتین ازضایعات میگو و استخراج به کمک فراصوت با استفاده ازمیکروامولسیون‌مایع یونی درآب (متشکل از مایع یونی ، آب ، تریتون ایکس۱۰۰ و نرمال بوتانل) انجام دادند. نتایج نشان داد که درمقایسه باحلال‌های آلی (اتانول،استون،ودی متیل سولفوکسید)، میکروامولسیون مایع یونی در آب به دلیل فعل و انفعالات الکترواستاتیک قوی‌تر و برهمکنش‌های پیوندهیدروژنی باعث افزایش قابل توجه استخراج آستاگزانتین شدند. به طور کلی میکروامولسیون مبتنی بر مایع یونی جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم دراستخراج و بازیابی آستاگزانتین ازمنابع زیستی طبیعی است(Gao et al., 2020). این پژوهش با هدف مقایسه استخراج آستاگزانتین تحت شرایط خیساندن به مدت ۲۴ ساعت با حلال آلی (ترکیب اتانول با اتیل استات)، حلال سبز (میکروامولسیون مایع یونی تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید بعنوان بخش هیدروفوب در آب که فسفونیوم بخش کاتیونی و بروماید بخش آنیونی را تشکیل می‌دهند) و روغن گیاهی (روغن آفتابگردان) از پوسته میگوی موزی(*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس(*Pontogammarus maeoticus*) انجام گرفت. علاوه بر این استفاده از این منابع برای استخراج آستاگزانتین برای اولین بار مورد مطالعه قرار می‌گیرد و در صورت حصول آستاگزانتین از آن ها، به عنوان منابع نوین استخراج معرفی می‌گردند. همچنین به دو حلال کم عارضه(روغن آفتابگردان و مایع یونی) برای مصارف غذایی پرداخته می شود. ضمن اینکه استفاده از مایع یونی به عنوان حلال سبز در سال‌های اخیر مطرح گردیده و استفاده از آنها بصورت میکروامولسیون در جریان فرآیندهای استخراجی کاملا نوآورانه می باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

میگوی موزی و سخت پوست گاماروس با تایید نوع گونه از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس تهیه شدند. آستاگزانتین تجاری با خلوص >۹۸٪، DPPH[۲] و BHT[۳] از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. اتانول، پروپانول و اتیل استات با خلوص کروماتوگرافی و تری بوتیل اکتیل فسفونیوم

[2] 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl
[3] Butylated hydroxytoluene

بروماید[4] و تریتون ایکس ۱۰۰ [5] با خلوص >۹۸٪ و نرمال بوتانول با خلوص ۹۹/۹٪ از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند. روغن آفتابگردان تصفیه شده بدون آنتی اکسیدان نیز از شرکت حیات خریداری شد. کلیه آزمایشات در معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان انجام گرفت.

۲-۲-آماده سازی نمونه ها

پوسته میگوی موزی و سخت پوست گاماروس با آب مقطر به خوبی شسته شدند و در خشک کن انجمادی(Christ-Alpha– LD freeze dryer ، آلمان)، در ۵۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس پودر شدند. پودرهای حاصل را با الک آزمایشگاهی دارای مش کوچکتر از ۱۵ میکرومتر الک کرده و در یخچال نگهداری شدند(Gao *et al*., 2020).

۲-۳-آماده سازی حلال ها

حلال سبز مورد استفاده میکروامولسیون مایع یونی در آب است که با توجه به تشکیل خود به خودی میکروامولسیون و عدم نیاز به صرف انرژی زیاد فقط با هم زدن و به روش زیر تهیه شد(Gao *et al*., 2020): تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید: تریتون ایکس ۱۰۰ – نرمال بوتانول (۳ به ۱): آب، با نسبت جرمی۰/۱۳: ۰/۲۵: ۰/۶۲مخلوط شد. این ترکیبات به ترتیب فاز غیر قطبی، سورفاکتانت-کمک سورفاکتانت و فاز قطبی میکروامولسیون را شامل می‌شوند. این حلال در دمای اتاق قابل نگهداری است. برای نمونه شاهد از اتانول استفاده شد.

۲-٤-نحوه استخراج

حلال‌ها در دمای محیط به نسبت‌های ۵ برابر،۱۲/۵برابر و۲۰برابر (که با بررسی پژوهش های پیشین استخراج آستاگزانتین از منابع دیگر تعیین گردید) با پودر نمونه‌ها مخلوط شد و به مدت ۲۴ساعت تحت روش خیساندن بدون هم زدن در دمای محیط قرار گرفت. سپس مخلوط حاصله را به مدت ۱۰ دقیقه با ۸۵۰۰ دور در دقیقه تحت دمای محیط سانتریفیوژ(سانتریفیوژیخچال‌دار (Eppendorf،آلمان)) کرده، 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 در قسمت ته نشین شده) و پس از سانتریفیوژ، بخش بالایی آن با مقدار قبل ترکیب شده و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری از جنس تفلون فیلتر شد تا برای آنالیز آماده گردد(Parjikolaei *et al*., 2016).

