Journal Food Research

Online ISSN: 2676-5691 Print ISSN: 2008-515X
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

Comparison of astaxanthin pigment extraction from shrimp shells and gammarus crustacean using microwave and soaking in ionic liquid microemulsion in water

Parisa Feizi [1], Yahya Maghsoudlou[2]✉, Hoda Shahiri Tabarestani [2] , Seyed Mahdi Jafari[2] and Amir houshang Bahri[3]

[1] PhD in Food Science & Technology, Dept. of Food Science & Technology, College of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
[2] Professor, Dept. of Food Science & Technology, College of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
[3]Associate Professor, Dept. of Fisheries, Marine Technology and Fisheries Science Research Center, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran
✉ Corresponding author: y.maghsoudlou@gau.ac.ir

ARTICLE INFO

Article type:
Research Article

Article history:
Received: 2024-07-29
Revised: 2025-04-29
Accepted: 2026-01-24

Keywords:
Astaxanthin, Antioxidant power, Crustacean wastes, Microwaves, Traditional extraction method

ABSTRACT

Background: The production of carotenoid pigments from crustacean by-products occurs at a low cost. The extraction process through conventional methods takes a long time to complete while needing substantial organic solvents but microwave-assisted extraction provides faster results .

Objective: The research goal involved studying the extraction of astaxanthin from two different shell sources: shrimp shells (*Fenneropenaeus merguiensis*) and amphipod crustacean shells (*Pontogammarus maeoticus*) using soaking and microwave-assisted extraction methods .

Methods: The preparation of sample powders required dissolving them in ionic liquid microemulsions which were mixed with water at a 5:1 ratio of solvent to sample. The extraction process used two different methods which included soaking at room temperature for 24 hours and microwave irradiation at 2.45 GHz and 100 W power for 91.81 seconds .

Results: According to the results, the highest yield of astaxanthin was obtained from shrimp (80.39 ± 1.09 µg/ml) using the microwave method. Therefore, shrimp was identified as a better source of astaxanthin compared to gammarus. Furthermore, the recovery percentage and total carotenoid content for shrimp were 93% and 59%, and 83.54 ± 0.56 ml/g and 77.98 ± 1.33 ml/g for the microwave and soaking methods, respectively, indicating the superiority of the microwave-assisted extraction. In addition, the antioxidant activity of astaxanthin extracted by the soaking method was higher than that of the microwave method. Compared to the synthetic antioxidant BHT, the antioxidant activity of astaxanthin was always greater, and increased with concentration.

Conclusion: Overall, based on the findings of this study, shrimp waste can be considered a suitable and effective source for astaxanthin extraction using microwave-assisted methods.

CC BY NC

Extended Abstract

Introduction: The diversity and anticancer properties of carotenoid pigments have attracted much attention. Carotenoids are yellow and red pigments found in bacteria, fungi, plants, and animals (Fidor and Borda, 2014). Carotenoids inactivate the initiators of harmful chemical reactions, such as free radicals. On the other hand, due to their strong antioxidant properties, they prevent the oxidation of unsaturated fatty acids and have shown important functions in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries (Sachindra and Mahendrakar, 2005). Many studies have been conducted on the extraction of carotenoid pigments from crustaceans such as crabs and shrimps (Parjiklai, Al-Houri, Ferte, & Christensen, 2015; Soumya & Sachindra, 2015), of which astaxanthin and its esters are the most abundant (Sachindra, Bhaskar, & Mahendrakar, 2006). Among the important shrimp species, banana shrimp is the second most important commercial species found in Hormozgan waters. Among the crustaceans, Gammarus is an apodous crustacean and an important commercial species in some countries and has a high concentration of carotenoids, protein, various types of enzymes, and essential unsaturated fatty acids. This crustacean plays an important role in cleaning the aquatic environment of fish such as salmon, and their presence in the fish diet increases the rate of digestion and absorption of food, resulting in increased growth performance (Escobar-Lux, Parsons, Samuelson, & Agnalt, 2020). In recent studies, this Atlantic crustacean has been studied and investigated as a rich source of carotenoid pigments (Namati, Shokri, & Pazouki, 2015). There are various methods for extracting pigments, including chemical methods (Hooshmand, Shabanpour, Mousavinasab, & Golmakani, 2017), microbial methods (Das et al., 2007), and the use of enzymatic digestion by proteolytic enzymes (N-Sachindra & Mahendrakar, 2011). Each of the mentioned extraction methods has advantages and disadvantages. The conventional soaking method for the extraction of carotenoid pigments is usually time-consuming and involves high cost and large volumes of solvent. Also, in most cases, these methods have lower efficiency compared to new methods such as microwave-assisted extraction and ultrasound (Li, Fabiano-Tixir, Tomao, Krautow, & Chamet, 2013). Microwave-assisted extraction is based on the absorption of microwave energy by polar molecules of chemical compounds (Rotary and Orsat, 2012). In recent years, in order to reduce the effects of volatile and toxic solvents, hydrophilic ionic liquids have been used as dispersing solvents and hydrophobic ionic liquids as extracting solvents. Ionic liquids are a salt in liquid form that is considered among green solvents due to its tunable physicochemical properties, high chemical and thermal stability, and negligible vapor pressure at room temperature, and has a molecular structure consisting of different cations and anions (Khu et al., 2019). However, the viscosity of most ionic liquids is higher than that of organic solvents, which results in a decrease in the mass transfer rate. Microemulsion is a promising method that enables selective extraction of biomolecules in the food and chemical industries (Amiri-Rigi and Abbasi, 2019). Ionic liquid microemulsion provides a suitable environment for the release and extraction of astaxanthin due to its adjustable polarity, low surface tension and ability to solubilize hydrophobic compounds. Also, its high stability and ability to penetrate the biological matrix increase the extraction efficiency compared to traditional solvents. To date, microemulsions have been used to extract proteins, pigments and trace elements. Since a high percentage of aquatic waste consists of wastes that contain many value-added compounds, their extraction not only contributes to the economic prosperity of the fisheries industry but also contributes significantly to environmental protection. Gao et al. (2020) extracted astaxanthin from shrimp waste using ultrasound and ionic liquid microemulsion. The microemulsion containing tributyl octylphosphonium bromide significantly increased the extraction of astaxanthin due to stronger electrostatic interactions and hydrogen bonding (Gao et al., 2020). In this regard, Nunes et al. (2021) extracted astaxanthin as a carotenoid with high antioxidant capacity from crab exoskeleton waste for use in food products. This extraction involved a microwave pretreatment step (with hydroalcoholic solvents with 0-50% water by volume at different temperatures from 40 to 140°C) and supercritical fluid extraction (at a pressure of 200-500 bar, a temperature of 40-60°C, and an ethanol content of 8-13% by weight). The extracted astaxanthin content was reported to be 12 times higher than that of the traditional Soxhlet extraction method, indicating that this proposed method significantly improves the extraction efficiency (Nunez et al., 2021).

