

بهینه سازی فرایند استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ آبی (*Portunus pelagicus*) و میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) توسط امواج فراصوت و مایکروویو

حنیف هوشمند^۱، بهاره شعبانپور^{۱*}، مرضیه موسوی نسب^۲، علیرضا عالیشاهی^۱، محمد تقی گلمکانی^۳

۱. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم و کشاورزی منابع طبیعی گرگان

۲. گروه پژوهشی فرآوری آبزیان، دانشگاه شیراز

۳. بخش صنایع غذایی، دانشگاه شیراز

تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۳

شناسه دیجیتال (DOI): [10.22113/jmst.2018.105737.2084](https://doi.org/10.22113/jmst.2018.105737.2084)

چکیده

ضایعات خرچنگ و میگو می‌توانند به‌عنوان ارزان‌ترین مواد اولیه جهت استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی استفاده شوند. استخراج این ترکیبات ارزشمند از ضایعات آبزیان نه تنها موجب رونق صنعت فرآوری آبزیان می‌شوند، همچنین آلودگی زیست محیطی را نیز کاهش می‌دهند. در این تحقیق از آستاگرانترین به‌عنوان ترکیب هدف استخراج با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت آنالیز مقدار رنگدانه های استخراجی توسط امواج فراصوت و مایکروویو با توجه به فاکتورهای تعداد دفعات و مدت زمان استخراج، توان دستگاه فراصوت و مایکروویو و نسبت حلال به ضایعات برای بدست آوردن بهترین شرایط استخراج استفاده گردید. نتایج بدست آمده جهت استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی توسط امواج فراصوت از ضایعات خرچنگ، ۳ بار استخراج با نسبت ۱۵ برابر حلال به ضایعات با توان ۹۰ وات به مدت ۳۰ ثانیه می‌باشد. که در نهایت مقدار رنگدانه‌ی $1407/12 \pm 0/584 \mu\text{g/g}$ بدست آمد و از ضایعات میگو ۱ بار استخراج با نسبت ۱۰ برابر حلال به ضایعات با توان ۱۵۰ وات به مدت ۱۰۵ ثانیه می‌باشد که در نهایت مقدار رنگدانه‌ی $1257/43 \pm 0/023 \mu\text{g/g}$ بدست آمد. بهترین شرایط استخراج رنگدانه‌ی کاروتنوئیدی به کمک مایکروویو از ضایعات خرچنگ، ۳ بار استخراج با نسبت ۱۵ برابر حلال به ضایعات با توان ۴۰۰ وات به مدت ۶ ثانیه می‌باشد که در نهایت مقدار رنگدانه‌ی بدست آمده $0/25 \mu\text{g/g}$ برابر $1082/07$ می‌باشد و از ضایعات میگو ۳ بار استخراج با نسبت ۱۵ برابر حلال به ضایعات با توان ۶۰۰ وات به مدت ۶ ثانیه می‌باشد که در نهایت مقدار رنگدانه‌ی استخراج شده $1470/25 \pm 0/47 \mu\text{g/g}$ بدست آمد. در مقایسه با روش مرسوم (خیساندن)، حداقل میزان استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ و میگو به ترتیب ۹۵ و ۱۷ برابر شده است. در نتیجه روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی شرایط فرآیند، از روش‌های موثر برای استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ و میگو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: روش سطح پاسخ، بهینه‌سازی استخراج، کاروتنوئید، سخت‌پوستان، امواج فراصوت و مایکروویو

* نویسنده مسئول، ایمیل: b_shabanpour@yahoo.com

۱. مقدمه

شیمیایی (Hooshmand et al., 2017; Coral-
Hinostrroza and Bjerkgeng., 2002; Felix-
Bhosale) میکروبی (Valenzuela et al., 2001
et al., 2004; Khanafari et al., 2007; Das et
al., 2007) و استفاده از هضم آنزیمی توسط
آنزیم‌های پروتئولیتیک^۳ (Sachindra et al., 2011;)
(Sachindra et al., 2007; Barzana et al., 2002
اشاره کرد. هر کدام از روش‌های استخراج یاد شده
دارای مزایا و معایبی هستند. روش متداول
خیساندن جهت استخراج رنگدانه‌های
کاروتنوئیدی معمولاً زمان‌بر بوده و با صرف 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 دستگاه فراصوت و مایکروویو هستند. که
می‌توان با استفاده از این تکنولوژی‌ها از معایب
آن‌ها کاسته و به مقدار استخراج رنگدانه‌ها اضافه
کرد. کاربردهای امواج فرا صوت در صنعت غذا رو
به افزایش است و از موارد کاربردهای آن می‌توان
در هموزن کردن، از بین بردن میکروارگانیسم‌ها،
تهیه امولسیون‌ها و استخراج اسانس‌ها و رنگدانه
ها اشاره نمود (Li et al., 2013). امواج صوتی،
ارتعاشات مکانیکی هستند که برای انتشار نیاز به
محیط مادی دارند. نیاز امواج صوتی به محیط
مادی برای انتشار، تفاوت اصلی این امواج با امواج
الکترومغناطیسی است. زمانیکه امواج صوتی انتشار
می‌یابند باعث ایجاد سیکل‌های انبساط و انقباض
در محیط می‌شوند. در سیکل انبساط مولکول‌ها
از هم جدا می‌شوند در حالیکه در سیکل انقباض
مولکول‌ها به سمت هم کشیده می‌شوند. انبساط
ایجاد شده از طریق امواج فراصوت می‌تواند حباب
ها و حفره‌هایی را در درون مایع بوجود آورد.
فرایند تشکیل، رشد و متلاشی شدن حباب‌ها به

کشف خاصیت ضد سرطانی ویتامین آ و بتا
کاروتن باعث شد رنگدانه‌های کاروتنوئیدی که
دارای تنوع زیادی هستند، مورد توجه قرار بگیرند.
در حال حاضر بیش از ۶۵۰ رنگدانه کاروتنوئیدی
طبیعی شناخته شده است. کاروتنوئیدها رنگدانه
های زرد و قرمز هستند که در موجوداتی مانند:
باکتری‌ها، قارچ، گیاهان و حیوانات یافت می
شوند (Fiedor and Burda, 2014). کاروتنوئیدها
باعث غیر فعال شدن عوامل شروع کننده واکنش
های شیمیایی مضر مانند اکسیژن آزاد^۱، سه گانه
حساس فتوشیمیایی^۲ و رادیکال‌های آزاد می
شوند، که در غیر این صورت این عوامل به طور
بالقوه در سیستم‌های بیولوژیکی، موجب سرطان
می‌شوند. بنابراین رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به
عنوان کمک کننده عملکرد سیستم ایمنی بدن در
پستانداران شناخته می‌شوند (Cicccone et al.,
2013) و علاوه بر آن به دلیل خاصیت قوی آنتی
اکسیدانی از اکسیداسیون اسیدهای چرب
غیراشباع جلوگیری می‌کند و عملکرد مهمی را
در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی بهداشتی از
خود نشان داده اند (Sachindra and
Mahendrakar, 2005). تحقیقات بسیاری در
زمینه استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از سخت
پوستانی همچون میگو و خرچنگ انجام شده است
(Tsiaka et al., 2015; Parjikolaei et al., 2015;)
Sawmya and Sachindra., 2015; Mezzomo et
al., 2011) که آستاگزانتین و استرهای آن
بیشترین فراوانی را دارند (Sachindra et al.,
2006).