۲-۵-آزمون ها

۲-۵-۱-ارزیابی خواص فیزیکی میکرو امولسیون

[4]Tributyloctylphosphonium Bromide
[5]Triton X-100

برای اندازه گیری رسانایی میکروامولسیون از دستگاه هدایت سنج inoLab ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای اندازه‌گیری چگالی میکرو امولسیون از چگالی سنج ۵۰[۶] میکرولیتر ساخت کشور آلمان استفاده شد. قطر میکروامولسیون بادستگاه پراکنش دینامیکی نور[۷](DLS) (Horiba، ژاپن) تعیین شد.

۲-۵-۲-ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل)

محتوای کاروتنوئید کل با استفاده از اندازه گیری‌های اسپکتروفتومتری طبق روش گزارش شده توسط Haque و همکاران (۲۰۱۶) تعیین شد. جهت تعیین محتوای کل کاروتنوئیدها، جذب ۴ میلی‌لیتر از محلول‌های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر[۸] (دستگاه اسپکتوفتومترUV-Vis (Shimadzu،ژاپن)) در طول موج ۴۵۰ نانومتر پس از صفر کردن جذب دستگاه برای هر نوع حلال اندازه گیری شد و از ضریب خاموشی ویژه آستاگزانتین ۲۱۰۰ استفاده شد. براساس مطالعات پیشین انجام شده در این رابطه، محتوای کاروتنوئید کل در این طول موج ، آستاگزانتین کل در نظر گرفته شد. بازده محتوای‌آستاگزانتین کل[۹] (TAC) با استفاده از معادله شماره (۱) برآورد شد (Haque, Dutta, Thimmanagari, & Chiang, 2016).

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

V: حجم حلال مورد استفاده (ml)

A :جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر

W: وزن خشک ماده (g)

۲-۵-۳-آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر

منحنی استاندارد آستاگزانتین با تهیه رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص در غلظت‌های ۰-۱ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از ۲-پروپانول بعنوان حلال رنگدانه خالص آستاگزانتین رسم گردید. جذب آستاگزانتین عصاره‌ها در طول موج ۴۷۸ نانومتر($OD_{۴۷۸}$) دستگاه اسپکتروفتومتر-UV VIS اندازه گیری شد و با آزمایش الکل حاوی آستاگزانتین، جذب در سه تکرار ثبت شد. میزان آستاگزانتین عصاره‌ها با استفاده از معادله شماره(۲) محاسبه گردید. (Khoo *et al.*, 2020).

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

C: غلظت آستاگزانتین در ۲-پروپانول

DO: جذب در ۴۷۸ نانومتر

[6]Pycnometer
[7]Dynamic Light Scattering (DLS)
[8]Spectrophotometry
[9] total astaxanthin content

معادله(۳) $y = 1.97X$

y: میزان جذب در ۴۷۸ نانومتر

X: غلظت بر حسب میلی گرم بر میلی‌لیتر

۲-۵-٤-محاسبه درصد بازیافت آستاگزانتین

برای این منظور عصاره‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصد آستاگزانتین استخراج شده تحت هر یک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل (با توجه به توضیحات در بخش ۲-۵-۲) نمونه با توجه به معادله شماره (۴)حاصل شد(Ruen-ngam, Shotipruk, & Pavasant, 2010).

معادله(۴) $\%\text{بازیابی} = \frac{\text{عصاره آستاگزانتین}}{\text{آستاگزانتین کل}} \times ۱۰۰$

۲-۵-۵-فعالیت مهارراديکال ۲،۲-دیفنیل-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 (۰/۷۵-۰/۰۵)جهت بررسی روند تغییرات در سه نوع حلال مورد استفاده 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 و بعد از صفر کردن جذب دستگاه برای هر نمونه از حلال ها اندازه گیری و فعالیت مهار رادیکال DPPH بر اساس معادله شماره (۵) محاسبه شد. این آزمون با قابلیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بعنوان شاهد در غلظت‌های مشابه مقایسه شد(X. Zhao, Zhang, Fu, Zhu, & Zhang, 2016).