Objective: The aim of this study was to compare astaxanthin extraction from shrimp (Fenneropenaeus merguiensis) and gammarus

crustacean (*Pontogammarus maeoticus*) using soaking and microwave-assisted methods in the presence of ionic liquid microemulsion.

Materials and Methods: To extract astaxanthin from lyophilized powder of banana and hard shell shrimp (Gammarus spp.) skin, the traditional method of soaking in a microemulsion solvent of ionic liquid in water (5:1, v/v) at ambient temperature for 24 hours was used. Microwave extraction was also performed under pre-optimized conditions with a frequency of 2.45 GHz in a 5-fold solvent to sample ratio, a power of 100 W, and a time of 91.81 seconds (Faizi et al., 2025). After extraction, the obtained extract was diluted with ethanol and then filtered with a 0.45 µm syringe filter to prepare for analysis (Fan et al., 2019). Next, in order to compare the extraction of astaxanthin using two methods, soaking and microwave, tests were used for the amount of total carotenoids, astaxanthin, recovery percentage, and antioxidant properties.

Results and discussion: According to the results, the highest yield of astaxanthin was obtained from shrimp (80.39 ± 1.09 µg/ml) using the microwave method. Therefore, shrimp was identified as a better source of astaxanthin compared to gammarus. Furthermore, the recovery percentage and total carotenoid content for shrimp were 93% and 59%, and 83.54 ± 0.56 ml/g and 77.98 ± 1.33 ml/g for the microwave and soaking methods, respectively, indicating the superiority of the microwave-assisted extraction. In addition, the antioxidant activity of astaxanthin extracted by the soaking method was higher than that of the microwave method. Compared to the synthetic antioxidant BHT, the antioxidant activity of astaxanthin was always greater, and increased with concentration.

Conclusion: Crustacea waste can be used as the cheapest raw material for the extraction of carotenoid pigments. On the other hand, considering that the usual methods of carotenoid extraction are time-consuming and require a lot of solvent, the use of modern extraction methods such as microwave has become common today. Overall, based on the findings of this study, shrimp waste can be considered a suitable and effective source for astaxanthin extraction using microwave-assisted methods.

پژوهش‌های صنایع غذایی

شاپا الکترونیکی: ۵۶۹۱-۲۶۷۶ ، شاپا چاپی ۵۱۵x- ۲۰۰۸

https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

مقایسه استخراج رنگدانه آستاگزانتین از پوست میگو و سخت‌پوست گاماروس به کمک مایکروویو و خیساندن در میکروامولسیون مایع یونی در آب

پریسا فیضی[۱]، یحیی مقصودلو[۲] ✉، هدی شهیری طبرستانی[۲]، سید مهدی جعفری[۲] و امیر هوشنگ بحری[۳]

[۱] دکترای فناوری مواد غذایی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۲]استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۳]دانشیار گروه علوم شیلات مرکز تحقیقات فناوری های دریایی و شیلاتی واحد بندر عباس دانشگاه آزاداسلامی بندرعباس

✉ مسئول مکاتبه:y.maghsoudlou@gau.ac.ir

مشخصات مقاله

نوع مقاله:
علمی پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۵/۸
بازنگری: ۱۴۰۴/۲/۹
پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۴

کلید واژه:
آستاگزانتین، امواج مایکروویو، روش استخراج سنتی، ضایعات سخت پوستان، قدرت آنتی اکسیدانی

چکیده

زمینه مطالعاتی: ضایعات سخت‌پوستان می‌توانند به‌عنوان ارزان‌ترین مواد اولیه جهت استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی استفاده شوند. از طرف دیگر باتوجه به اینکه روش‌های معمول استخراج کارتنوئیدها زمان‌بر بوده و نیاز به حلال زیادی دارند امروزه استفاده از روش‌های نوین استخراج مانند مایکروویو رایج شده است.