روش‌های متنوعی برای استخراج رنگدانه‌ها وجود
دارد که از آن جمله می‌توان به روش‌های

1. singlet oxygen
2. triplet photochemical sensitizers

3. Proteolytic

مشتاها محسوب می شود و میزان این گونه از نظر وزن $7/3$ درصد و از نظر فراوانی $2/2$ درصد کل صید مشتاها را شامل می شود (Kazemi et al., 1383). همچنین میگو ببری سبز گونه اصلی و مهم در آب های خلیج فارس می باشد که بیشترین کمیت را در صید صیدان به خود اختصاص داده (Moradi et al., 1391) و از آنجایی که درصد بالایی از آبزیان را ضایعاتی تشکیل می دهد که دارای ترکیبات ارزش افزوده فراوانی هستند و استخراج آن ها نه تنها موجب رونق اقتصادی صنعت شیلات می شود بلکه به حفظ محیط زیست نیز کمک شایانی می نماید. اخیرا تحقیقات زیادی با استفاده از این تکنیک ها به منظور استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از منابع گیاهی صورت گرفته است (Yolmeh et al., 2011; Li et al., 2013; Pasquet et al., 2014)، اما تا به حال هیچگونه تحقیقی بر روی بهینه سازی فرآیند استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از خرچنگ آبی و میگوی ببری سبز به عنوان گونه های مهم در خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از امواج فراصوت و مایکروویو انجام نگرفته است. لذا این مطالعه به منظور بهینه سازی فاکتورهای موثر بر روی استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ آبی (*Portunus pelagicus*) و میگوی ببری سبز (*Peneus semisulcatus*) توسط امواج فراصوت و مایکروویو انجام گردید.

۲. مواد و روش ها

خرچنگ ها با میانگین طول کاراپاس ۵۵ میلی متر و وزن ۱۲۰ گرم و میگوها با میانگین طول کاراپاس ۳۲ میلی متر و وزن ۳۸ گرم در مرداد ماه به صورت تازه صید شده از بازار محلی بندر بوشهر تهیه و با نسبت ۲ به یک یخ گذاری و در

کاویتاسیون^۱ یا حفره زائی معروف است (Goula, 2013). در این روش امواج فراصوت با فرکانس بالاتر از ۲۰ کیلو هرتز، به داخل ماده نفوذ کرده و موجب ایجاد کشیدگی و جمع شدن های پی در پی در آن شده که در نتیجه آن حفراتی در داخل ماده ایجاد می شود. این حفرات به صورت نامتقارن، به هم پیوسته و موجب خروج سریع مواد از داخل سلول ها به خارج از آن می شود. به علاوه این امواج می توانند موجب تخریب دیواره سلول های زیستی شده و موجب تسهیل خروج مواد گردند. متلاشی شدن حباب های کاویتاسیونی باعث بوجود آمدن تلاطم و اغتشاش در خلل و فرج بسیار ریز ذرات ماده می شوند که نفوذ گرایی و انتشار داخلی را تسریع می کند (Zhao et al., 2015). استخراج با کمک امواج مایکروویو براساس جذب انرژی مایکروویو توسط مولکول های قطبی ترکیبات شیمیایی است (Routray and Orsat, 2012). برای استخراج با کمک امواج مایکروویو، رطوبت موجود در ماده به عنوان هدف برای حرارت دهی امواج مایکروویو به کار برده می شوند. رطوبت، زمانی که در معرض تنش های حرارتی زیاد، فشار بالای موضعی و گرمایش مایکروویو قرار می گیرد، درون سلول ها حرارت می بیند و تبخیر می شود. فشار حاصل از تبخیر رطوبت باعث پاره شدن دیواره ی سلولی شده که تراوش اجزای فعال را از سلول های تخریب شده به حلال احاطه کننده تسهیل کرده و از این رو بازدهی استخراج اجزای ماده را بهبود می بخشد (Qiaoling et al., 2002).

گونه خرچنگ آبی که به سینگو^۲ معروف است، از گونه های موجود در سواحل جنوب کشور ایران می باشد که به عنوان یکی از صیدهای اصلی در

1. Cavitation
2. Singo

در مطالعه بهینه سازی استخراج توسط حلال استون از طرح مرکب مرکزی که شامل چهار متغیر (تعداد دفعات استخراج، نسبت حلال به ضایعات، توان دستگاه و مدت زمان استخراج) هر کدام در سه سطح و در مجموع شامل ۳۰ آزمایش بود، استفاده گردید. از نرم افزار Design Expert نسخه ۸ برازش شده به معادله چند جمله ای درجه دو، جهت آنالیز ارتباط بین متغیرها و پاسخ‌های فرایند و همچنین پیش بینی و تأیید معادلات مدل، استفاده گردید.

جهت بهینه سازی استخراج توسط امواج فراصوت، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی بوسیله‌ی دستگاه فراصوت که برای جلوگیری از افزایش دمای نمونه به چیلر خنک کننده مجهز شده بود از ضایعات خرچنگ و میگو استخراج گردید. ۱۰ گرم از هر نمونه را با استون مخلوط نموده و در معرض امواج فراصوت قرار داده شد. در نهایت پس از جمع آوری حلال‌ها جهت آنالیز HPLC بوسیله ی فیلتر سر سنگی ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر گردیدند. محدوده و سطح هر فاکتور در جدول ۱ آمده است.

جهت استخراج توسط امواج مایکروویو، برای جلوگیری از تبخیر حلال دستگاه مایکروویو به کندانسور مجهز شد. سپس ۱۰ گرم از هر نمونه را با استون مخلوط نموده و در معرض امواج مایکروویو قرار داده شد. در نهایت پس از جمع آوری حلال‌ها جهت آنالیز HPLC بوسیله ی فیلتر سر سنگی ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر گردیدند. محدوده و سطح هر فاکتور در جدول ۲ آمده است. جهت مقایسه راندمان استخراج توسط این دو تکنیک، رنگدانه های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ و میگو به روش معمول (خیساندن) استخراج گردیدند. حلال استون با نسبت ۴ به یک به مدت ۲ دقیقه با ضایعات مخلوط گردید و این

مدت زمان ۵ ساعت به آزمایشگاه انتقال یافتند. پس از تخلیه شکمی و جداسازی گوشت‌ها، ضایعات میگو که شامل سر، پوسته و دم و ضایعات خرچنگ شامل پوسته، چنگال و پاها چرخ گردیدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۱۸°C- در فریزر نگهداری شدند. حلال‌ها از شرکت مرک^۱ آلمان و آستازانتین استاندارد با خلوص بالای ۹۸٪ از شرکت سیگما آمریکا خریداری گردیدند. مشخصات دستگاه های مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند.

مایکروویو (سامسونگ، ساخت کره جنوبی)، دستگاه فراصوت (میزاونیکس، ساخت آلمان)، دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۲ (کناور، ساخت آلمان)، ستون یوروسفر^۳ (سی-۱۸، ساخت آلمان)، دستگاه دیونایزر (آربور، ساخت آمریکا)، چرخ کن مولینکس (مدل دیپوز، ساخت ایتالیا).