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 محلولDPPH

۲-٦-آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از طرح آماری آنالیز واریانس یکطرفه ANOVA در سطح خطای ۰/۰۵ با نرم افزار SPSS 26.0 انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. رسم نمودارها در نرم افزارExcel.2010 انجام شد. بهترین شرایط استخراج آستاگزانتین و بهترین منبع برای استخراج بیشترین میزان آستاگزانتین با به کارگیری دو منبع سخت پوست گاماروس و میگوی موزی، حلال‌های اتانول به

عنوان شاهد، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، حلال روغنی و میکروامولسیون مایع یونی در آب، در نسبت‌های متفاوت حلال به نمونه ۵ ، ۱۲/۵ و ۲۰ برابر تعیین شد. تمامی آزمون‌ها سه بار انجام شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی میکروامولسیون

تعیین چگالی، رسانایی و قطر از جمله ویژگی‌های مورد آزمون میکروامولسیون در این پژوهش بودند. مطالعه خواص فیزیکی حلال و وابستگی دمایی آن‌ها برای طراحی و عملکرد مناسب فرآیندهای جداسازی مهم است. با این‌حال، خواص فیزیکی میکروامولسیون‌های مبتنی برمایع یونی کمیاب است و درمطالعات قبلی نادیده گرفته شده است. در این مطالعه چگالی میکروامولسیون در محدوده ۰/۹۷۱۵۱ گرم بر سانتی متر مکعب، قطر آن‌ها ۱۵/۸ نانومتر و رسانایی آن‌ها ۳۱۲ میکرو زیمنس در دمای ۲۷/۱ درجه سانتی گراد تعیین شد.Gao و همکاران (۲۰۲۰)، مطالعه ای با هدف بازیافت آستاگزانتین از ضایعات میگو با استفاده از میکروامولسیون مایع یونی در آب انجام داده و ویژگی های فیزیکی میکروامولسیون را با حلال های آلی ، مشابه پژوهش حاضر مورد مقایسه قرار دادند که نتایج چگالی در محدوده ی دمایی محیط و میزان رسانایی خوب و قابل قبول با مطالعه ما همخوانی داشت. رسانایی بالای میکروامولسیون مایع یونی نسبت حلالهای آلی به دلیل وجود گونه‌های یونی محلول است که به صورت آزادانه حضور داشته و توانایی حرکت دارند. از طرف دیگر کوچک بودن اندازه ذرات در میکروامولسیون نشان دهنده ثبات و یکنواختی عالی می‌باشد. هدایت گری الکتریکی بالای میکروامولسیون مایع یونی در آب باعث برهمکنش بهتر حلال با نمونه و استخراج بالاتر رنگدانه می‌شود(Gao *et al*., 2020).

۳-۲-ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها

نتایج مربوط به محتوای کل کارتنوئید استخراج شده از نمونه‌های میگوی موزی و سخت پوست گاماروس با استفاده از حلال‌های متفاوت (اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، میکروامولسیون مایع یونی در آب، حلال روغنی) در نسبت‌های مختلف (۵، ۱۲/۵ و ۲۰برابر) حلال به نمونه در جدول ۱، نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده از جدول ۱، تفاوت در محتوای کل کاروتنوئید استخراج شده از میگوی موزی و سخت پوست گاماروس در نسبت‌های متفاوت حلال به نمونه معنی دار بود($p < ۰/۰۵$). در بین حلال‌های مختلف استفاده شده برای استخراج کاروتنوئید موجود در میگوی موزی و سخت پوست گاماروس حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بیشترین مقدار محتوی کل کارتنوئید را نسبت به اتانول و سایر حلال‌ها نشان داد که این افزایش ازلحاظ آماری نیزمعنی دار بود($p < ۰/۰۵$). در بین نمونه‌های میگو و سخت پوست گاماروس نیز میزان کارتنوئید کل استخراج شده از میگوی موزی بیشتر از سخت پوست گاماروس بود. Sowmya و همکاران(۲۰۱۴) در مطالعه خود گزارش دادند، میگو یک منبع مهم برای استخراج کاروتنوئیدها بویژه آستاگزانتین می‌باشد(Sowmya, Ravikumar, Vivek, Rathinaraj, & Sachindra, 2014) که با نتایج حاصل از این پژوهش نیز مطابقت دارد. همچنین مقدار کل کارتنوئید استخراج شده در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه با افزایش نسبت‌ها روند صعودی یا کاهشی مرتبی را نشان نداد اما در نسبت ۵ برابر حلال به نمونه میزان کاروتنوئید کل استخراج شده در همه حلال‌ها بیشتر از سایر نسبت‌ها بود این اختلاف ازلحاظ آماری نیزمعنی دار بود($p < ۰/۰۵$). همچنین در بین حلال‌های مختلف استفاده شده در این پژوهش، حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بالاترین میزان کارتنوئید استخراج شده را نسبت به سایر حلال‌ها در تمام نسبت‌های حلال به نمونه نشان داد. تاکنون ازحلال‌های آلی مختلفی برای استخراج کاروتنوئیدها از منابع مختلف استفاده شده است که معمولا پیشنهاد