هدف: این پژوهش با هدف مقایسه استخراج آستاگزانتین از پوست میگوی‌موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت‌پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) به کمک دو روش خیساندن و مایکروویو انجام شد.

روش کار: پس از تهیه پودر نمونه‌ها و میکروامولسیون مایع یونی در آب، فرایند استخراج با نسبت ۵ برابر حلال به نمونه، به کمک روش خیساندن در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت و روش مایکروویو با فرکانس ۲/۴۵ گیگاهرتز، توان ۱۰۰ وات و زمان ۹۱/۸۱ ثانیه انجام شد.

نتایج: طبق یافته‌ها بیشترین میزان استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی ۱/۰۹± ۸۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کمک روش مایکروویو بدست آمد. طوریکه میگوی موزی نسبت به سخت‌پوست گاماروس منبع بهتری برای استخراج آستاگزانتین بود. علاوه براین درصد بازیافت و مقدار کاروتنوئید کل برای میگوی موزی با استفاده از روش مایکروویو و خیساندن به ترتیب ۹۳ و ۵۹ درصد، ۰/۵۶±۸۳/۵۴ و ۱/۳۳±۷۷/۹۸ میلی لیتر بر گرم بود که نشان دهنده برتری روش مایکروویو نسبت به روش خیساندن است. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده از روش سنتی بالاتر از روش مایکروویو بود و در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزیBHT، با افزایش غلظت همواره فعالیت آنتی اکسیدانی در هر دو روش پایین‌تر از BHT بود.

نتیجه گیری: به‌طور کلی طبق یافته‌های پژوهش حاضر ضایعات میگوی موزی منبع مناسبی برای استخراج رنگدانه آستاگزانتین می‌باشد.

DOI: 10.22034/FR.2026.62708.1940

OPEN ACCESS

CC BY NC

مقدمه

تنوع و خاصیت ضدسرطانی رنگدانه‌های کارتنوئیدی باعث شده است تا این رنگدانه‌ها مورد توجه زیادی قرار گیرند. کاروتنوئیدها رنگدانه‌های زرد و قرمز هستند که در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات یافت می‌شوند(فیدور و بوردا، ۲۰۱۴). کاروتنوئیدها باعث غیرفعال شدن عوامل شروع کننده واکنش‌های شیمیایی مضر مانند رادیکال‌های آزاد می‌شوند. از طرف دیگر به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع جلوگیری می‌کنند و عملکرد مهمی را در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی - بهداشتی از خود نشان داده‌اند (ساچیندرا و ماهندراکار،۲۰۰۵). تحقیقات بسیاری در مورد استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از سخت‌پوستانی همچون خرچنگ و میگو انجام شده است (پارجیکلایی، الحوری، فرته و کریستنسن، ۲۰۱۵؛ سومیا و ساچیندرا، ۲۰۱۵) که آستاگزانتین و استرهای آن بیشترین فراوانی را دارند(ساچیندرا، باسکار و ماهندراکار،۲۰۰۶). در بین گونه‌های مهم میگو، میگوی موزی دومین گونه تجاری مهم موجود در آب‌های هرمزگان است. از بین سخت پوستان، گاماروس یک سخت پوست ناجورپا و گونه تجاری مهم برخی کشورها است و غلظت بالایی از مواد کاروتنوئیدی، پروتئین، انواع مختلف آنزیم‌ها و اسیدهای چرب ضروری غیراشباع را دارا می‌باشد. این سخت پوست در پاکسازی محیط آبزیانی مانند ماهی قزل آلا نقش مهمی دارد و وجود آن ها در جیره غذایی ماهی سبب افزایش میزان هضم و جذب غذا و در نتیجه افزایش عملکرد رشد می‌شود(اسکوبار-لوکس، پارسونز، ساموئلسن، و آگنالت، ۲۰۲۰). در مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر، این سخت پوست اقیانوس اطلس به عنوان یک منبع غنی از رنگدانه‌های کارتنوئیدی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (نعمتی، شکری و پازوکی، ۲۰۱۵). روش‌های متنوعی برای استخراج رنگدانه‌ها وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش‌های شیمیایی (هوشمند، شعبانپور، موسوی نسب و گلمکانی، ۲۰۱۷)، میکروبی (داس و همکاران،۲۰۰۷) و استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک (ان-ساچیندرا و ماهندراکار،۲۰۱۱) اشاره کرد. هر کدام از روش‌های استخراج ذکر شده دارای مزایا و معایبی هستند. روش متداول خیساندن جهت استخراج رنگدانه‌های کارتنوئیدی معمولاً زمان‌بر بوده و با صرفه هزینه بالا و حجم زیاد حلال همراه می‌باشند. همچنین در بیشتر موارد این روش‌ها دارای راندمان کمتری در مقایسه با روش‌های جدید نظیر استخراج به کمک مایکروویو و فراصوت هستند (لی، فابیانو-تیکسیر، تومائو، کراوتو، و چمت، ۲۰۱۳). استخراج به کمک مایکروویو براساس جذب انرژی مایکروویو توسط مولکول‌های قطبی ترکیبات شیمیایی است (روتری و اورسات، ۲۰۱۲). در سال‌های اخیر در جهت کاهش اثرات حلال‌های فرار و سمی، از مایعات یونی[1] آب دوست به عنوان حلال پخش‌کننده 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 حلال‌های سبز در نظرگرفته شده و دارای ساختار مولکولی متشکل از کاتیون‌ها و آنیون‌های مختلف است (خو و همکاران، ۲۰۱۹). 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 بیومولکول‌ها را در صنایع غذایی و شیمیایی فراهم می‌کند (امیری ریگی و عباسی، ۲۰۱۹). از لحاظ تعریف، امولسیون یک سامانه ناامتجانس از دو مایع غیرقابل امتزاج است که در چنین سامانه‌ای یکی از مایع‌ها در مایع دیگر به صورت قطره‌هایی با اندازه 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