جهت آماده سازی استاندارد، ۲۰ میلی گرم استاندارد آستازانتین را در متانول ۲٪ با آب دیونیزه به حجم ۵۰ میلی لیتر رساندیم. استوک استاندارد آستازانتین (۴۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر) را در فریزر منفی ۱۸ درجه ی سانتی گراد نگهداری نمودیم و در نهایت منحنی کالیبراسیون با استفاده از محلول استاندارد آستازانتین تهیه گردید. میزان رنگدانه های کاروتنوئیدی بوسیله ی دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسط ستون یوروسفر با فاز متحرک شامل متانول/آب ۲٪ در دمای اتاق و با سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر بر دقیقه در ۴۴۰ نانومتر با حجم تزریق ۲۰ میکرو لیتر بوسیله ی مقایسه زمان خروج پیک های آستازانتین استاندارد اندازه گیری شد.

1. Merk
2. High-performance liquid chromatography (HPLC)
3. Eurospher

عمل ۵ بار تکرار شد. که در نهایت پس از جمع آوری حلال‌ها با استفاده از فیلتر سرسنگی نمونه‌ها برای آنالیز HPLC فیلتر گردیدند.

جدول ۱- فاکتورهای مورد بررسی در روش سطح پاسخ استخراج توسط امواج فراصوت

سطح مقدار	مدت زمان استخراج (ثانیه) (X ₄)	توان (W) (X ₃)	نسبت حلال به ضایعات (v/w) (X ₂)	تعداد دفعات استخراج (X ₁)
-۱	۳۰	۳۰	۵	۱
۰	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲
۱	۱۸۰	۱۵۰	۱۵	۳

جدول ۲- فاکتورهای مورد بررسی در روش سطح پاسخ استخراج توسط امواج مایکروویو

سطح مقدار	مدت زمان استخراج (ثانیه) (X ₄)	توان (W) (X ₃)	نسبت حلال به ضایعات (v/w) (X ₂)	تعداد دفعات استخراج (X ₁)
-۱	۲	۴۰۰	۵	۱
۰	۶	۶۰۰	۱۰	۲
۱	۱۰	۸۰۰	۱۵	۳

درصد خطای پیش بینی از طریق معادله‌ی زیر بدست آمد:

$$\text{خطای پیش‌بینی (\%)} = \frac{\text{مقدار پیش‌بینی شده} - \text{مقدار بدست آمده}}{\text{مقدار بدست آمده}} \times 100$$

رنگدانه‌ی بدست آمده با سه تکرار $0.584 \mu\text{g/g}$ \pm اندازه‌گیری شد و از ضایعات میگو ۱ بار استخراج با نسبت ۱۰ برابر حلال به ضایعات با توان ۱۵۰ وات به مدت ۱۰۵ ثانیه می‌باشد و مقدار رنگدانه استخراج شده $1213/45 \mu\text{g/g}$ پیش بینی گردید. که در نهایت مقدار رنگدانه‌ی بدست آمده با سه تکرار $0.23 \mu\text{g/g}$ \pm شد.

میزان رنگدانه‌های کاروتنوئیدی استخراج شده از ضایعات خرچنگ و میگو توسط امواج مایکروویو به ترتیب بین $1092/61 - 48/19$ و $1630/69 - 48/20$ می‌باشد (جدول ۶).

در بین فاکتورهای تاثیر گذار توسط مایکروویو برای ضایعات خرچنگ، دو فاکتور تعداد دفعات استخراج و نسبت حلال به ضایعات و همچنین اثر متقابل بین تعداد دفعات استخراج و نسبت حلال به ضایعات و تعداد دفعات استخراج و توان مایکروویو و برای ضایعات میگو فاکتورهای تعداد دفعات استخراج و نسبت حلال به ضایعات و همچنین اثر متقابل بین تعداد دفعات استخراج و نسبت حلال به ضایعات در سطح $P < 0.05$ معنی دار می‌باشند (جدول ۷ و ۸).

با توجه به نرم افزار بهترین شرایط استخراج رنگدانه‌ی کاروتنوئیدی توسط مایکروویو از ضایعات خرچنگ، ۳ بار استخراج با نسبت ۱۵ برابر حلال به ضایعات با توان ۴۰۰ وات به مدت ۶ ثانیه می‌باشد. مقدار رنگدانه استخراج شده $1079/17 \mu\text{g/g}$ پیش‌بینی گردید. در نهایت مقدار رنگدانه‌ی بدست آمده با سه تکرار $0.25 \mu\text{g/g}$ \pm شد و از ضایعات میگو ۳ بار استخراج با نسبت ۱۵ برابر حلال به ضایعات با توان ۶۰۰ وات به مدت ۶ ثانیه می‌باشد. مقدار رنگدانه استخراج شده $1472/33 \mu\text{g/g}$ پیش‌بینی گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS^۱ نسخه ۹/۱ و بر اساس روش GLM^۲ و با آزمون مقایسه میانگین های LSD^۳ در سطح ۰.۹۵٪ انجام شد و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار MS Excel ترسیم گردید.

۳. نتایج

مراحل بهینه سازی استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی توسط امواج فراصوت توسط روش سطح پاسخ (با طرح مرکب مرکزی) در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان کاروتنوئیدی استخراج شده از ضایعات میگو و خرچنگ به ترتیب بین $1510/22 - 92/51$ و $1676/29 - 14/09$ می‌باشد. در بین فاکتورها تاثیر گذار بر استخراج توسط امواج فراصوت، برای ضایعات خرچنگ فاکتورهای تعداد دفعات استخراج و نسبت حلال به ضایعات و همچنین اثر متقابل بین تعداد دفعات استخراج و نسبت حلال به ضایعات و همچنین تعداد دفعات استخراج و مدت زمان استخراج و برای ضایعات میگو فاکتورهای تعداد دفعات استخراج، توان فراصوت و همچنین اثر متقابل بین تعداد دفعات استخراج و مدت زمان استخراج و تعداد دفعات استخراج با خودش در سطح $P < 0.05$ معنی دار می‌باشند (جدول ۴ و ۵). با توجه به نرم افزار بهترین شرایط استخراج رنگدانه‌ی کاروتنوئیدی توسط امواج فراصوت از ضایعات خرچنگ، ۳ بار استخراج با نسبت ۱۵ برابر حلال به ضایعات با توان ۹۰ وات به مدت ۳۰ ثانیه می‌باشد و مقدار رنگدانه استخراج شده $1417/25 \mu\text{g/g}$ پیش بینی گردید. در نهایت مقدار

1. Statistical Analysis Software Institute Inc., Cary, NC
2. General Linear Models
3. Least Significant Difference

در نهایت مقدار رنگدانه‌ی استخراج شده با سه تکرار $0.47 \pm 0.25/1470 \mu\text{g/g}$ بدست آمد.