مناسب‌ترین حلال، بـه دلیـل تفـاوت در قطبیـت انواع کـاروتنوئیـدهای مختلف، پیچیدگی ســـاختارماتریکس (بافت) نمونه و ترکیبات موجود درآن، به سادگی امکان‌پذیر نیست. معمولاحلال‌های غیرقطبی مثل هگزان انتخاب خوبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیرقطبی نظیرکاروتن‌ها هســـتند درحالی که حلال‌های قطبی مانند اتانول و اســـتون برای کاروتنوئیدهای قطبی نظیر گزانتوفیل‌ها مناسب‌تر هستند(Amorim-Carrilho, Cepeda, Fente, & Regal, 2014). بنابراین علت بالابودن کارتنوئیدهای استخراج شده بویژه آستاگزانتین توسط حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب را می‌توان به انحلال بهتر رنگدانه‌ها و تطابق قطبیت در این حلال نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده در پژوهش نسبت داد.

جدول۱-محتوای کل کارتنوئیدها (میلی لیتر بر گرم) در میگوی موزی و سخت پوست گاماروس در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه

Table 1- Total content of carotenoids in *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* in different solvent to sample ratio

حلال‌ها Solvents	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus*			میگوی موزی *Fenneropenaeus* merguiensis		
	نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio			نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio		
	5	12.5	20	5	12.5	20
اتانول Ethanol	45.76± 2.61^{cA}	36.39± 1.58^{bB}	40.39± 2.27^{cB}	44.37±1.48^{cA}	39.80±0.57^{cB}	43.39± 1.56^{cA}
مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) Mixture of ethanol: ethyl (acetate (1:2	67.00±1.74^{bA}	39.24±0.03^{bC}	43.69± 0.04^{bB}	81.75±1.18^{bA}	43.28±0.70^{bC}	46.39±1.25^{bB}
میکروامولسیون مایع یونی در آب Ionic liquid microemulsion in water	78.07± 0.67^{aA}	62.17±1.62^{aC}	67.40±1.78^{aB}	88.98±1.33^{aA}	79.58±0.46^{aB}	77.16± 1.08^{aC}
حلال روغنی Oily solvent	48.25± 0.83^{cA}	37.69±1.18^{bC}	40.55± 0.66^{cB}	46.30 ± 0.31^{cA}	42.15±1.77^{bB}	46.78±1.6^{bA}

داده هابه صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده اند. حروف غیرمشابه کوچک درهرستون نشان دهنده وجوداختلاف معنی داربین حلالهااست(p<۰/۰۵). حروف بزرگ درهرردیف نشان دهنده تفاوت معنی داری (p<۰/۰۵)درمیان نسبتها است.

Data are reported as mean ± standard deviation (n=3).Small non-similar letters in each column indicate the existence of a significant difference (p < 0.05) between the solvents.The capital letters in each row indicate a significant difference (p < 0.05) among the ratios.

