مقاله علمی – پژوهشی:

مقایسه و ارزیابی بازده استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین مستخرج از میکروجلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) با استفاده از حلال استون و تکنیک ترکیبی اسید–استون

رضا صفری*[۱]، حسن نصراله‌زاده[۱]، سهیل ریحانی پول[۲]، زهرا یعقوب‌زاده[۱]، مرضیه رضایی[۱]

*safari1351@gmail.com

۱-پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۲- گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

چکیده

هدف از تحقیق حاضر، استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی رنگدانه آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus pluvialis*) و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی یون فریک) آن بود. جهت استخراج از دو روش منفرد (استخراج با استفاده از حلال استون یا ACE) و ترکیبی (استخراج به‌وسیله پیش‌تیمار با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون یا HCl-ACE) استفاده گردید. مطابق نتایج، مقدار آستاگزانتین (میلی‌گرم بر گرم) مستخرج با دو روش استون (ACE) و پیش‌تیمار حاوی اسیدکلریدریک (HCl-ACE) در مراحل استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی نهایی به‌ترتیب ۴/۰۹ (۱۳/۶۵٪)، ۸/۴۹ (۲۸/۳۰٪)، ۱۴/۵۹ (۴۸/۶۵٪) و ۹/۴۹ (۳۱/۶۵٪)، ۱۳/۵۹ (۴۵/۳۰٪) و ۲۵/۰۹ (۸۳/۶۵٪) بود. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH آستاگزانتین استخراج‌شده با دو روش ACE و HCl-ACE (غلظت ۳۰۰-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌ترتیب در دامنه ۷۶/۲۶-۶۶/۲۵ و ۹۴/۰۶-۸۵/۳۹ درصد متغیر بود. این مقادیر برای قدرت کاهندگی یون فریک به‌ترتیب در بازه جذب ۰/۷۵-۰/۶۱ و ۰/۹۲-۰/۷۸ در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرار داشت. رنگدانه استخراج‌شده با استفاده از روش ترکیبی (نسبت به روش منفرد) به صورت معنی‌داری دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود (p<۰/۰۵). علاوه‌براین، در هر دو آزمون، با افزایش غلظت آستاگزانتین تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، روند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به صورت افزایشی و سپس ثابت ثبت شد (عدم اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نشان داد که رنگدانه استخراج‌شده با روش ترکیبی (در غلظت‌های بالا) فعالیت نزدیکتر یا بیشتری نسبت به BHA و BHT دارد. مطابق یافته‌ها، روش ترکیبی (اسید-استون) در مقایسه با روش منفرد (استون) می‌تواند بازده استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه را بهبود بخشد. بنابراین، روش مورد استفاده جهت استخراج و خالص‌سازی آستاگزانتین، به صورت بالقوه‌ای بازده استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد و با انتخاب روش استخراج بهینه، می‌توان دو شاخص مذکور را در رنگدانه ارتقاء داد.

لغات کلیدی: میکروجلبک هماتوکوکوس، آستاگزانتین، بازده استخراج، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

مقدمه

آستاگزانتین ($C_{40}H_{52}O_4$) رنگدانه‌ای از خانواده کاروتنوئیدهاست و در حالت آزاد به رنگ‌های صورتی تا قرمز دیده می‌شود. این رنگدانه در جانوران دریایی مانند ماهی آزاد، ماهی قزل‌آلا، خرچنگ و میگو وجود دارد. ارزش اقتصادی آستاگزانتین بسیار بالاست و از آن به عنوان یک رنگ‌دهنده طبیعی، مکمل غذایی، عامل آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان استفاده می‌شود (Ambati *et al*., 2014). آستاگزانتین رنگدانه محلول در چربی است و در حلال‌هایی مانند استون، اتانول و کلروفرم حل می‌شود. این رنگدانه دارای بیشترین فعالیت بیولوژیک در مقایسه با سایر کاروتنوئیدها می‌باشد (Sarada *et al*., 2006).

در محیط زیست، گیاهان و بعضی از باکتری‌ها و قارچ‌ها آستاگزانتین را جذب کرده و ماهی‌ها آن را متابولیزه می‌کنند. این رنگدانه نهایتاً در پوست، عضله و استخوان تجمع می‌یابد و موجب رنگ‌گرفتن عضله ماهی می‌گردد. ماهی‌ها و خرچنگ‌ها قادرند آستاگزانتین را در بدن خود سنتز کنند. آستاگزانتین به طور گسترده به عنوان رنگ‌دهنده در خوراک آبزیان و صنعت ماکیان استفاده می‌شود. سازمان غذا و داروی ایالات متحده[1]، استفاده از آستاگزانتین به عنوان رنگ بیولوژیک در مواد غذایی و جیره غذایی ماهی و حیوانات را تائید کرده است. کمیسیون اروپا نیز این رنگدانه را به عنوان رنگ خوراکی مورد تائید و تاکید قرار داده است (Chen and Meyers, 1982).