جدول ۳- طرح ماتریس آزمایش بهینه سازی فرآیند استخراج توسط امواج فراصوت

شماره آزمایشات	مدت زمان استخراج (ثانیه)	توان (W) (X ₃)	نسبت حلال به ضایعات (v/w) (X ₂)	تعداد دفعات استخراج (X ₁)	میانگین مقدار رنگدانه استخراج شده (μg/g)
	(X ₄)				میگو خرچنگ
۱	۱۸۰	۱۵۰	۵	۱	۹۹۶.۶۷
۲	۱۰۵	۹۰	۱۰	۱	۶۷۲.۴۶
۳	۳۰	۳۰	۵	۱	۶۵۹.۵۵
۴	۱۸۰	۳۰	۱۵	۱	۴۵۲.۹۴
۵	۱۸۰	۳۰	۵	۱	۲۴۷.۳۵
۶	۳۰	۱۵۰	۵	۱	۱۶۷۶.۲۹
۷	۳۰	۳۰	۱۵	۱	۸۴۴.۹۳
۸	۳۰	۱۵۰	۱۵	۱	۱۳۱۳.۰۸
۹	۱۸۰	۱۵۰	۱۵	۱	۱۵۰۲.۷۹
۱۰	۱۰۵	۱۵۰	۱۰	۲	۱۷۹.۶
۱۱	۱۰۵	۹۰	۵	۲	۲۱.۷۸
۱۲	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲	۱۴.۰۹
۱۳	۳۰	۹۰	۱۰	۲	۳۶۹.۵۶
۱۴	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲	۳۱۸.۹۵
۱۵	۱۰۵	۹۰	۱۵	۲	۳۳.۸۴
۱۶	۱۸۰	۹۰	۱۰	۲	۶۷۴.۸۴
۱۷	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲	۲۴.۱۱۳۰
۱۸	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲	۲۹۴.۴۳
۱۹	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲	۴۲۴.۷۹
۲۰	۱۰۵	۳۰	۱۰	۲	۱۲۲.۸۱
۲۱	۱۰۵	۹۰	۱۰	۲	۲۷۳.۵۹
۲۲	۳۰	۳۰	۵	۳	۴۸.۲۱
۲۳	۱۸۰	۱۵۰	۵	۳	۳۸۱.۲
۲۴	۳۰	۳۰	۱۵	۳	۱۸.۳۳
۲۵	۳۰	۱۵۰	۱۵	۳	۲۷۸.۳۳
۲۶	۱۸۰	۱۵۰	۱۵	۳	۷۳۱.۸۲
۲۷	۱۰۵	۹۰	۱۰	۳	۵۹۳.۴۲
۲۸	۱۸۰	۳۰	۵	۳	۸۲۱.۲۴
۲۹	۱۸۰	۳۰	۱۵	۳	۲۲۱.۰۲
۳۰	۳۰	۱۵۰	۵	۳	۱۴۸۶.۶۳

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس استخراج توسط امواج فراصوت از ضایعات خرچنگ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	p-value
Model	۳.۸۵E+۰۶	۵	۷.۷۰E+۰۵	۱۰۸.۸۹۵۲	< ۰.۰۰۰۱
تعداد دفعات استخراج (X _۱)	۱.۹۴E+۰۶	۱	۱.۹۴E+۰۶	۲۷۴.۰۰۹۹	< ۰.۰۰۰۱
نسبت حلال به ضایعات (X _۲)	۱.۵۳E+۰۶	۱	۱.۵۳E+۰۶	۲۱۶.۴۶۱۹	< ۰.۰۰۰۱
مدت زمان استخراج (X _۴)	۱.۶۳E+۰۳	۱	۱.۶۳E+۰۳	۰.۲۳۰۸۹۱	۰.۶۳۵۲
X _۱ * X _۲	۳.۳۱E+۰۵	۱	۳۳۱۲۶۹.۱۵۳۳	۴۶.۸۵۲۱۱	< ۰.۰۰۰۱
X _۱ * X _۴	۴.۸۹E+۰۴	۱	۴۸۹۳۷.۳۹۹۹۵	۶.۹۲۱۳۲۱	۰.۰۱۴۶
Residual	۱۶۹۶۹۲.۶۸۲۷	۲۴	۷۰۷۰.۵۲۸۴۴۴		
Lack of Fit	۱.۵۶E+۰۵	۱۹	۸۲۲۰.۰۳۷۶۱۲	۳.۰۴۱۷۶۲	۰.۱۱۰۷
Pure Error	۱۳۵۱۱.۹۶۸۰۴	۵	۲۷۰۲.۳۹۳۶۰۹		
Cor Total	۴۰۱۹۴۲۶.۷۴	۲۹			

جدول ۵- نتایج آنالیز واریانس استخراج توسط امواج فراصوت از ضایعات میگو

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	p-value
Model	۳.۳۹E+۰۶	۳	۱.۱۳E+۰۶	۸.۹۹۲۴۱۷	۰.۰۰۰۳
تعداد دفعات استخراج (X _۱)	۷.۹۶E+۰۵	۱	۷.۹۶E+۰۵	۶.۳۴۴۵۴۱	۰.۰۱۸۳
توان (X _۳)	۱.۴۵E+۰۶	۱	۱.۴۵E+۰۶	۱۱.۵۵۹۱۵	۰.۰۰۲۲
X _۱ * X _۱	۱.۱۴E+۰۶	۱	۱.۱۴E+۰۶	۹.۰۷۳۵۵۷	۰.۰۰۵۷
Residual	۳.۲۶E+۰۶	۲۶	۱۲۵۵۰۲.۰۰۲۳		
Lack of Fit	۲.۵۵E+۰۶	۲۱	۱۲۱۲۹۰.۰۳۲۷	۰.۸۴۷۰۴۳	۰.۶۴۸۲
Pure Error	۷۱۵۹۶۱.۳۷۵	۵	۱۴۳۱۹۲.۲۷۵		
	۲				
Cor Total	۶.۶۵E+۰۶	۲۹			

با استفاده از ضرایب رگرسیون برای عوامل و اثر متقابل آن ها معادله های زیر نوشته می شود:

$$\text{بازده ضایعات خرچنگ به کمک فرا صوت} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 - b_{14}x_1x_4$$

$$\text{بازده ضایعات میگو به کمک فرا صوت} = b_0 + b_1x_1 + b_3x_3 - b_4x_4 + b_{14}x_1x_4 + b_{11}x_1^2$$