۳-۳-آنالیز آستاگزانتین با اسپکتروفتومتر

شکل ۱، منحنی استانداردآستاگزانتین با تهیه رقت‌های مختلف آستاگزانتین خالص در غلظت‌های ۰-۱ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از ۲-پروپانول در طول موج ۴۷۸ نانومتر را نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر برای محاسبه منحنی استاندارد از رگرسیون خطی استفاده شد. ضرایب تعیین(R^2) مقدار (۰/۹۹۵۲) خطی بودن مطلوب را درمحدوده انتخاب شده برای آستاگزانتین نشان می‌دهد که درشکل۱نشان داده شده است. نتایج حاصل از استخراج آستاگزانتین با استفاده از حلال‌های مختلف (اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب و حلال روغنی) در نسبت های ۵ برابر، ۱۲/۵ و۲۰ برابر حلال به نمونه در جدول۲، نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی بالاتر از سخت پوست گاماروس است. آنالیز آماری نشان داد که میزان آستاگزانتین استخراج شده با استفاده ازحلال‌های مختلف از میگوی موزی و سخت پوست گاماروس در نسبت ۱۲/۵ برابر نسبت به سایر نسبت‌ها بیشترین مقدار است. طبق نتایج حاصل از جدول ۲، در نسبت ۵ برابر میزان استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی با استفاده از حلال روغنی کمترین مقدار بود اما در سایر نسبت‌ها حلال اتانول کمترین مقدار استخراج آستاگزانتین را نشان داد. در سخت پوست گاماروس نیز در تمام نسبت‌ها همواره میزان استخراج آستاگزانتین با استفاده از حلال اتانول کمترین مقدار را نشان داد، این نتایج از لحاظ آماری نیزمعنی دار بود($p < ۰/۰۵$). علاوه بر این در بین حلال‌های متفاوت (اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲)، میکروامولسیون مایع یونی در آب و حلال روغنی) هم در میگوی موزی و هم در سخت پوست گاماروس حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بیشترین مقدار آستاگزانتین استخراج شده را در همه‌ی نسبت‌ها نشان داد. به طور کلی در بین دو نمونه میگوی موزی و سخت پوست گاماروس در نسبت‌های متفاوت حلال‌ها، نمونه میگوی موزی در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب بیشترین میزان استخراج آستاگزانتین را نشان داد. در نسبت های بالاتر حلال به نمونه بدلیل محدود بودن ظرفیت انحلال حلال روند کاهشی را نشان داد. بنابراین حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب به عنوان حلال مناسب، نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه به عنوان نسبت مناسب و میگوی موزی به عنوان نمونه مناسب انتخاب شدند. در مطالعه Tan و همکاران (۲۰۲۱)، از روش‌های مختلف نظیر میکروفلودیزیشن، فشار بالا، مایعات یونی، آنزیمی و حلال اسیدکلریدریک جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین راندمان استخراج آستاگزانتین مربوط به روش استخراج با اسیدکلریدریک و مایعات یونی است که با تحقیق حاضر همخوانی دارد (Tan *et al*., 2021) Gao و همکاران (۲۰۲۰)، مطالعه‌ای با هدف بازیابی آستاگزانتین از ضایعات میگو (*Penaeus vannamei*) و استخراج به کمک فراصوت بااستفاده از میکروامولسیون مایع یونی درآب انجام دادند. نتایج نشان داد که درمقایسه با حلال‌های آلی (اتانول، استون، و دی متیل سولفوکسید)، میکروامولسیون مایع یونی در آب به دلیل فعل و انفعالات الکترواستاتیک قوی‌تر و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی باعث افزایش قابل توجه استخراج آستاگزانتین شدند(Gao *et al*., 2020). که با نتایج حاصل ازپژوهش حاضر نیز مطابقت دارد. به طور کلی میکروامولسیون مبتنی برمایع یونی جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم دراستخراج و بازیابی آستاگزانتین از منابع زیستی طبیعی است. Roohinejad و همکاران (۲۰۱۴)، استخراج بتاکاروتن ازتفاله هویج تیمارشده بامیدان الکتریکی پالسی با استفاده از میکروامولسیون روغن درآب را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان استخراج بتاکاروتن با استفاده از میکروامولسیون آب در روغن مونوکاپریلوکاپرات گلیسرول[۱۰] در مقایسه با هگزان۱۰۰ درصد بیشتر بود(Roohinejad, Oey, Everett, & Niven, 2014). این نتایج با نتایج پژوهش حاضرنیز مشابهت دارد. Hooshmand و همکاران (۲۰۱۷) بهینه سازی استخراج کاروتنوئیدها ازضایعات سخت‌پوستان ازطریق استخراج باحلال آلی و روغن گیاهی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد در بین حلال‌ها، استون و روغن آفتابگردان بیشترین میزان عملکرد برای استخراج کاروتنوئید را داشتند. این مطالعه نشان داد که استخراج کاروتنوئیدها به روش حلال آلی کارآمدتر از روش روغن گیاهی است و میزان بازده کاروتنوئید در ضایعات میگو بیشتر از ضایعات خرچنگ

[10]glycerol monocaprylocaprate oil

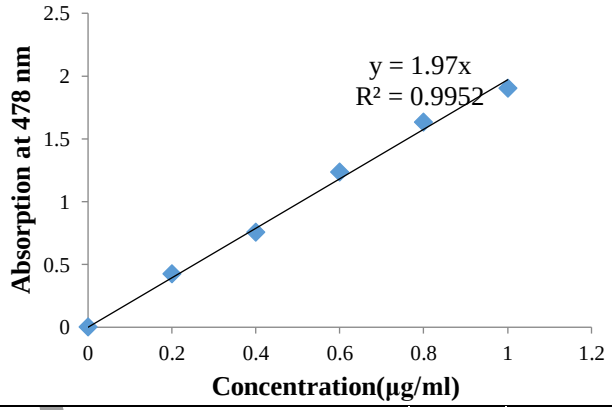
است(Hooshmand, Shabanpour, Moosavi-Nasab, & Golmakani, 2017). نتایج حاصل ازاین مطالعه نیز با پژوهش حاضر مطابقت دارد.