[1] Ionic liquids

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 نانومتر است. 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 (فیضی و همکاران، ۱۴۰۲). میکروامولسیون مایع یونی به دلیل داشتن قطبیت قابل تنظیم، کشش سطحی پایین و تولنایی حل‌پذیرسازی ترکیبات هیدروفوبیک، محیطی مناسب برای آزادسازی و استخراج آستاگزانتین فراهم می‌کند. همچنین پایداری بالا و توان نفوذ در ماتریس زیستی باعث افزایش بازده استخراج نسبت به حلال‌های سنتی می‌شود.تا به امروز، از میکروامولسیون‌ها برای استخراج پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها و عناصر کمیاب استفاده کرده‌لند. از آنجایی که درصد بالایی از آبزیان را ضایعاتی تشکیل می‌دهد که دارای ترکیبات ارزش افزوده فراوانی هستند و استخراج آن‌ها نه تنها موجب رونق اقتصادی صنعت شیلات می‌شود بلکه به حفظ محیط زیست نیز کمک شایانی می‌نماید. اخیراً تحقیقات زیادی با استفاده از روش‌های جدید به منظور استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از منابع گیاهی صورت گرفته است. گائو و همکاران (۲۰۲۰)، به استخراج آستاگزانتین از ضایعات میگو با استفاده از امواج فراصوت و میکروامولسیون مایع یونی پرداختند. میکروامولسیون حاوی تری بوتیل اوکتیل فسفونیوم بروماید، باعث افزایش قابل توجه استخراج آستاگزانتین به دلیل برهمکنش‌های الکترواستاتیک قوی‌تر و پیوند هیدروژنی شد (گائو و همکاران، ۲۰۲۰). در همین راستا، نونس و همکاران (۲۰۲۱)، به استخراج آستاگزانتین به عنوان یک کارتنوئید با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالا از ضایعات اسکلت بیرونی خرچنگ، برای کاربرد در محصولات غذایی پرداختند. در این استخراج از یک مرحله پیش تیمار به کمک امواج مایکروویو (با حلال‌های هیدروالکلی با ۵۰-۰ درصد حجم آب در دماهای مختلف ۴۰ تا ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد) و استخراج با سیال فوق بحرانی (در فشار ۵۰۰-۲۰۰ بار، دمای ۴۰ -۶۰ درجه سانتی گراد و محتوای اتانول ۱۳-۸ درصد وزنی) استفاده شد. محتوای آستاگزانتین استخراجی ۱۲ برابر بیشتر از استخراج با روش سنتی سوکسله گزارش شد که نشان می‌دهد این روش پیشنهادی به طور قابل توجهی راندمان استخراج را بهبود می‌بخشد (نونس و همکاران، ۲۰۲۱). با توجه به بررسی منابع انجام شده تا کنون هیچ مطالعه‌ای برروی استخراج آستاگزانتین از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با استفاده از روش مایکروویو و میکروامولسیون مایع یونی در آب انجام نشده است. لذا این پژوهش با هدف مقایسه روش استخراج مایکروویو و خیساندن به کمک میکروامولسیون مایع یونی در آب برای استخراج آستاگزانتین از پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با تایید نوع گونه از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس تهیه شدند. رنگدانه آستاگزانتین تجاری با خلوص بیشتر از ۹۸ درصد ،DPPH[1] و BHT[2] از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. پروپانول با درجه تجزیه‌ای HPLC و مایع یونی تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید[3] (p۴۴۴۸)Br)و تریتون ایکس ۱۰۰[4] با خلوص بیشتر از ۹۹درصد و نرمال بوتانول با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند. کلیه آزمایشات در معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان انجام گرفت.

[1] 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl
[2] Butylated hydroxytoluene
[3] Tributyloctylphosphonium Bromide
[4] Triton X-100

آماده سازی نمونه‌ها

پوسته میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با آب مقطر به خوبی شسته شدند و در خشک کن انجمادی (Christ-Alpha–LD freeze dryer، آلمان)، ۵۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس پودر شدند. پودرهای حاصل بعد از الک کردن در یخچال نگهداری شدند (گائو و همکاران، ۲۰۲۰).

آماده سازی حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب

حلال مورد استفاده میکروامولسیون مایع یونی در آب است که با توجه به تشکیل خود به خودی میکروامولسیون بدون صرف انرژی و فقط با هم زدن معمولی به مدت ۵ دقیقه تحت دمای محیط به روش زیر تهیه شد (گائو و همکاران، ۲۰۲۰): تری بوتیل اکتیل فسفونیوم بروماید: تریتون ایکس ۱۰۰– نرمال بوتانول (با نسبت۳ به ۱ تریتون ایکس ۱۰۰ به نرمال بوتانول): آب، به ترتیب با نسبت‌های جرمی۰/۱۳: ۰/۲۵: ۰/۶۲ مخلوط شدند. این ترکیبات به‌ترتیب فاز غیر قطبی، سورفاکتانت–کمک سورفاکتانت و فاز قطبی میکروامولسیون را تشکیل دادند. این حلال در دمای اتاق قابل نگهداری است.