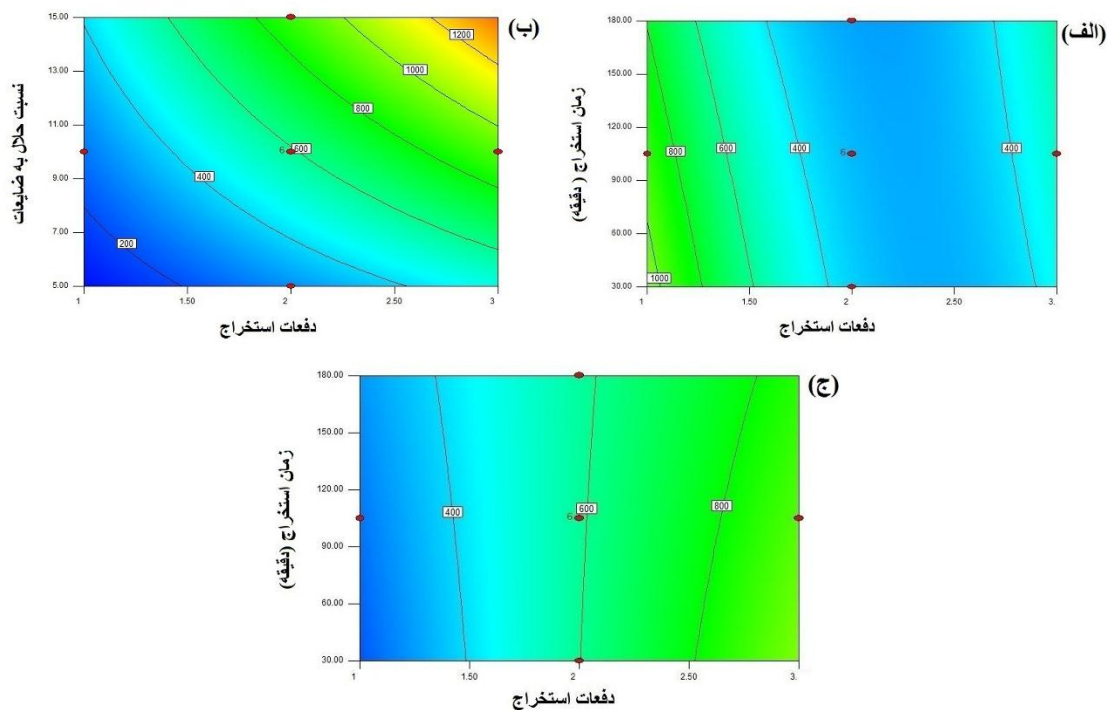
که با توجه به بازده رنگدانه های کاروتنوئیدی معادله ی رگرسیون برای هر دو سخت پوست به صورت زیر است:

$$\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right) = \text{بازده رنگدانه کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ به کمک فرا صوت} \\ = 588.86 + 228.07x_1 + 291.60x_2 + 142.89x_1x_2 - 55.20x_1x_4$$

$$R^2 = 0.957$$

$$\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right) = \text{بازده رنگدانه کاروتنوئیدی از ضایعات میگو به کمک فرا صوت} \\ = 221.54 - 210.22x_1 + 282.89x_3 - 26.95x_4 + 101.12x_1x_4 + 297.69x_1^2$$

$$R^2 = 0.509$$



شکل ۱- تاثیر فاکتورهای مختلف بر روی استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی توسط امواج فراصوت از (آ) ضایعات میگو و (ب و ج) خرچنگ

جدول ۶- طرح ماتریس آزمایش بهینه سازی فرآیند استخراج توسط مایکروویو

شماره آزمایشات	مدت زمان استخراج (ثانیه)	توان (W)	نسبت حلال به ضایعات (v/w) (X ₂)	تعداد دفعات استخراج (X ₁)	میانگین مقدار رنگدانه استخراج شده (µg/g)
	(X ₄)	(X ₃)	(X)		ضایعات میگو
					ضایعات خرچنگ
۱	۲	۸۰۰	۵	۱	۴۸.۲۰
۲	۱۰	۴۰۰	۵	۱	۷۲.۲۹
۳	۲	۴۰۰	۵	۱	۹۰.۳۶
۴	۶	۶۰۰	۱۰	۱	۲۵۳.۵۷
۵	۲	۴۰۰	۱۵	۱	۵۸۶.۵۳
۶	۱۰	۴۰۰	۱۵	۱	۵۱۵.۷۴
۷	۱۰	۸۰۰	۱۵	۱	۵۸۰.۶۹
۸	۲	۸۰۰	۱۵	۱	۶۴۱.۰۵
۹	۱۰	۸۰۰	۵	۱	۴۸.۱۹
۱۰	۶	۶۰۰	۱۰	۲	۴۶۷.۱۶
۱۱	۶	۸۰۰	۱۰	۲	۶۱۶.۰۰
۱۲	۶	۶۰۰	۱۰	۲	۴۴۱.۱۶
۱۳	۶	۶۰۰	۱۰	۲	۴۶۸.۲
۱۴	۶	۶۰۰	۱۰	۲	۴۸۳.۳۱
۱۵	۱۰	۶۰۰	۱۰	۲	۴۹۱.۸۲
۱۶	۶	۴۰۰	۱۰	۲	۴۴۴.۸۵
۱۷	۶	۶۰۰	۱۰	۲	۴۳۸.۰۰
۱۸	۶	۶۰۰	۱۵	۲	۸۰۰.۸۴
۱۹	۶	۶۰۰	۱۰	۲	۴۵۳.۱۰
۲۰	۲	۶۰۰	۱۰	۲	۶۴۳.۸
۲۱	۶	۶۰۰	۵	۲	۲۴۶.۴۳
۲۲	۱۰	۸۰۰	۱۵	۳	۹۶۲.۹۱
۲۳	۶	۶۰۰	۱۰	۳	۶۱۷.۲۹
۲۴	۱۰	۴۰۰	۱۵	۳	۱۰۶۹.۳۱
۲۵	۲	۴۰۰	۱۵	۳	۱۰۹۲.۶۱
۲۶	۲	۸۰۰	۵	۳	۱۵۳.۵۴
۲۷	۱۰	۴۰۰	۵	۳	۳۴۷.۴۸
۲۸	۲	۸۰۰	۱۵	۳	۱۰۳۱.۱۹
۲۹	۱۰	۸۰۰	۵	۳	۲۶۵.۱۹
۳۰	۲	۴۰۰	۵	۳	۳۵۰.۸۵

با استفاده از ضرایب رگرسیون برای عوامل و اثر متقابل آن ها معادله های زیر نوشته می شود:

$$\text{بازده ضایعات خرچنگ به کمک مایکروویو} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3$$

$$\text{بازده ضایعات میگو به کمک مایکروویو} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

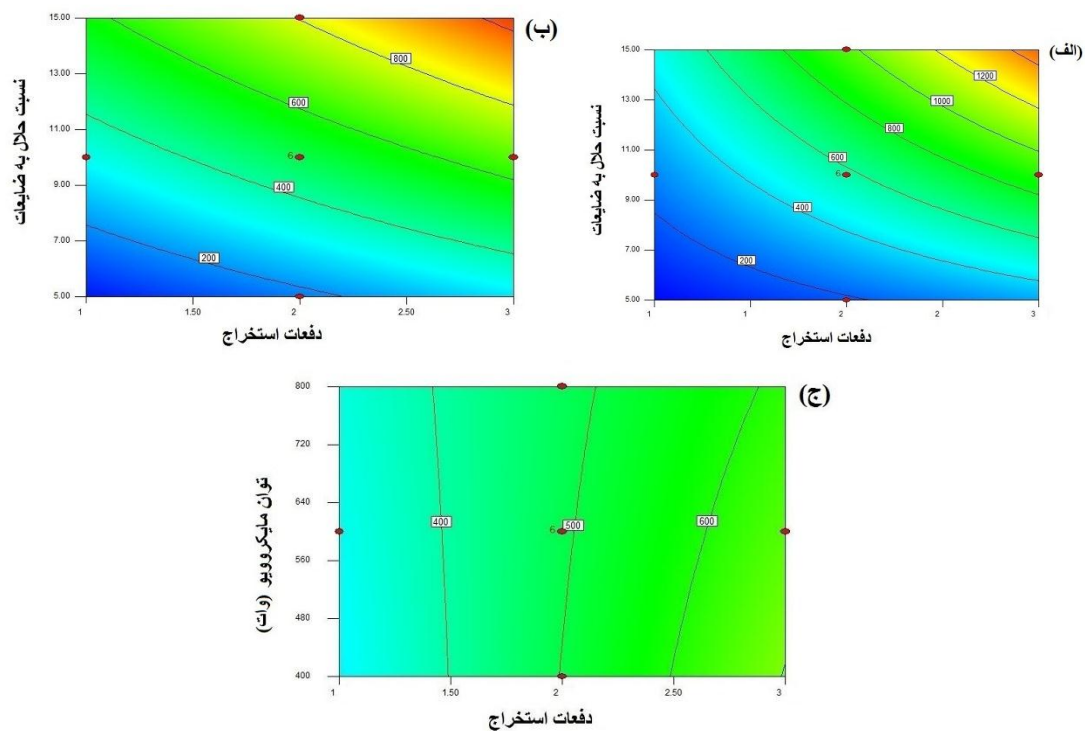
که با توجه به بازده رنگدانه های کاروتنوئیدی معادله ی رگرسیون برای هر دو سخت پوست به صورت زیر است:

$$\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right) = 491.18 + 168.88x_1 + 212.58x_2 - 11.62x_3 + 61.74x_1x_2 - 22.15x_1x_3$$

$$R^2=0.965$$

$$\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right) = 576.19 + 214.97x_1 + 291.29x_2 + 189.77x_1x_2$$

$$R^2=0.935$$



شکل ۲- تاثیر فاکتورهای مختلف بر روی استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی توسط امواج مایکروویو از (آ) ضایعات میگو و (ب) و (ج) ضایعات خرچنگ

جدول ۷- نتایج آنالیز واریانس استخراج توسط امواج مایکروویو از ضایعات خرچنگ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	p-value
Model	۲.۳۶E+۰۶	۵	۴.۷۳E+۰۵	۱۳۱.۹۸۵۳	<۰.۰۰۰۱
تعداد دفعات استخراج (X_1)	۵.۱۳E+۰۵	۱	۵.۱۳E+۰۵	۱۴۳.۳۵۴۵	<۰.۰۰۰۱
نسبت حلال به ضایعات (X_2)	۱.۷۷E+۰۶	۱	۱.۷۷E+۰۶	۴۹۴.۲۴۴۴	<۰.۰۰۰۱
توان (X_3)	۲.۴۳E+۰۳	۱	۲.۴۳E+۰۳	۰.۶۷۹۱۵۶	۰.۴۱۸۰
$X_1 * X_2$	۶.۱۰E+۰۴	۱	۶.۰۹۸۶.۵۰۴۶۶	۱۷.۰۲۹۳۱	۰.۰۰۰۴
$X_1 * X_3$	۱.۶۵E+۰۴	۱	۱۶۵۴۲.۹۶۰۵۳	۴.۶۱۹۳۰۴	۰.۰۴۱۹
Residual	۴۱۱۷۷.۸۵۹۵۰	۲۴	۳۵۸۱.۲۶۷۱۵۷		
Lack of Fit	۸.۴۴E+۰۴	۱۹	۴۴۴۲.۹۳۳۹۱۲	۱۴.۴۷۵۲۳	۰.۰۰۰۳۸
Pure Error	۱۵۳۴.۶۶۷۴۳۷	۵	۳۰۶.۹۳۳۴۸۷۳		
Cor Total	۲۴۴۹۳۲۴.۱۱۸	۲۹			

جدول ۸- نتایج آنالیز واریانس استخراج توسط امواج مایکروویو از ضایعات میگو

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	p-value
Model	۵.۱۲E+۰۶	۳	۱.۷۱E+۰۶	۱۲۳.۹۶	<۰.۰۰۰۱
تعداد دفعات استخراج (X_1)	۱.۷۹E+۰۶	۱	۱.۷۹E+۰۶	۱۲۹.۷۲	<۰.۰۰۰۱
نسبت حلال به ضایعات (X_2)	۲.۷۶E+۰۶	۱	۲.۷۶E+۰۶	۲۰۰.۳۱	<۰.۰۰۰۱
$X_1 * X_2$	۵.۷۶E+۰۵	۱	۵.۷۶E+۰۵	۴۱.۸۶	<۰.۰۰۰۱
Residual	۳.۵۸E+۰۵	۲۶	۱۳۷۶۵.۸۸		
Lack of Fit	۳.۴۶E+۰۵	۲۱	۱۶۴۶۶.۱۴	۶.۷۹	۰.۰۲۱۳
Pure Error	۱۲۱۲۳.۹۴	۵	۲۴۲۴.۷۹		
Cor Total	۵.۴۸E+۰۶	۲۹			

۴. بحث و نتیجه گیری

در بین فاکتورهای مورد بررسی تعداد دفعات استخراج در هر دو نمونه توسط امواج فراصوت و مایکروویو معنی دار بوده است. در زمان استخراج هنگامی که بافت حاوی مقدار زیادی آب است با استخراج اول توسط حلال های قطبی همچون استون مقدار کمی رنگدانه استخراج می شود، اما وقتی که سلول خشک می شود مقدار رنگدانه استخراج شده افزایش پیدا می کند (Sachindra et al., 2006). در تحقیقی (Sachindra et al., 2006) با استفاده از حلال های آلی اقدام به بهینه سازی استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی کردند و از بین فاکتور های تاثیر گذار تعداد دفعات استخراج به میزان سه بار را بهینه این فاکتور تعیین نمودند. در تحقیقی دیگر Hooshmand et al., (2017) اقدام به استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ کردند و میزان ۵ بار استخراج را به عنوان بهترین شرایط اعلام نمودند.

شکل ۱ (ب) و شکل ۲ (آ و ب) تاثیر نسبت حلال به ضایعات بر روی مقدار استخراج رنگدانه ها نشان می دهد که هر چه مقدار حلال بیشتر

شده است بازده هم افزایش پیدا کرده است. نسبت بالای حلال به ضایعات موجب فعال کردن حرکت انتشار ماتریکس درون سلولی به خارج شده که در نهایت سبب بهبود بازده می شود. این نتایج از این واقعیت است که در حجم حلال بالاتر، اثر پدیده کاویتاسیون قاطع تر است (Tsiaka et al., 2015). در استخراج به کمک امواج مایکروویو، هنگامی که نمونه با یک نسبت حلال مناسب در معرض و توزیع امواج مایکروویو قرار می گیرد بازدهی استخراج افزایش پیدا می کند (EIKhori et al., 2007). البته لازم به ذکر است که با افزایش نسبت حلال به ضایعات با نسبت بیشتر از ۱۵ برابر در این روش استخراج، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد. در تحقیقی مشابه (Tsiaka et al., 2015) با بهینه سازی استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی از ضایعات میگو به کمک امواج فراصوت و مایکروویو نسبت حلال به ضایعات را به ترتیب ۱۰ و ۲۰ برابر اعلام نمودند. (Tomaz et al., 2016) اقدام به بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولی از *Laurencia obtuse* نمودند و از بین فاکتورها

هدف به بیرون می شود. که در توان‌های بالا به علت افزایش بیش از حد اندازه حباب‌ها، اثر پدیده کایتاسیون کاهش پیدا می‌کند و امواج فراصوت پراکنده شده و بازدهی استخراج را کاهش می‌دهند (Xu and Pan, 2013). آزمایش‌های اولیه با استخراج به کمک امواج مایکروویو نشان دهنده وابستگی بین درجه حرارت و توان مایکروویو دارد. در نتیجه، این دو پارامتر را نمی‌توان در تمام موارد به طور همزمان با مقادیر واقعی تنظیم شده کنترل کرد اما با افزایش مدت زمان در توان بالا بر روی ماندگاری رنگدانه‌های کاروتنوئیدی تاثیر گذاشته و بازدهی استخراج را کاهش می‌دهد (Tsiaka et al., 2015).