آستاگزانتین حاوی زنجیره بلند از پیوند دوگانه کونژوگه و گروه‌های کتونی و کربوکسیل 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 خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد مطلوب‌تر از سایر کاروتنوئیدها نظیر بتاکاروتن عمل می‌کند و در جلوگیری از پراکسیداسیون استرهای متیلی اسیدهای چرب اشباع‌نشده موثرتر است. مطابق نتایج تحقیقات، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین ۱۰ برابر بیشتر از زاگزانتین[2]، لوتئین[3]، کانتاگزانتین[4]، بتاکاروتن[5] و ۱۰۰ برابر بیشتر از آلفاتوکوفرول[6] می‌باشد (Miki, 1991). غلظت برابر از بتاکاروتن، برخلاف آستاگزانتین قادر به ممانعت از پراکسیداسیون چربی‌ها نمی‌باشد (Ambati *et al*., 2014). ویتامین E نیز قادر می‌باشد تا حدودی شبیه به آستاگزانتین، از پراکسیداسیون چربی‌ها ناشی از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری کند. اما قادر به ترمیم و تقویت سیستم ایمنی آسیب دیده نمی‌باشد. هنگام کمبود این ویتامین، آستاگزانتین قادر به جبران این کمبود و حفاظت علیه آسیب‌های ایجادشده است. از این‌روT از آستاگزانتین به عنوان سوپر ویتامین E یاد می‌شود (Mayne, 1996; Ranga Rao, 2011). علت بالابودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین، وجود گروه‌های کتو و هیدروکسیل در حلقه‌های آن می‌باشد (Liu and Osawa, 2007).

با توجه به خواص مذکور در آستاگزانتین، استخراج آن از منابع طبیعی جهت کاربرد در آبزی‌پروری و صنایع غذایی ضرورت می‌یابد. به منظور استخراج آستاگزانتین از روش‌های مختلف اسیدی، آنزیمی، امواج مایکروویو، اولتراسونیک و اولتراهموژنیزاسیون استفاده می‌شود. یکی از روش‌های موثر در استخراج آستاگزانتین، روش اسیدی است. استفاده از روش‌های ترکیبی هیدروکلریدریک-استون نیز در استخراج آستاگزانتین بسیار موثر است که درصد استخراج رنگدانه را افزایش می‌دهد (Sarada *et al*., 2006). تاکنون تحقیقات مختلفی در این زمینه انجام و نتایج قابل توجهی ارائه گردیده است. در مطالعه Dong و همکاران (۲۰۱۴) از چهار روش به منظور استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک *Haematococcus pluvialis* استفاده شد. روش‌های مورد استفاده شامل تیمار اولیه با اسیدکلریدریک سپس استخراج با استون (HCl-ACE)، هگزان-ایزوپروپانول، استخراج با استفاده از

[1] United State Food and Drug Administarion or USFDA

[2] Zeaxanthin
[3] Lutein
[4] Canthaxanthin
[5] Beta Carotene
[6] Alfa Tocopherol

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

متانول همراه با استون (MET-ACE) و استخراج با استفاده از روغن سویا بوده است. نتایج نشان داد که روش ترکیبی اسید-استون (HCl-ACE) بیشترین راندمان استخراج را در مقایسه با سایر روش‌ها داشته است و میزان آستاگزانتین استخراجی در این روش، ۱۹/۸ درصد بود. رنگدانه استخراجی با روش مذکور، بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (با روش مهار رادیکال آزاد DPPH) را نیز نشان داد (۷۳/۲ درصد). در مطالعه Molino و همکاران (۲۰۱۸) استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک *Haematococcus pluvialis* با استفاده از حلال‌های مجاز[1] انجام گرفت. نتایج نشان داد که استون و اتانول به عنوان مطلوب‌ترین حلال جهت استخراج رنگدانه مطرح هستند. در پژوهش مذکور، تغییرات فشار تاثیر چندانی بر روند استخراج نداشت درحالی‌که با افزایش نسبی دما، روند استخراج به طور معنی‌داری افزایش یافت.

هدف تحقیق پیش‌رو در مرحله اول، استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی آستاگزانتین از میکروجلبک *Haematococcus pluvialis* با استفاده از دو روش منفرد (استون) و ترکیبی (پیش‌تیمار با HCl و استخراج با استون) است. در مراحل بعدی، بازده استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه مستخرج با هر دو روش مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج آستاگزانتین

بعد از تهیه پودر خالص میکروجلبک *Haematococcus pluvialis* از شرکت پرتوغذای آبزیان سورنا (آنالیز کیفی آن در جدول ۱ ارائه شده است) و خرید مواد شیمیایی مورد نیاز، نسبت به مقایسه روش‌های استخراج آستاگزانتین از پودر اسپری درایرشده میکروجلبک اقدام شد. در اکثر تحقیقات، به روش‌های شیمیایی به‌خصوص حلال استون جهت استخراج آستاگزانتین اشاره شده و تاکید گردید که هنگام استفاده تلفیقی از حلال‌های مختلف همراه با تیمار حرارتی، روند استخراج آستاگزانتین با راندمان بالاتری انجام می‌گیرد. بر همین اساس، دو روش شامل ۱- استخراج با استفاده از استون خالص (روش منفرد، ACE) ۲- پیش‌تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص (روش ترکیبی، HCl-ACE)، جهت استخراج آستاگزانتین مورد ارزیابی قرار گرفتند (Sarada *et al*., 2006; Dong *et al*., 2014).