نحوه استخراج با روش سنتی خیساندن و استخراج با مایکروویو

برای استخراج آستاگزانتین از پودر لیوفیلیزه پوست میگوی موزی و سخت پوست گاماروس به روش سنتی خیساندن از حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب (۵:۱، حجمی/وزنی) در دمای محیط و به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. استخراج با مایکروویو نیز تحت شرایط از پیش بهینه شده با فرکانس ۲/۴۵ گیگاهرتز در نسبت ۵ برابرحلال به نمونه، توان۱۰۰ وات و زمان ۹۱/۸۱ ثانیه انجام شد (فیضی و همکاران، ۲۰۲۵). پس از استخراج، عصاره بدست آمده با اتانول رقیق شد و سپس با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر شد تا برای آنالیز آماده گردد (فان و همکاران، ۲۰۱۹).

آزمون‌ها

ارزیابی محتوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل)

محتوای کاروتنوئید کل با استفاده از اندازه‌گیری‌های اسپکتروفتومتری طبق روش گزارش شده توسط هوچ و همکاران (۲۰۱۶) تعیین شد. جهت تعیین محتوای کل کاروتنوئیدها، جذب ۴ میلی‌لیتر از محلول‌های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر مرئی–فرابنفش[1] (Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد و از ضریب خاموشی ویژه آستاگزانتین۲۱۰۰ 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[2] (TAC) بر حسب میلی لیتر بر گرم 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 است.

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

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 بعنوان حلال رنگدانه خالص آستاگزانتین رسم گردید. جذب آستاگزانتین عصاره‌ها در طول موج ۴۷۸ نانومتر ($OD_{۴۷۸}$) دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS لندازه‌گیری 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 (خو و همکاران،۲۰۲۰).

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

$$y = 1.97X$$ معادله(۳)

محاسبه درصد بازیافت آستاگزانتین

برای این منظور عصاره‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. درصد بازیافت آستاگزانتین با محاسبه درصدآستاگزانتین

[1] Spectrophotometr

[2] Total astaxanthin content

استخراج شده تحت هریک از شرایط استخراج از مقدار آستاگزانتین کل نمونه طبق معادله (۴) حاصل شد (روئین نگام و همکاران، ۲۰۱۰).

معادله(۴)

$$\text{بازیابی٪} = \frac{\text{عصاره آستاگزانتین}}{\text{آستاگزانتین کل}} \times ۱۰۰$$

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 اتانولیDPPH در غلظت ۰/۲ میلی مولار تهیه شد. ۲میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۰/۷۵-۰/۰۵) جهت بررسی روند تغییرات با ۲ میلی لیتر از محلول اتانولیDPPH ترکیب شدند. جذب نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط و شرایط تاریکی در ۵۱۷ نانومتر اندازه گیری و فعالیت مهار رادیکال DPPH بر اساس معادله (۵) محاسبه شد. این آزمون با قابلیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌اکسیدان سنتزیBHT به عنوان شاهد در غلظت‌های مشابه مقایسه شد (ژائو، ژانگ، اف یو، زی هو، و ژانگ، ۲۰۱۶).

معادله(۵)

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

A_0: جذب محلول DPPH بدون نمونه

A: جذب نمونه مخلوط با محلول DPPH

A_b: جذب نمونه بدون محلولDPPH

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به صورت تصادفی با استفاده ازآزمون استیودنت(Student's-t) در سطح خطای ۰/۰۵ با نرم افزار SPSS 26.0 انجام گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. تمامی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی متوای کل کاروتنوئیدها (آستاگزانتین کل)

نتایج مربوط به محتوای کل کاروتنوئید (آستاگزانتین کل) استخراج شده از نمونه‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با استفاده از روش‌های استخراج سنتی (خیساندن) و مایکروویو به کمک میکروامولسیون مایع یونی در آب (نسبت ۵ برابر حلال به نمونه) در جدول ۱، نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده از جدول ۱، میزان کل کارتنوئید استخراج شده از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) در روش مایکروویو 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 سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. سومیا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود گزارش دادند، میگو یک منبع مهم برای استخراج کاروتنوئیدها بویژه آستاگزانتین می‌باشد که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد (سومیا، راویکومار، ویوک، راتیناراج و ساچیندرا، ۲۰۱۴). فیضی و همکاران (۱۴۰۲) در تحقیق مشابه پیرامون 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 به روش خیساندن در نسبت های مختلف حلال به نمونه ۵، ۱۲/۵ و ۲۰ برابر نشان دادند میگوی موزی مقدار آستاگزانتین کل بالاتری نسبت به سخت پوست گاماروس دارد. همچنین این محققان حلال میکروامولسیون مایع یونی در آب را به عنوان حلال سبز مناسب برای استخراج آستاگزانتین معرفی کردند. گزارش این محققان با نتایج بدست آمده در این پژوهش همخوانی دارد. گزارش شده است که در موادی که دارای مقداری رطوبت می‌باشند همان طوری که انرژی مایکروویو

جذب می‌شـــود و متعاقبا به انرژی گرمایی تبدیل می‌گردد، رطوبت شروع به تبخیـر می‌کند. تبخیر آن موجـب ایجاد فشار درون دیواره سلول و منجر به از هم گسیختگی ســـــلول‌ها می‌گردد و در نهایت منجر به خـروج مـواد متشکله فعال بـه حـلال اطراف آن می‌شود و بازده استخراج را افزایش می‌دهـد. همچنـین بـه کار بردن قدرت بالاتر مایکروویو برای یک زمان ممکن است راهکار مـوثرتری بـرای اسـتخراج ترکیبـات فنـولی باشـد (بالارد، مالیکارجونان، ژو و اوکیف، ۲۰۱۰). این گزارش یافته‌های بدســـت آمده در پژوهش حاضـــر را تأیید می‌نماید.