شکل۱-منحنی استاندارد آستاگزانتین درغلظت‌های ۰-۱ میکروگرم برمیلی لیتر با استفاده از ۲-پروپانول

Figure 1- Standard curve of astaxanthin in concentrations of 0-1 µg/ml using 2-propanol

جدول۲- آستاگزانتین (میلی گرم بر میلی لیتر) استخراج شده ازمیگوی موزی و سخت پوست گاماروس در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه

Table 2- Astaxanthin extracted from *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* in different solvent to sample ratio



حلال‌ها Solvents	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus*			میگوی موزی *Fenneropenaeus* merguiensis		
	نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio			نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio		
	5	12.5	20	5	12.5	20
اتانول Ethanol	21.47± 2.32^{bC}	34.10± 1.26^{dA}	30.16±1.17^{dB}	27.20±1.18^{cC}	37.60±1.49^{cA}	32.21±0.97^{dB}

مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) Mixture of ethanol: ethyl (acetate (1:2	35.53±0.83^{aB}	38.27±0.61^{cA}	34.59±1.13^{cB}	38.46±1.03^{bC}	52.47±0.53^{bA}	40.87±0.73^{bB}
میکروامولسیون مایع یونی در آب Ionic liquid microemulsion in water	36.39±1.35^{aC}	62.91±0.48^{aA}	59.17±0.20^{aB}	54.22±0.91^{aC}	77.44±1.09^{aA}	72.65±0.67^{aB}
حلال روغنی Oily solvent	34.67±0.74^{aC}	43.24±0.90^{bA}	38.35± 0.44^{bB}	23.38±0.89^{dC}	38.24± 0.97 ^{cA}	34.58±0.47^{cB}

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده اند. حروف غیرمشابه کوچک درهرستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین حلال‌ها است(p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی داری (p<۰/۰۵) درمیان نسبت‌ها است.

Data are reported as mean ± standard deviation (n=3). Small non-similar letters in each column indicate the existence of a significant difference (p < 0.05) between the solvents. The capital letters in each row indicate a significant difference (p < 0.05) among the ratios.

۳-٤-درصد بازیافت آستاگزانتین

درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصد آستاگزانتین استخراج شده تحت هریک از شرایط استخراج ازمقدار آستاگزانتین کل نمونه(TAC) با توجه به فرمول ۴، بدست آمد و نتایج حاصل از درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه‌های میگوی موزی و سخت پوست گاماروس با استفاده از حلال های مختلف در نسبت‌های ۵ ، ۱۲/۵ و ۲۰ برابرحلال به نمونه در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه میگوی موزی با استفاده از حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه بیشترین مقدار است. از لحاظ آماری نیز این یافته‌ها معنی دار بود (p < ۰/۰۵). به طور کلی تحت شرایط این آزمایش هرچه میزان استخراج آستاگزانتین بیشتر باشد درصد بازیافت استاگزانتین نیز بیشتر خواهد بود این نتایج با نتایج حاصل از آنالیز استاگزانتین با اسپکتروفتومتر در پژوهش حاضر نیز مطابقت دارد.

جدول۳-درصد بازیافت آستاگزانتین از میگوی موزی و سخت پوست گاماروس در نسبت‌های مختلف حلال به نمونه

Table 3- Astaxanthin recovery percentage from *Pontogammarus maeoticus* and *Fenneropenaeus merguiensis* in different solvent to sample ratio

حلال‌ها Solvents	سخت پوست گاماروس *Pontogammarus maeoticus* نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio			میگوی موزی *Fenneropenaeus* merguiensis نسبت حلال به نمونه Solvent to sample ratio		
	5	12.5	20	5	12.5	20

اتانول Ethanol	58.33±1.21^{aC}	91.33±1.38^{aA}	74.33±1.52^{dB}	56.00±1.00^{cC}	88.66±1.52^{cA}	76.66±0.57^{dB}
مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) Mixture of ethanol: ethyl (acetate (1:2	50.00±1.00^{bC}	96.66±1.52^{aA}	82.00±1.00^{bB}	62.33±0.57^{aC}	91.33±1.15^{bA}	85.66±0.57^{bB}
میکرومولسیون مایع یونی در آب Ionic liquid microemulsion in water	46.00±1.00^{cC}	97.00±1.00^{aA}	87.33±0.57^{aB}	59.33±0.57^{bC}	97.66±0.57^{aA}	92.66±0.57^{aB}
حلال روغنی Oily solvent	56.00±1.00^{aC}	94.00±1.00^{aA}	78.33±0.57^{cB}	55.00±1.00^{cC}	89.33± 0.57 ^{cA}	79.00±1.00^{cB}

Green solvent

داده هابه صورت میانگین±انحراف معیار (n=3) گزارش شده اند. حروف غیرمشابه کوچک درهرستون نشان دهنده وجوداختلاف معنی دار بین حلال‌ها است(p<۰/۰۵). حروف بزرگ در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵)درمیان نسبت‌ها است.

Data are reported as mean ± standard deviation (n=3).Small non-similar letters in each column indicate the existence of a significant difference (p < 0.05) between the solvents.The capital letters in each row indicate a significant difference (p < 0.05) among the ratios.