جدول ۱: آنالیز کیفی میکروجلبک هماتوکوکوس مورد استفاده در این مطالعه

Table 1: Qualitative analysis of *Haematococcus* microalgae used in this study

ترکیب سلول (درصد در ماده خشک)		میزان (٪)
	پروتئین	۲۳
	کربوهیدرات	۳۷/۵
	چربی کل	۳۵/۵
کاروتنوئیدها	کاروتنوئید کل	-
	آستاگزانتین	۳
	بتاکاروتن	۰/۰۳۷
	لوتئین	۰/۰۱۸
	زاگزانتین	-
	کانتاگزانتین	۰/۱۸
	نئوگزانتین	-
	ویولاگزانتین	-
	کلروفیل‌ها	-

با توجه به دو روش مورد استفاده و ۵ تکرار برای هر نمونه، در این مرحله ۱۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت تا میانگین غلظت آستاگزانتین در ۵ تکرار تعیین گردد. در روش اول ۴ میلی‌لیتر از استون به ۱۰ میلی‌گرم از پودر خشک هماتوکوکوس اضافه شد و پس از ۱ ساعت هم‌زدن در دمای اتاق، با استفاده از امواج فراصوت، فرآیند سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه در فرکانس ۲۰ کیلو هرتز انجام گرفت. بعد از این مرحله، استون حاوی مایع رویی، با سانتریفوژ نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد. عمل استخراج مجدداً تکرار گردید. در انتهای آزمایش، حلال استون حاصل از سانتریفوژ چند مرحله‌ایی که حاوی رنگدانه آستاگزانتین بودند با هم ترکیب شدند و جهت قرائت غلظت آستاگزانتین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۸ نانومتر مورد استفاده قرار گرفتند (Sarada *et al*., 2006; Dong *et*

[1] Generally Recognized As Safe or GRAS

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

al., 2014; Sun *et al*., 2015; Liu *et al*, 2018). جهت تعیین غلظت آستاگزانتین از رابطه ذیل استفاده شد (Liu *et al*., 2011).

$C= A/\alpha$

C= غلظت آستاگزانتین، A= طول موج مورد استفاده، α= جذب قرائت‌شده

در روش دوم، ابتدا پیش‌تیمار اولیه با اضافه‌کردن یک میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۴ مولار به ۱۰ میلی‌گرم از پودر هماتوکوکوس و قرار دادن مخلوط در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری به مدت یک ساعت انجام شد. سپس سوسپانسون، سرد شده و مشابه روش قبل سانتریفوژ انجام گردید. بعد از سانتریفوژ، نمونه‌ها دو مرتبه با آب مقطر شستشو و مجدداً سانتریفوژ شدند و در نهایت عمل استخراج بر رسوب به‌دست‌آمده با استفاده از استون، مشابه روش قبلی، انجام گرفت و با روش اسپکتروفتومتری تعیین غلظت شد (Sarada *et al*., 2006; Dong *et al*., 2014; Liu *et al*., 2018).

هیدرولیز یا صابونی‌کردن آستاگزانتین

به منظور هیدرولیز یا صابونی‌کردن رنگدانه آستاگزانتین و تبدیل فرم‌های مونواستر و دی‌استر آن به فرم آزاد، از روش Dewati و همکاران (۲۰۲۰) با کمی تغییر استفاده گردید. بدین‌ترتیب، مخلوط حاوی سود ۰/۰۲ نرمال و عصاره حاوی رنگدانه به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و مکان تاریک قرار داده شد. بعد از پایان فرآیند هیدرولیز، غلظت آستاگزانتین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و طول موج ۴۷۸ نانومتر قرائت گردید.

خالص‌سازی آستاگزانتین

جهت خالص‌سازی آستاگزانتین از روش Yuan و Chen (۲۰۰۰)، Kang و Sim (۲۰۰۷) و Sun و همکاران (۲۰۱۵) با کمی تغییر استفاده شد. عصاره هیدرولیزشده حاوی آستاگزانتین به نسبت ۱:۱:۱ عصاره/آب مقطر/ان‌هگزان مخلوط شدند و با سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه، فرآیند جداسازی رنگدانه انجام گرفت. بعد از سانتریفوژ، فاز هگزان جمع‌آوری شد و فرآیند جداسازی، تا بی‌رنگ‌شدن کامل این فاز انجام گرفت. حلال آلی هگزان حاصل از سانتریفوژ با هم ترکیب و با استفاده از آب مقطر تا تنظیم pH در محدوده خنثی شستشو داده شد. در انتهای فرآیند، با استفاده از روتاری در دمای اتاق، حلال پراکنی انجام و سوسپانسیون حاوی رنگدانه، تغلیظ و به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش داده شد و جهت تزریق به ستون کروماتوگرافی آماده گردید. برای خالص‌سازی آستاگزانتین از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. ستون مورد استفاده با استفاده از سیلیکاژل پر شد و بعد از تنظیم پارامترهای مختلف شامل flow rate (۰/۶۵ میلی‌لیتر در دقیقه)، فرکانس (۴۷۶ نانومتر)، دمای ستون (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و میزان تزریق (۲۰ میکرولیتر) و نوع ستون (PDA)، دستگاه جهت تزریق آماده گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه تغلیظ‌شده حاوی آستاگزانتین (یک گرم) جهت تزریق آماده شد. عمل خالص‌سازی در ابتدا با هگزان/استون (نسبت ۷ به ۳ حجمی/حجمی) به مدت ۴۰ دقیقه، سپس با هگزان/دی کلرومتان/استون (به نسبت ۵ به ۲/۵ به ۱ حجمی حجمی) انجام شد. عمل خالص‌سازی به مدت ۹۰ دقیقه انجام گردید. جهت محاسبه آستاگزانتین قابل استخراج از رابطه زیر استفاده شد. در این رابطه، توده آستاگزانتین، مقدار آستاگزانتین استخراج‌شده در حلال آلی، m، میزان جلبک مورد استفاده و عدد ۳ میزان تقریبی آستاگزانتین در میکروجلبک هماتوکوکوس است.:

[آستاگزانتین قابل استخراج (٪) = [توده آستاگزانتین/(m۱۰۰) / ۳] × ۱۰۰

خلال‌های جمع‌آوری در مرحله قبل، با استفاده از دستگاه روتاری فریز درای گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی آستاگزانتین استخراج‌شده

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH[1]

غلظت‌های مورد استفاده رنگدانه آستاگزانتین جهت انجام آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. برای اندازه‌گیری شاخص DPPH، ابتدا استوک اولیه‌ای از معرف DPPH تهیه

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

گردید. بدین‌ترتیب، ۲۳/۵ میلی‌گرم از معرف به ۱۰۰ میلی لیتر از اتانول ۹۹ درصد اضافه و در دمای ۴ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از آستاگزانتین خالص به ۳/۹ میلی‌لیتر از معرف رقیق‌شده DPPH (۱ به ۱۰) اضافه و محلول حاصل در دور بالا هموژن و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک قرار داده شد. در مرحله انتهایی آزمایش، به منظور تعیین توانایی آستاگزانتین جهت مهار رادیکال DPPH، طول موج محلول تهیه‌شده در محدوده ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت و درصد مهار DPPH از طریق رابطه ذیل محاسبه گردید (Ceron *et al*., 2007; Tan *et al*., 2021). از اتانول ۹۹ درصد به عنوان شاهد استفاده شد:

۱۰۰×[جذب شاهد/(جذب نمونه-جذب شاهد)] = قدرت مهار رادیکال DPPH با آستاگزانتین (٪)

قدرت احیاءکنندگی یون آهن سه ظرفیتی (FRAP)

سنجش قدرت کاهندگی یون فریک با استفاده از روش Irna و همکاران (۲۰۱۷) با اندکی تغییر انجام گرفت. برای انجام این آزمایش، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول آستاگزانتین با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و پس از آن در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از این مرحله، ۲/۵ میلی‌لیتر از تری‌کلرو استیک‌اسید ۱۰ درصد، به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله انتهایی آزمایش، فاز رویی با ۲/۵ میلی‌لیترآب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۰/۱ مولار مخلوط و جذب آن در طول ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب بالاتر، نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است. از دو آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHA[1] و BHT[2] در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر جهت مقایسه استفاده گردید.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه[3] و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS برای آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار EXCEL جهت رسم جداول و اشکال استفاده گردید.

نتایج

تعیین غلظت رنگدانه آستاگزانتین

در جدول ۲، میزان (بازده) استخراج آستاگزانتین با استفاده از دو روش منفرد (حلال استون، ACE) و ترکیبی (پیش‌تیمار حاوی اسیدکلریدریک و سپس استخراج با حلال استون، HCl-ACE) در مراحل مختلف استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی اولیه و ثانویه ارائه شده است. همان‌طوری‌که در این جدول مشاهده می‌شود، میزان (بازده) استخراج آستاگزانتین در روش ترکیبی به صورت معنی‌داری بیشتر از روش منفرد است (p<۰/۰۵). در ادامه مشخص شد که با صابونی‌کردن و خالص‌سازی اولیه و ثانویه، روند استخراج و خالص‌سازی آستاگزانتین به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد و این روند در تیمار حاوی HCl و استون مشهودتر است (p<۰/۰۵). میزان استخراج آستاگزانتین در تیمار استون از ۱۳/۶۵ به ۴۸/۶۵ درصد افزایش داشته درحالی‌که در تیمار حاوی HCl و استون این درصد از ۳۱/۶۵ به ۸۳/۶۵ ارتقاء یافته است.

متعاقب استخراج اولیه از میکروجلبک با پیش‌تیمار اسیدکلریدریک، رنگدانه‌های مختلف جدا شده که در بین آنها، استرهای آستاگزانتین دارای پیک بالایی بوده (AE) و پس از آن سایر رنگدانه‌ها نظیر لوتئین، کانزاگزانتین، اچی‌ننون[4]، آلفاکاروتن[5] وجود داشتند (شکل ۱).