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

Extraction method	*Fenneropenaeus merguiensis*	*Pontogammarus maeoticus*
	Solvent to sample ratio	Solvent to sample ratio
	5	5
soaking (traditional method)	77.98 ± 1.33^{bA}	74.07 ± 0.67^{bB}
microwave	83.54 ± 0.56^{aA}	77.26 ± 1.62^{aB}

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

درپژوهش حاضر برای محاسبه منحنی استاندارد از رگرسیون خطی جهت بدسـت آوردن معادله خط اسـتفاده شـد. ضـرایب تعیین(R^2) مقدار (۰/۹۹۵۲)خطی بودن مطلوب را در محدوده انتخاب شـده برای آسـتاگزانتین نشـان می‌دهد. نتایج حاصـل از اسـتخراج آسـتاگزانتین با اسـتفاده از روش سـنتی خیسـاندن و مایکروویو به کمک میکروامولســیون مایع یونی در آب در جدول ۲، نشـان داده شـده اسـت. طبق نتایج آسـتاگزانتین مـوجـود در مـیـگـوی مـوزی *Fenneropenaeus merguiensis*) در هردو روش بالاتر از آسـتاگزانتین موجود در ســـخـت پوســـت گـامـاروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشـــد. علاوه براین نتایج نشـــان می‌دهد که روش مایکروویو بهتر از روش ســنتی می‌باشـد. بطور مشـابه علیزاده خالدآباد (۲۰۲۰) در بررســی مقایســه‌ای روش پرس سرد و مایکروویو برای استخراج روغن از پسته نشان دادند که استفاده از پیش تیمار مایکروویو در مقایسه با پرس سرد باعث افزایش محتوای رنگدانه کلروفیل در روغن می‌شود و علت آن را دناتوره شـدن پروتئین‌های دیواره سـلولی، تخریب دیواره سلولی و در نتیجه آزادسازی بیشتر ترکیبات زیست فعال مثل رنگدانه‌ها در اثر اســتفاده از امواج مایکروویو گزارش دادند (علیزاده، خالدآباد، ۲۰۲۰).

Table2. Astaxantin extracted (µg/ml) from *Pontogammarus maeoticus and Fenneropenaeus merguiensis* using soaking (traditional method) and microwave

Extraction method	*Fenneropenaeus* merguiensis	*Pontogammarus maeoticus*
	Solvent to sample ratio	Solvent to sample ratio
	5	5
soaking (traditional method)	$0.91^{bA}\pm54.22$	$1.35^{bB}\pm36.39$
Microwave	$1.09^{aA}\pm80.39$	$0.58^{aB}\pm71.43$

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.

فیضـــی و همکاران (۱۴۰۲) نیز در مطالعه‌ای خود گزارش دادند که مقدار آسـتاگزانتین اسـتخراج شـده از میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) بالاتر از سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشـــد. این گزارش نتایج بدســـت آمده در این پژوهش را تائید می‌نماید. همچنین در مطالعه نونس و همکاران در ســـال ۲۰۲۱، که برروی اســـتخراج آســـتاگزانتین به عنوان یک کارتنوئید با ظرفیت آنتی اکســـیدانی بالا از ضـــایعات اســـکلت بیرونی خرچنگ، انجام شـــد. گزارش شـــد که اســـتفاده از امواج

مایکروویو در مقایسه با روش سنتی سوکسله باعث افزایش مقدار آستاگزانتین استخراج از خرچنگ می‌شود. در مطالعه مشابه دیگری که توسط رضایی ارمی و همکاران(۱۳۹۲) برروی استخراج عصاره برگ گردو با استفاده از روش سنتی خیساندن و روش مایکروویو انجام شد گزارش دادند که استفاده از روش مایکروویو در مقایسه با روش سنتی باعث استخراج بیشتر ترکیبات فنلی در مقایسه با روش سنتی می‌گردد (رضایی ارمی و همکاران، ۱۳۹۲).

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 (۴)، بدست آمد و نتایج حاصل از درصد بازیافت آستاگزانتین از نمونه‌های میگوی موزی (*Fenneropenaeus merguiensis*) و سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) با استفاده از روش سنتی خیساندن و روش مایکروویو در جدول ۳، نشان داده شده است. طبق نتایج بدست آمده درصد بازیافت آستاگزانتین از میگوی موزی *Fenneropenaeus* (*merguiensis*) بالاتر از سخت پوست گاماروس (*Pontogammarus maeoticus*) می‌باشد. علاوه براین درصد بازیافت استخراج آستاگزانتین در روش مایکروویو بالاتر از روش خیساندن می‌باشد. این نتایج کارایی بالای روش مایکروویو در استخراج آستاگزانتین و افزایش درصد بازیافت استخراج در مقایسه با روش سنتی را نشان می‌دهد.