میزان رنگدانه استخراج شده به روش مرسوم (خیساندن) برای ضایعات خرچنگ و میگو به ترتیب $1/31 \pm 11/34$ و $0/84 \pm 74/51$ $\mu\text{g/g}$ می‌باشد. که در مقایسه با این دو تکنیک، حداقل میزان استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از ضایعات خرچنگ و میگو به ترتیب ۹۵ و ۱۷ برابر شده است که نشان دهنده ی این است که استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به کمک امواج فراصوت و مایکروویو یکی از بهترین روش‌ها برای استخراج این رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از ضایعات سخت پوستان می باشد. تحقیقات زیادی بر روی مقایسه روش استخراج به کمک امواج مایکروویو و روش مرسوم خیساندن از منابع گیاهی و جانوری شده است که همگی روش استخراج به کمک امواج مایکروویو را موثرتر معرفی نموده‌اند (Çavdar et al., 2017; Ozkan et al., 2017; Milutinović et al., 2015; Dahmoune et al., 2015). Xu et al., (2015) با مقایسه روش استخراج آنتی اکسیدان‌های طبیعی توسط امواج فراصوت با روش مرسوم خیساندن و سوکسله از گل *Jatropha integerrima* عنوان نمودند استخراج توسط امواج فراصوت بدلیل مدت زمان

نسبت حلال به ماده را به عنوان مهمترین عامل تاثیر گذار بر استخراج عنوان نمودند.

همان گونه که در شکل ۱ (آ و ج) مشاهده می شود اثر متقابل مدت زمان استخراج با تعداد دفعات استخراج و توان دستگاه‌ها، هنگامی که مدت زمان استخراج را در کمترین میزان خود و نسبت حلال به ضایعات را در بالاترین قرار می دهیم، بهترین بازده را با ۳ بار استخراج بدست می آوریم. بدلیل اثر تخریب اکسایشی حاصل از تابش امواج فراصوت و مایکروویو بر روی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی هر چه مدت زمان استخراج کوتاه‌تر باشد، رنگدانه‌ها بهتر حفظ می‌شوند (Tsiaka et al., 2015; Xu and Pan, 2013). Gu et al., (2008) اقدام به بهینه سازی استخراج رنگدانه کاروتنوئیدی از *Rhodobacter sphaeroides* به کمک هیدروکلریک اسید^۱ نمودند و فاکتورهای نسبت حلال، مدت زمان و درجه حرارت را بر میزان استخراج معنی دار اعلام نمودند و نسبت ۴۰ برابر حلال به ضایعات با مدت زمان ۴۰ دقیقه را بهینه‌ترین شرایط استخراج اعلام نمودند. (Tsiaka et al., 2015) از میگو *Aristeus antennatus* به کمک امواج فراصوت و مایکروویو اقدام به بهینه سازی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی نمودند ($30/1/3 \mu\text{g/g}$) که بهینه روش استخراج به کمک امواج فراصوت را توان ۶۰۰ وات به مدت پنج دقیقه با نسبت ده برابر حلال استون به ضایعات و به کمک امواج مایکروویو توان ۳۰ وات به مدت هفت دقیقه با نسبت دو برابر حلال هگزان به استون و اتانول عنوان نمودند.

با افزایش توان دستگاه فراصوت به علت شکستن راحت تر بافت‌ها افزایش میزان ترکیبات استخراج شده حاصل می‌شود که خود عامل انتشار سریع رنگدانه‌ها و مواد درون بافتی به‌عنوان ترکیبات

1. HCL

منابع

- Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R.I., Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V.E. and López-Munguía, A., 2002. Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.4491-4496.
- Bhosale, P., 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, pp.351-361.
- Çavdar, H.K., Yanık, D.K., Gök, U. and Göğüş, F., 2017. Optimisation of Microwave-Assisted Extraction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil and Evaluation of Its Physicochemical and Bioactive Properties. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), p.86.
- Ciccone, M.M., Cortese, F., Gesualdo, M., Carbonara, S., Zito, A., Ricci, G., De Pascalis, F., Scicchitano, P. and Riccioni, G., 2013. Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Cremades, O., Parrado, J., Alvarez-Ossorio, M.C., Jover, M., de Terán, L.C., Gutierrez, J.F. and Bautista, J., 2003. Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food chemistry*, 82(4), pp.559-566.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H. and Madani, K., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food chemistry*, 166, pp.585-595.
- Das, A., Yoon, S.H., Lee, S.H., Kim, J.Y., Oh, D.K. and Kim, S.W., 2007. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied microbiology and biotechnology*, 77, pp.505.
- ElKhor S, Paré JJ, Bélanger JM, Pérez E. The microwave-assisted process (MAP TM1): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. *Journal of food engineering*. 2007 Apr 30;79(3):1110-4.
- کمتر و دمای پایین تر کمک به حفظ آنتی اکسیدان های طبیعی نموده است. یلمه و همکاران (۲۰۱۴) نیز اعلام کردند استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی به کمک امواج فراصوت از دانه آنانو در مقایسه با روش خیساندن ۳/۶٪ موثرتر می باشد. Oancea et al., (2013) نیز اعلام نمودند خاصیت آنتی اکسیدانی آنتوسیانین استخراج شده به کمک امواج فراصوت از توت سیاه و گیلاس در مقایسه با روش مرسوم (خیساندن) بیشتر می باشد. با این حال، استفاده از مدت زمان طولانی تر ممکن است منجر به افزایش ناخالصی های استخراج و افزایش هزینه های انرژی شود.
- درصد خطای پیش بینی یک خطای نسبی است که در نتیجه آزمایش وارد شده است. این درصد به ترتیب برای استخراج به کمک امواج فراصوت از ضایعات خرچنگ و میگو برابر با ۰/۷۱ و ۳/۵ درصد و همچنین برای استخراج به کمک امواج مایکروویو از ضایعات خرچنگ و میگو برابر با ۰/۲۸ و ۰/۱۴ درصد می باشد. این پروفایل ها نشان می دهد که مدل معتبر است.
- نتایج نشان می دهد که روش سطح پاسخ در بهینه سازی شرایط فرآیند، از روش های موثر برای استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی در مقایسه با روش معمول استخراج (خیساندن) می باشد. این رنگدانه های حاصل از ضایعات خرچنگ و میگو به عنوان ارزان ترین ماده اولیه با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا می توانند جهت جایگزینی با رنگ های مصنوعی در صنعت غذایی، دارویی و بهداشتی مورد استفاده قرار گیرند، که نه تنها موجب رونق صنعت فرآوری آبزیان می شوند، بلکه آلودگی زیست محیطی را نیز کاهش می دهند.