[1] Butylated hydroxyanisole
[2] Butylated hydroxytoluene
[3] One way Anova

[4] Echinenone
[5] α-Carotene

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

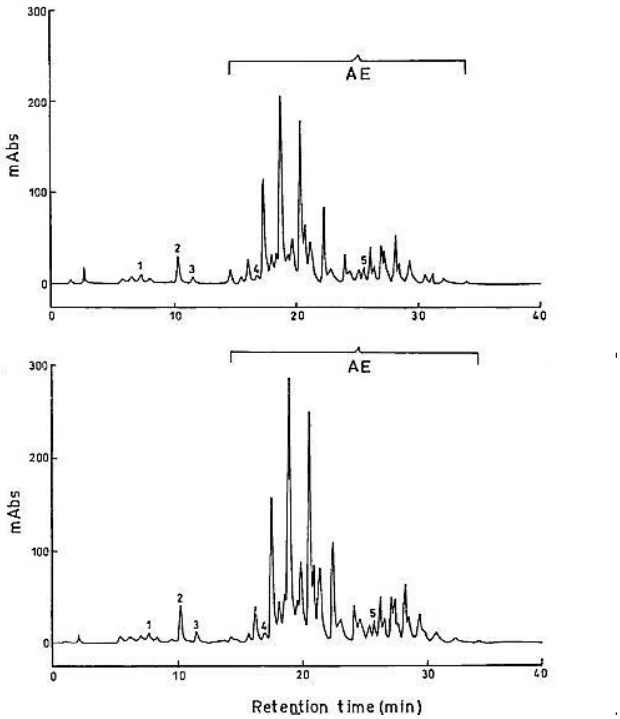
جدول ۲: میزان آستاگزانتین در مراحل مختلف استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* (میلی‌گرم بر گرم)

Table 2: Amount of astaxanthin in different stages of extraction, saponification and purification from *Haematococcus pluvialis* microalgae (mg/g)

مراحل استخراج		نوع تیمار (روش)	
		استون	و استخراج با استون‌HClپیش‌تیمار با
استخراج اولیه	مقدار	^{dB} ۴/۰۹۵ ±۰/۰۷	^{dA}۹/۴۹۵±۰/۱۰
	درصد	۱۳/۶۵	۳۱/۶۵
صابونی‌کردن	مقدار	^{cB}۸/۴۹±۰/۲۱	^{cA}۱۳/۵۹±۰/۲۳
	درصد	۲۸/۳۰	۴۵/۳۰
خالص‌سازی اولیه	مقدار	^{bB} ۱۱/۱۹ ±۰/۱۵	^{bA} ۱۹/۳۹۵±۰/۱۳
	درصد	۳۷/۳۰	۶۴/۶۵
خالص‌سازی نهایی	مقدار	^{aB} ۱۴/۵۹±۰/۱۳	^{aA}۲۵/۰۹۵±۰/۱۷
	درصد	۴۸/۶۵	۸۳/۶۵

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشند (p<۰/۰۵). n= ۵، میزان اولیه آستاگزانتین = ۳٪ وزن خشک جلبک

The lowercase and uppercase letters in the column and row indicate significant differences between the data, respectively (p<0.05). n=5, Initial amount of astaxanthin = 3% dry weight of algae



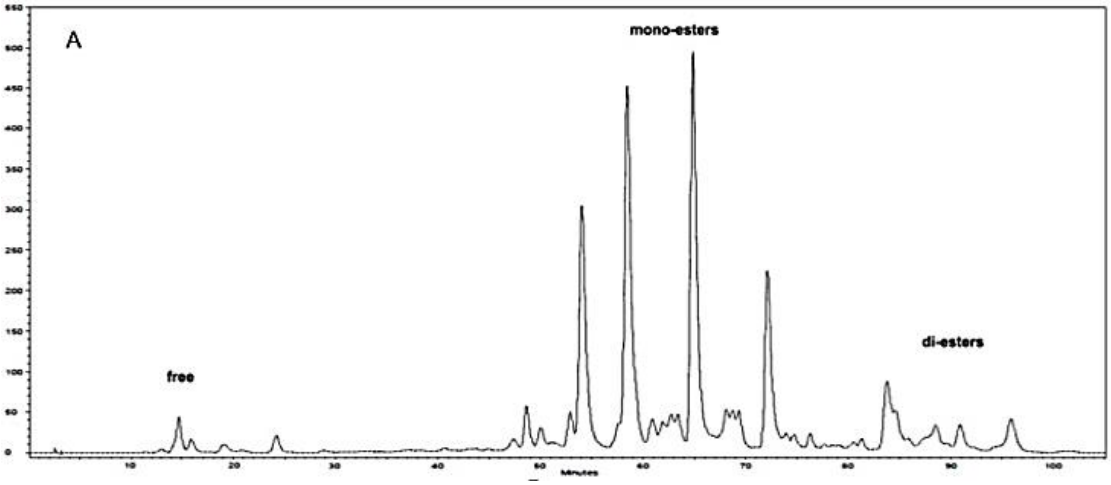
شکل ۱: آنالیز HPLC کاروتنوئیدهای استخراج‌شده از میکروجلبک هماتوکوکوس. دیاگرام بالا: سلول کنترل. دیاگرام پائین: سلول‌های تیمارشده با اسیدکلریدریک و استون. دیاگرام‌ها: ۱: آستاگرانتین آزاد، ۲: لوتئین، ۳: کانزاگزانتین، ۴: اچی‌ننون، ۵: آلفا کاروتن، AE: استرهای آستاگزانتین