در مطالعه روئین نگام و همکاران (۲۰۱۰) مقادیر آستاگزانتین استخراج شده با روش مایکروویو با آستاگزانتین استخراج شده با حلال حاصل از روش‌های معمولی مقایسه گردید. این محققان با استخراج آستاگزانتین به کمک مایکروویو در ۷۲۰ وات و حلال های مختلف متانول، اتانول، استونیتریل و استون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نشان دادند که روش مایکروویو از کارایی بهتری برخوردار است و به کمک مایکروویو و حلال استون بیشترین میزان بازیافت و استخراج آستاگزانتین (۷۴ درصد) درمدت زمان نسبتا کوتاهی بدست آمد. در مطالعه دیگری در این راستا، نونس و همکاران در سال ۲۰۲۱، به استخراج آستاگزانتین به عنوان یک کارتنوئید با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالا از ضایعات اسکلت بیرونی خرچنگ، برای کاربرد در محصولات غذایی پرداختند.

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

Extraction method	*Fenneropenaeus* merguiensis	*Pontogammarus maeoticus*
	Solvent to sample ratio	Solvent to sample ratio
	5	5
soaking (traditional method)	0.41^{bA}±59.23	1.00^{bB}±46.00
microwave	0.57^{aA}±93.73	1.00^{aB}±88.24

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.

در این استخراج از یک مرحله پیش تیمار به کمک امواج مایکروویو با حلال هیدرو الکلی با ۵۰-۰درصد حجم آب در دماهای مختلف (۴۰ تا ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد) و استخراج با سیال فوق بحرانی (در فشار ۵۰۰-۲۰۰ بار، دمای ۴۰ -۶۰ درجه سانتی گراد و محتوای اتانول ۱۳-۸ درصد وزنی) استفاده شد. محتوای آستاگزانتین استخراجی ۱۲ برابر سریع تر از استخراج با روش سنتی سوکسله گزارش شد که نشان می‌دهد این روش پیشنهادی به طور قابل توجهی راندمان استخراج را بهبود می‌بخشد. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۲۳، اصلانبای گولر و همکاران به استخراج آستاگزانتین از جلبک *Haematococcus pluvialis* با استفاده از تکنیک مایکروویو پرداختند. عصاره آستاگزانتین جدا شده از نظر سمیت سلولی بر روی سلول‌های سرطانی ریه انسان مورد بررسی قرار گرفت. فرآیند استخراج به کمک مایکروویو در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و توان ۷۰۰ وات به مدت ۷ دقیقه، بالاترین بازیافت رنگدانه (۰/۵۴± ۱۲/۲۴ میلی گرم بر گرم سلول) را

به همراه داشت (اصلانبای گولر و همکاران، ۲۰۲۳). یافته‌های بدست آمده در پژوهش حاضر با این گزارش‌ها همخوانی دارد.

فعالیت مهارادیکال ۲،۲-دیفنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

آستاگزانتین به دلیل ساختمان مولکولی‌اش، 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 در 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 (علیزاده خالدآباد، ۲۰۲۰). فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین‌های استخراج شده با روش مایکروویو 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 (شکل ۱) نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده با استفاده از روش سنتی خیساندن بالاتر از روش مایکروویو می‌باشد. آستاگزانتین و سایر کاروتنوئیدها ترکیباتی حساس به حرارت و نور هستند و قرار گرفتن در معرض انرژی بالای مایکروویو می‌تواند موجب تخریب جزئی، ایزومریزاسیون یا اکسیداسیون این ترکیبات شود و در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها کاهش یابد. از سوی دیگر، در شرایط مایکروویو امکان تشکیل رادیکال‌های آزاد ثانویه یا محصولات جانبی تجزیه لیپیدها وجود دارد که می‌توانند موجب کاهش توان آنتی‌اکسیدانی عصاره شوند. همچنین شدت بالای استخراج در مایکروویو ممکن است ترکیبات غیرآنتی‌اکسیدانی یا مزاحم را نیز وارد عصاره کرده و در آزمون‌های سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانند DPPH تداخل ایجاد کند. در مقابل، روش خیساندن به دلیل انجام در شرایط ملایم‌تر (دمای محیط و زمان طولانی‌تر)، تخریب ساختاری کمتری ایجاد کرده و بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین در این روش بالاتر باقی می‌ماند. از طرفی علاوه براین فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج شده در هر دو روش پایین تر از فعالیت آنتی اکسیدانی BHT می‌باشد (شکل ۱). گرمسیری و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی کارآمدی امواج مایکروویو در استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جلبک قرمز *Hypnea hamulosa* گزارش دادند با افزایش توان مایکروویو قدرت مهار رادیکال آزاد توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استخراج شده از جلبک *قرمز Hypnea hamulosa* افزایش یافت (گرمسیری و همکاران، ۱۳۹۳). رضایی ارمی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه‌ای که برروی مقایسه روش سنتی خیساندن و روش مایکروویو برای استخراج عصاره برگ گردو انجام دادند. گزارش کردند که استفاده از روش مایکروویو باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره استخراج شده در مقایسه با روش سنتی خیساندن می‌شود. علت این امر را محتوای فنل بیشتر عصاره استخراج شده به روش مایکروویو نسبت به روش سنتی گزارش دادند.