- method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), pp.1383-1391.
- Milutinović, M., Radovanović, N., Ćorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M. and Dimitrijević-Branković, S., 2015. Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Industrial Crops and Products*, 77, pp.333-341.
- Moradi, GH., Niyameymandi, N. and Shabani, M.J., 1391. Estimation of Biomass and density of green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*, De Haan, 1844) in Boushehr province, Persian Gulf. *Iranian Journal of Marine Science and Technology*, 11(4), pp. 34-46.
- Oancea S, Grosu C, Ketney O, Stoia M. Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chimica Slovenica*. 2013 Oct 28;60(2):383-9.
- Ozkan, G., Karacabey, E., Arslan, N. and Odabasi, N., 2017. Optimisation of microwave-assisted extraction of triterpenic acids from olive mill waste using response surface methodology. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 9(2), pp.179-185.
- Parjikolaei, B.R., El-Houri, R.B., Fretté, X.C. and Christensen, K.V., 2015. Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste. *Journal of Food Engineering*, 155, pp.22-28.
- Pasquet V, Chérouvrier JR, Farhat F, Thiéry V, Piot JM, Bérard JB, Kaas R, Serive B, Patrice T, Cadoret JP, Picot L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*. 2011 Jan 31;46(1):59-67.
- Qiaoling, L., Xue-wu, C. and Lin, L., 2002. Microwave extraction of natural pigment [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 6, p.010.
- Routray, W. and Orsat, V., 2012. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), pp.409-424.
- Sachindra, N.M. and Mahendrakar, N.S., 2005. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with Felix-Valenzuela, L.E.T.I.C.I.A., Higuera-ciapara, I.N.O.C.E.N.C.I.O., Goycoolea-valencia, F.R.A.N.C.I.S.C.O. and Arguelles-monol, W.A.L.D.O., 2001. Supercritical CO₂/ethanol extraction of astaxanthin from blue crab (*Callinectes sapidus*) shell waste. *Journal of Food Process Engineering*, 24(2), pp.101-112.
- Fiedor, J. and Burda, K., 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), pp.466-488.
- Goula, A.M., 2013. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil—Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.492-498.
- Gu, Z., Deming, C., Yongbin, H., Zhigang, C. and Feirong, G., 2008. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), pp.1082-1088.
- Hooshmand, H., Shabanpour, B., Moosavi-Nasab, M. and 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*.
- Kazemi, SR., Emadi, H., Valinasab, T. and Hosein-Zadeh, S.H., 1383. Study of the diet of Crab Swimmer (*Portunus pelagicus*) in the waters of Hormozgan Province (Bandar Abbas Basin). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(2), pp. 143-150.
- Khanafari, A., Saberi, A., Azar, M., Vosooghi, G., Jamili, S. and Sabbaghzadeh, B., 2007. Extraction of astaxanthin esters from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 4(2), pp.93-98.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Tomao, V., Cravotto, G. and 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), pp.12-18.
- Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R.L., Maraschin, M. and Ferreira, S.R., 2011. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction

methodology and their antioxidant activities. Carbohydrate polymers, 119, pp.101-109.

vegetable oils. Bioresource Technology, 96(10), pp.1195-1200.

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

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

Sachindra, N.M., Bhaskar, N., Siddegowda, G.S., Sathisha, A.D. and Suresh, P.V., 2007. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. Bioresource technology, 98(8), pp.1642-1646.

Sawmya, R. and Sachindra, N. M., 2015. Carotenoid from fishery resources. Fish processing by-products: quality assessment and applications. Studium Press LLC, Houston , pp. 273-298.

Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D. and Karoglan Kontić, J., 2016. Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology. *Phytochemical analysis*, 27(1), pp.13-22.

Tsiaka, T., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V.J., Makris, C., Heropoulos, G.A. and Calokerinos, A.C., 2015. Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. *Analytica chimica acta*, 877, pp.100-110.

Xu, Y. and Pan, S., 2013. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.). *Ultrasonics sonochemistry*, 20(4), pp.1026-1032.

Yolmeh, M., Najafi, M.B.H. and Farhoosh, R., 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food chemistry*, 155, pp.319-324.

Zhao, Z.Y., Zhang, Q., Li, Y.F., Dong, L.L. and Liu, S.L., 2015. Optimization of ultrasound extraction of *Alisma orientalis* polysaccharides by response surface

The optimization of extraction of carotenoids pigments from blue crab (*Portunus pelagicus*) and shrimp (*Penaeus semisulcatus*) wastes using ultrasound and microwave

Hanif Hooshmand¹, Bahare Shabanpour^{1*}, Marzieh Moosavi-Nasab^{2,3}, Alireza Alishahi¹, Mohammad Taghi Golmakani³

1. Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2. Seafood Processing Research Group, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

3. Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract

Crab and shrimp wastes could be used as the cheapest raw materials for carotenoid pigments and also as an alternative to synthetic colors. The recovery of these valuable components from the aquatic waste could improve the aquatic processing industry and minimize the pollution potential of these wastes. In this research, Astaxanthin was used as the target extraction by using high performance liquid chromatography to analyze the extended pigments under different ultrasound assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) conditions; namely, number of extraction times, the extraction duration, ultrasound and microwave power and solvent to waste ratio, in order to understand the best condition of extraction. The optimal conditions for extracting crab wastes by UAE were at 3 times extraction with the solvent to waste ratio of 15:1 ml/g, and a power of 90 W² lasting for 30 second. Finally the astaxanthin yield was $1407.12 \pm 0.58 \mu\text{g/g}$ and for shrimp wastes were at 1 times extraction with the solvent to waste ratio of 10:1 ml/g, and a power of 150 W lasting for 150 second that ultimately the astaxanthin yield was $1257.43 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$. The optimal conditions for extracting crab wastes by MAE were at 3 times extraction with the solvent to waste ratio of 15:1 ml/g, and a power of 400 W lasting for 6 second. Finally the astaxanthin yield was $1082.07 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ and for shrimp wastes were at 3 times extraction with the solvent to waste ratio of 15:1 ml/g, and a power of 600 W lasting for 6 second that ultimately the astaxanthin yield was $1470.25 \pm 0.47 \mu\text{g/g}$. In comparison to the traditional method (soaking), the minimum amounts of carotenoid extraction from crab and shrimp wastes were respectively 95 and 11 times, respectively. Therefore, the method of response surface methodology in optimizing the process condition is one of the effective methods for carotenoid extraction from crab and shrimp wastes.

Keywords: Response surface methodology, Extraction optimization, Carotenoid, Crustaceans, Ultrasound and microwave

List of tables & figures

Fig.1. The effect of various factors on extraction of carotenoid pigments by ultrasound from (a) shrimp and (b and c) crab wastes

Fig. 2. Effect of different factors on the extraction of carotenoid pigments by microwave from (a) shrimp and (b) crab wastes

Table 1. Investigated factors by response surface method in ultrasound assisted extraction

* b_shabanpour@yahoo.com

- Table 2. Investigated factors by response surface method in microwave assisted extraction
Table 3. Experimental matrix design of optimization of ultrasound assisted extraction
Table 4. Analysis of variance of ultrasound assisted extraction from crab wastes
Table 5. Analysis of variance of ultrasound assisted extraction from shrimp wastes
Table 6. Experimental matrix design of Optimization of in microwave assisted extraction
Table 7. Analysis of variance of in microwave assisted extraction from crab wastes
Table 8. Analysis of variance of in microwave assisted extraction from shrimp wastes