Figure 1: HPLC analysis of carotenoids extracted from the *Haematococcus* microalgae. Above diagram: Control cell. Bottom diagram: Cells treated with hydrochloric acid and acetone. Diagrams: 1: Free astaxanthin, 2: Lutein, 3: Canthaxanthin, 4: Echinenone, 5: α-Carotene, AE: Astaxanthin esters

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

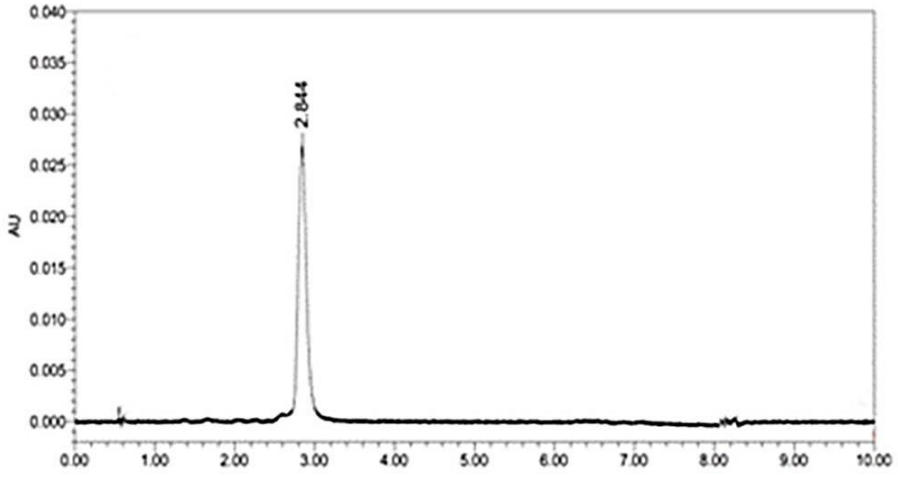
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

در شکل ۲ استرهای آستاگزانتین نشان داده شده است. مطابق این شکل، بیشترین مقدار مربوط به فرم مونواستر بوده و فرم‌های دی‌استر و آزاد در مراتب بعد قرار داشتند. همان‌طوری‌که که در شکل ۲ نشان داده شده است، مقادیر استرهای آستاگزانتین بسیار بالاتر از آستاگزانتین آزاد می‌باشد. بنابراین، ضروری بود که فرآیند صابونی‌کردن، به منظور تبدیل استرهای موجود به فرم آزاد انجام گیرد. پس از هیدرولیز عصاره با هیدروکسید سدیم، استرهای آستاگزانتین به فرم آزاد تبدیل شدند. نتایج HPLC در شکل ۳ نشان می‌دهد که پیک اصلی آستاگزانتین در نقطه ۲/۸۴۴ دقیقه است، اما پس از تیمار با هیدروکسید سدیم، عمده دیاگرام حاصل از HPLC در نقاط ۲/۵۵۷ و ۲/۵۱۳ دقیقه می‌باشد که نشان‌دهنده آستاگزانتین آزاد و مقدار کمی از آستاگزانتین استر است (شکل ۴).



شکل ۲: استرهای آستاگزانتین به همراه فرم آزاد

Figure 2: Astaxanthin esters with free form

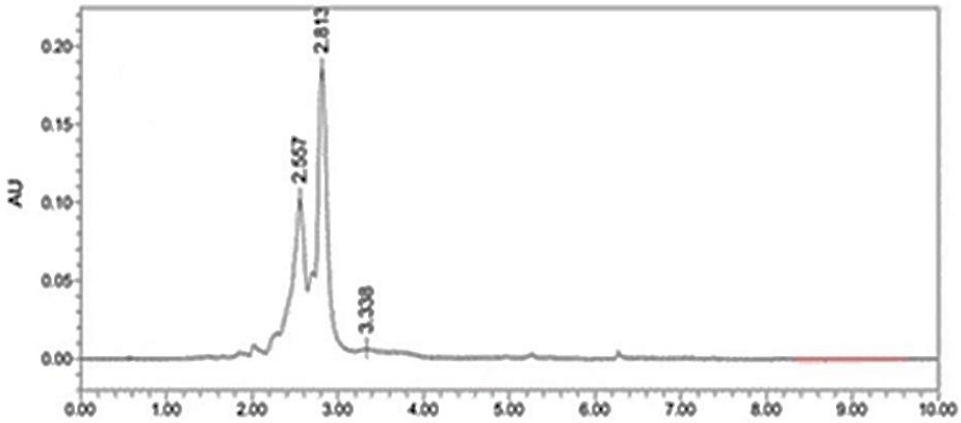


شکل ۳: استاندارد آستاگزانتین

Figure 3: Astaxanthin standard

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]



شکل ۴: دیاگرام فرم‌های آستاگزانتین در عصاره صابونی‌شده میکروجلبک هماتوکوکوس (صابونی‌شده با هیدروکسید سدیم)

Figure 4: Diagram of astaxanthin forms in soaped extract of *Haematococcus* microalgae (soaped with sodium hydroxide)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه آستاگزانتین