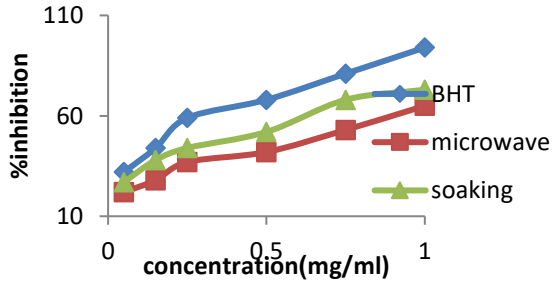

Figure 1. DPPH radical scavenging activity of astaxanthin extracted by soaking and microwave compared to BHT

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در استخراج آستاگزانتین از دو منبع میگوی موزی (*Fenneropenaeus* merguiensis) و سخت پوست گاماروس(*Pontogammarus maeoticus*)، میگوی موزی به عنوان منبع با بالاترین میزان آستاگزانتین استخراجی می‌باشد. علاوه براین مقایسه دو روش استخراج خیساندن و مایکروویو برای استخراج آستاگزانتین نشان داد که روش مایکروویو نسبت به روش خیساندن روش کارآمدتری می‌باشد. بنابراین می‌تولند یک روش جایگزین

مناسب برای روش سنتی استخراج باشد. همچنین نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH در آستاگزانتین استخراج شده توسط دو روش مورد استفاده 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 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

Alizadeh Khaledabad, M. (2020). Effect of roasting and microwave pre-treatments of pistachios on the yield and the quality of the extracted oil. *Journal of food science and technology (Iran), 17*(102), 43-51.

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

Aslanbay Guler, B., Saglam-Metiner, P., Deniz, I., Demirel, Z., Yesil-Celiktas, O., & Imamoglu, E. (2023). Aligned with sustainable development goals: microwave extraction of astaxanthin from wet algae and selective cytotoxic effect of the extract on lung cancer cells. *Preparative Biochemistry & Biotechnology, 53*(5), 565-571.

Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food chemistry, 120*(4), 1185-1192.

Das, A., Yoon, S.-H., Lee, S.-H., Kim, J.-Y., Oh, D.-K., & Kim, S.-W. (2007). An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology, 77*, 505-512.

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.

Fan, Y., Niu, Z., Xu, C., Yang, L., Chen, F., & Zhang, H. (2019). Biocompatible protic ionic liquids-based microwave-assisted liquid-solid extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Industrial Crops and Products, 141*, 111809.

Feizi, P., Maghsoudlou, Y.,ShahiriTabarestani, H., Jafari, S. M., & Bahri, A.-H. (2025). Green astaxanthin extraction using microwave and ultrasound pretreatments. *npj Science of Food, 9*(1), 147 **.**

Feizi, P., Maqsoodlou, Y., Shahiri Tabarestani, H., Jafari, S. M., & Bahri, A. (2023). Comparison of astaxanthin extraction from shrimp (Fenneropenaeus merguiensis) and gammarus (Pontogammarus maeoticus) using organic solvent, sunflower oil and ionic liquid microemulsion in water. Iran Food Science and Industry Research Journal, 1265

Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients, 6*(2), 466-488.

Garmsiri, A., Rezaei, M., Shoiklu, A. Babakhani, A. (2014). Investigation of the efficiency of microwaves in extracting antioxidant compounds from the red algae Hypnea hamulosa and optimization of extraction conditions using response surface methodology (RSM). Iranian Journal of Food Science and Technology Research

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 bioproducts processing, 99*, 1-11.

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 biphasic flotation for efficient extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. *Ultrasonics sonochemistry, 67*, 105052.

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.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Tomao, V., Cravotto, G., & Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics sonochemistry, 20*(1), 12-18.

Nemati, H., Shokri, M. R., & Pazooki, J. (2015). Does beach seine fishery permanently alter macroinvertebrate communities and sediment characteristics in the S outhern C aspian S ea? *Marine Ecology, 36*(3), 408-418.

Nunes, A. N., Roda, A., Gouveia, L. F., Fernandez, N., Bronze, M. R., & Matias, A. A. (2021). Astaxanthin extraction from marine crustacean waste streams: An integrate approach between microwaves and supercritical fluids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 9*(8), 3050-3059.

Parjikolaei, B. R., El-Houri, R. B., Fretté, X. C., & Christensen, K. V. (2015). Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (Pandalus borealis) processing waste. *Journal of Food Engineering, 155*, 22-28.

Rezai Erami S, Jafari SM, Khomeiri M, Bayat H. Extraction of walnut leaves extracts with microwave assisted extraction and evaluation of antioxidant properties of phenolic compounds. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 2014 Jan 21;29(4):879-98.

Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology, 5*, 409-424.

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.

Sachindra, N., Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. (2006). Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management, 26*(10), 1092-1098.

Sachindra, N., & Mahendrakar, N. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource technology, 96*(10), 1195-1200.

Sachindra, N. M., & Mahendrakar, N. S. (2011). Effect of protease treatment on oil extractability of carotenoids from shrimp waste. *Journal of aquatic food product technology, 20*(1), 22-31.

Soumya, R., & Sachindra, N. (2015). Carotenoids from fishery resources. *Fish processing byproducts: quality assessment and applications. Studium Press, Houston*, 273-298.

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.

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.