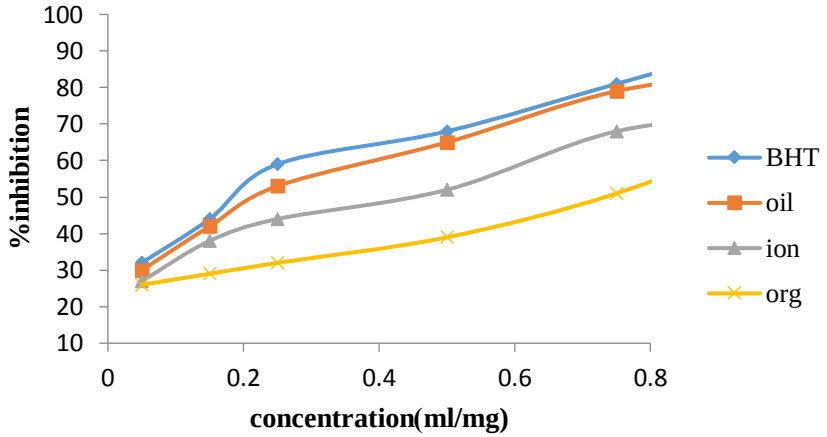
۳-۵-فعالیت مهارراديکال ۲،۲-دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

بررسی فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد DPPH یکی از روش‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این روش رنگ ارغوانی رادیکال‌های آزاد DPPH در اثر آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره خنثی شده و بی‌رنگ می‌گردد. لذا درجهٔ بی‌رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود می‌باشد(Nikmaram, Mousavi, Emam-Djomeh, Kiani, & Razavi, 2015). نتایج حاصل ازمهار رادیکال DPPH توسط غلظت‌های متفاوت آستاگزانتین استخراج شده با حلال اتانول، مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) ، حلال روغنی و حلال میکرومولسیون مایع یونی در آب در شکل ۲، نشان داده شده است. با افزایش غلظت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال‌های مختلف افزایش یافت. در بین حلال‌های استفاده شده برای استخراج آستاگزانتین، آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال روغنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به حلال مایع یونی و مخلوط اتانول: اتیل استات (۱:۲) نشان داد. اگر چه رنگدانه استخراج شده توسط حلال روغنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نزدیک به BHT داشت، اما همواره میزان فعالیت آنتی اکسیدانی BHT نسبت به این رنگدانه بالاتر بود. به طور کلی افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال روغنی عاری از آنتی اکسیدان نسبت به سایر حلال‌ها را می‌توان به حفاظت بهتر رنگدانه در روغن آفتابگردان نسبت داد. بعلاوه رنگدانه آستاگزانتین به سبب داشتن ماهیت چربی دوست در حلال روغن تمرکز بهتری داشته و از تماس با اکسیژن محیط دور مانده و خواص آنتی اکسیدانی خود را بیشتر حفظ می‌کند. در حلال مایع یونی علی رغم داشتن بالاترین میزان از رنگدانه بدلیل اکسید شدن جزئی یا آسیب های احتمالی بعدی طی دوره نگهداری خواص آنتی اکسیدانی کمتری نسبت به حلال روغن دارد. باتوجه به نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که بسته به نوع حلال مورد استفاده برای استخراج آستاگزانتین فعالیت آنتی

اکسیدانی نیز متفاوت خواهد بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین در بسیاری از تحقیقات بیان شده است. آستاگزانتین به دلیل ساختمان مولکولی-اش، 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 غیر اشباع (پلی–انی) و هم در قسمت حلقه‌های ترمینال (حلقه‌های C3)رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازد(Kishimoto *et al.*, 2010).

٤-نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که چگالی میکرواملسیون‌مایع یونی در آب در محدوده ۰/۹۷۱۵۱ گرم بر سانتی متر مکعب، قطر آن ۱۵/۸ نانومتر



شکل ۲- فعالیت مهارراديکال DPPH آستاگزانتین استخراج شده باحلال آلی، یونی و روغنی درمقایسه با BHT

Figure 2- DPPH radical scavenging activity of astaxanthin extracted with organic, ionic and oily solvent compared to BHT

و رسانایی ۳۱۲ میکرو زیمنس در دمای ۲۷/۱ درجه سانتی گراد بود. با توجه به نتایج بدست آمده از استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی و سخت پوست گاماروس، میگوی موزی به عنوان منبع با بالاترین میزان آستاگزانتین استخراجی انتخاب شد. حلال سبز(میکرو امولسیون مایع یونی در آب) در نسبت ۱۲/۵ برابر حلال به نمونه به عنوان روش مناسب برای استخراج انتخاب شد. مقدار آستاگزانتین استخراج شده در بهترین شرایط ۱/۰۹ ± ۷۷/۴۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود، که نشان دهنده انحلال بالای رنگدانه در میکروامولسیون مایع یونی است. همچنین نتایج حاصل از مهار رادیکال DPPH یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال‌های 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

ازBHT بود. ازطرف دیگر در بین آستاگزانتین استخراج شده توسط حلال‌های ذکر شده آستاگزانتین استخراجی توسط حلال روغنی بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشت که علت آن را می توان به حفاظت بهتر رنگدانه در روغن آفتابگردان نسبت داد.