در جدول ۳، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH آستاگزانتین استخراج‌شده با دو روش مورد بررسی در غلظت‌های مختلف ارائه شده است. مطابق جدول، با افزایش غلظت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه نیز افزایش می‌یابد، اما در غلظت‌های بالاتر این روند ثابت می‌گردد. همچنین (در تمامی غلظت‌های مورد مطالعه) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج‌شده با تیمار (روش) ترکیبی (HCl و استون) به طور معنی‌داری بیشتر از آستاگزانتین استخراج‌شده با تیمار منفرد (استون) است (p<۰/۰۵). با توجه به جدول ۳، اختلاف میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه مستخرج (در هر دو تیمار) در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر معنی‌دار است (p<۰/۰۵)، اما این اختلاف در غلظت‌های بالاتر (۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نشان داد که آستاگزانتین استخراج‌شده با تیمار ترکیبی در غلظت‌های بالاتر (۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مهار رادیکال آزاد DPPH مطلوب‌تر از BHA عمل کرده است. همچنین رنگدانه مستخرج با روش مذکور، در تمامی غلظت‌ها به‌جز ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، جهت مهار رادیکال آزاد DPPH قوی‌تر از BHT می‌باشد.

جدول ۳: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH آستاگزانتین صابونی‌شده در غلظت‌های مختلف (٪)

Table 3: DPPH free radical scavenging activity of soaped astaxanthin in different concentrations (%)

غلظت (µg/ml) / نوع روش (تیمار)	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰
منفرد (ACE)	۶۶/۲۵ ±۱/۴۵ ^{bB}	۷۵/۴۱±۱/۱۵ ^{aB}	۷۶/۱۱±۱/۲۵ ^{aB}	۷۶/۲۶±۲/۰۶ ^{aB}
ترکیبی (HCl-ACE)	۸۵/۳۹±۲/۱۱ ^{cA}	۹۱/۸۷±۲/۲۹ ^{bA}	۹۳/۳۷±۱/۷۵ ^{aA}	۹۴/۰۶±۲/۴۵ ^{aA}
BHT (mg/l)	-	-	۸۷/۳۸±۱/۸۶	-
BHA (mg/l)	-	-	۹۲/۱۷±۱/۴۲	-

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشند (p<۰/۰۵). n= ۵

The lowercase and uppercase letters in the row and column show significant differences between the data, respectively (p<0.05). n=5

در جدول ۴، نتایج آزمون قدرت کاهندگی (احیاکنندگی) یون فریک آستاگزانتین مستخرج ارائه شده است. با توجه به جدول، با افزایش غلظت از ۵۰ به ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، قدرت احیاءکنندگی (جذب در طول موج ۷۰۰

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

نانومتر) رنگدانه ابتدا روند صعودی دارد، اما در غلظت‌های بالاتر این روند ثابت می‌باشد. مطابق نتایج، قدرت احیاءکنندگی آستاگزانتین استخراج‌شده با تیمار ترکیبی (در تمامی غلظت‌ها) به صورت معنی‌داری بیشتر از آستاگزانتین مستخرج با تیمار حلال استون (منفرد) است (p<۰/۰۵). همچنین تغییرات در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین (در هر دو تیمار مورد بررسی) در غلظت‌های پایین‌تر (۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) معنی‌دار می‌باشد، اما در غلظت‌های بالاتر (۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، این تغییرات معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). از مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه آستاگزانتین و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی BHA و BHT مشخص گردید که قدرت BHA از آستاگزانتین استخراج‌شده با هر دو تیمار (به‌خصوص تیمار منفرد) در کاهندگی یون فریک بیشتر بوده است. همچنین توانایی غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آستاگزانتین استخراج‌شده با تیمار ترکیبی بیشتر از آنتی‌اکسیدان BHT در احیاءکنندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک) می‌باشد.

جدول ۴: قدرت احیاکنندگی یون فریک آستاگزانتین صابونی‌شده در غلظت‌های مختلف (جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر)
Table 4: Reducing power of ferric of soaped astaxanthin in different concentrations (Ab at 700 nm)

غلظت (µg/ml) / نوع روش (تیمار)	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰
منفرد (ACE)	۰/۶۱ ±۰/۰۳ cB	۰/۷۳±۰/۰۵ bB	۰/۷۵±۰/۰۳ aB	۰/۷۵±۰/۰۴ aB
ترکیبی (HCl-ACE)	۰/۷۸±۰/۰۵۲ cA	۰/۸۸±۰/۰۴۵ bA	۰/۹۱±۰/۰۴ aA	۰/۹۲±۰/۰۳ aA
BHT (mg/l)	-	-	۰/۸۹±۰/۰۳	-
BHA (mg/l)	-	-	۰/۹۳±۰/۰۲	-

حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ردیف و ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشند (p<۰/۰۵). n= ۵
The lowercase and uppercase letters in the row and column show significant differences between the data, respectively (p<0.05). n=5