تقدیر و تشکر

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

منابع

رادی، محسن، عباسی، سلیمان. ۱۳۹۲. میکرو امولسیون‌ها و کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی، ماهنامه فناوری نانو، شماره ۳.

Ambati, R. R., Siew Moi, P., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine drugs, 12*(1), 128-152 .

Amiri-Rigi, A., & Abbasi, S. (2019). Extraction of lycopene using a lecithin-based olive oil microemulsion. *Food chemistry, 272*, 568-573 .

Amiri-Rigi, A., Abbasi, S., & Scanlon, M. G. (2016). Enhanced lycopene extraction from tomato industrial waste using microemulsion technique: Optimization of enzymatic and ultrasound pre-treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 35*, 160-167 .

Amorim-Carrilho, K., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 56* ,73-49 .

Brandão, L. B., Coêlho, D. F., Souza, R. R., & Silva, C. F. (2019). Technological prospection of astaxanthin recovery of shrimp waste litopenaeus vannamei by the vegetable oil extracton process. *Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação, 34*(465-475).

Delgado-Vargas, F., & Paredes-Lopez, O. (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*: CRC press.

Gao, J., You, J., Kang, J., Nie, F., Ji, H., & Liu, S. (2020). Recovery of astaxanthin from shrimp (Penaeus vannamei) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions. *Food chemistry, 325*, 126850 .

Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., & Chiang, Y. W. (2016). Intensified green production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Food and BioproductsProcessing, 99*, 1-11 .

Hooshmand, H., Shabanpour, B., Moosavi-Nasab, M., Alishahi, A., & Golmakani, M. T. (2021). The optimization of extraction of carotenoids pigments from blue crab (Portunus pelagicus) and shrimp (Penaeus semisulcatus) wastes using ultrasound and microwave. *Journal of Marine Science and Technology, 20*(2), 72-93 .

Hooshmand, H., Shabanpour, B., Moosavi-Nasab, M., & Golmakani, M. T. (2017). Optimization of carotenoids extraction from blue crab (Portunus pelagicus) and shrimp (Penaeus semisulcatus) wastes using organic solvents and vegetable oils. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(5), e13171 .

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 .

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

Martins, P. L. G., Braga, A. R., & de Rosso, V. V. (2017). Can ionic liquid solvents be applied in the foodindustry? *Trends in Food Science & Technology, 66*, 117-124 .

Nikmaram, P., Mousavi, S. M., Emam-Djomeh, Z., Kiani, H., & Razavi, S. H. (2015). Evaluation and prediction of metabolite production, antioxidant activities, and survival of Lactobacillus casei431in a pomegranate juice supplemented yogurt drink using support vector regression. *Food science and biotechnology, 24*(6), 2105-2112. doi:10.1007/s10068-015-0279-5

Norshazila, S., Irwandi, J., Othman, R., & Zuhanis, H. Y. (2012). Scheme of obtaining [Beta]-carotene standard from pumpkin (Cucurbita moschata) flesh. *International food research journal, 19*(2), 531 .

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.

Pérez-López, P., González-García, S., Jeffryes, C., Agathos, S. N., McHugh, E., Walsh, D., . . . Moreira, M. T. (2014). Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *Journal of cleaner production, 64*, 332-344 .

Roohinejad, S., Oey, I., Everett, D., & Niven, B. (2014). Evaluating the effectiveness of β-carotene extraction from pulsed electric field-treated carrot pomace using oil-in-water microemulsion. *Food and Bioprocess Technology, 7*, 3336-3348 .

Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., & Pavasant, P. (2010). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Separation Science and Technology, 46*(1), 64-70 .

Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry, 240*, 90-103 .

Silva, A. K. N. d., Rodrigues, B. D., Silva, L. H. M. d., & Rodrigues, A. M. d. C. (2018). Drying and extraction of astaxanthin from pink shrimp waste (Farfantepenaeus subtilis): the applicability of spouted beds. *Food Science and Technology, 38*, 454-461 .

Sowmya, R., Ravikumar, T., Vivek, R ,.Rathinaraj, K., & Sachindra, N. (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of Food Science and Technology, 51*, 3199-3207 .

Tan, Y., Ye, Z., Wang, M., Manzoor, M. F., Aadil, R. M., Tan, X., & Liu, Z. (2021). Comparison of different methods for extracting the astaxanthin from Haematococcus pluvialis: Chemical composition and biological activity. *Molecules, 26*(12), 3569 .

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