بحث

فرآیند استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی از فرآیندهای اصلی در استخراج آستاگزانتین از میکروجلبک هماتوکوکوس محسوب می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هنگام استفاده از HCl به عنوان پیش‌تیمار اولیه و سپس استفاده از استون به عنوان حلال نهایی (روش ترکیبی)، روند استخراج افزایش چشمگیری داشته است و متعاقب آن نیز درصد بالاتری از آستاگزانتین قابل بازیافت خواهد بود. در روش منفرد (استون)، این روند کمتر بوده و پتانسیل استون به تنهایی کمتر از روش ترکیبی می‌باشد. تاکنون از روش‌های مختلفی جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شده و با توجه به نوع حلال، تیمارهای اولیه، زمان، دما و ...، میزان استحصال این رنگدانه متفاوت بوده است. در مطالعه Sarada و همکاران (۲۰۰۶) که از حلال‌های مختلف جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد، مشخص گردید که هنگام بهره‌گیری از اسیدکلریدریک به عنوان حلال معدنی و سپس استون به عنوان حلال آلی، درصد استخراج آستاگزانتین افزایش معنی‌دار داشته است که این یافته با نتیجه تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد، اما میزان راندمان در پژوهش پیش‌رو اندکی کمتر است که دلیل آن را می‌توان به سویه جلبک مورد نظر که بومی ایران می‌باشد، نسبت داد. همچنین در مطالعه Dong و همکاران (۲۰۱۴) که از چهار روش متانول به همراه استون، ترکیب هگزان-ایزوپروپانول، اسیدکلریدریک به همراه استون و استخراج با روغن سویا استفاده گردید، مشخص شد که ترکیب HCl و استون دارای بالاترین راندمان در استخراج آستاگزانتین (۱۹/۸ میلی‌گرم بر گرم) و روغن از جلبک (۳۳/۳ درصد) بوده است. مقایسه نتایج تحقیق مذکور و پژوهش حاضر نشان می‌دهد که با انتخاب روش و حلال مناسب، حلال منفرد یا ترکیبی می‌توان به بالاترین راندمان استخراج آستاگزانتین و در نهایت به روشی توجیه‌پذیر از نظر اقتصادی دست یافت. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که پیش‌تیمار اولیه جلبک باعث افزایش راندمان

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

آزادسازی کاروتنوئیدها می‌شود. علت این موضوع احتمالاً به دلیل خواص سیزژیستی و هم‌افزایی حلال‌های مورد استفاده می‌باشد. در برخی از موارد نیز این هم‌افزایی وجود نداشته که بر راندمان استخراج رنگدانه آستاگزانتین نیز تاثیرگذار بوده است (Macıas-Sanchez *et al*., 2009; Valduga *et al*., 2009). در مطالعه Dong و همکاران (۲۰۱۴) همچنین شکل و مورفولوژی میکروجلبک هماتوکوکوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره قبل و بعد از تاثیر با حلال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که قبل از تاثیر حلال، شکل میکروجلبک به صورت تیره و فاقد هر گونه صدمه سطحی بوده اما بعد از تاثیر با HCl و استون، رنگ میکروجلبک به سفید تغییر یافته و دیواره سلول کاملاً آسیب دیده است و دارای سطح چین خورده می‌باشد. این امر نشان‌دهنده آزادشدن آستاگزانتین از سلول می‌باشد که رنگ میکروجلبک را به سفید تغییر داده است. اما در سایر تیمارها، جلبک دارای رنگ قهوه‌ای روشن بوده و آسیب کمتری به دیواره سلولی وارد شده است که نشان‌دهنده استخراج ناقص رنگدانه می‌باشد. در تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۸) از روش‌های مختلف اختلاف میدان الکتریکی، اولتراسوند، میکروفلودیزیشن[1] با فشار بالا، اسیدکلریدریک با استون و مایعات یونی جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد. نتایج نشان داد که تکنیک مایعات یونی و روش ترکیبی اسیدکلریدیک و استون، مطلوب‌ترین نتایج را به‌همراه داشتند که نوع حلال آن با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد، اما میزان استحصال در تحقیق پیش‌رو اندکی کمتر می‌باشد. در روش‌های مذکور به‌واسطه تخریب سلول، راندمان استخراج بیشتر از ۸۰ درصد بود. هنگام استفاده از HCl، دیواره سلولی لیز و تخریب می‌شود و در نتیجه قوام خود را از دست می‌دهد. یکی از تفاوت‌های تیمار HCl با سایر روش‌ها، تخریب کامل سلول و آزادشدن تمامی محتویات درون سلولی بوده است که برخی از آنها نظیر سلولز و مشتقات آن تحت تاثیر صابونی‌کردن با HCl قرار می‌گیرند. در واقع، HCl به صورت غیرانتخابی نواحی آمورف سلولز را صابونی می‌کنند و با تخریب دیواره سلولی جلبک و واکنش بین نواحی هیدروفوب آستاگزانتین و استون، رنگدانه جدا می‌گردد. در پژوهش Sun و همکاران (۲۰۱۵) از روش مایکروویو به همراه حلال‌های مختلف جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد. نتایج نشان داد که در بین حلال‌های دی‌کلرومتان، کلروفرم، متانول و استون، مطلوب‌ترین حلال استون بوده است. در تحقیق حاضر نیز از استون به عنوان حلال استخراج استفاده گردید. به منظور افزایش غلظت آستاگزانتین آزاد، استرهای آن بایستی تحت تاثیر صابونی‌کردن قرار گیرند تا به آستاگزانتین آزاد تبدیل گردند. در پژوهش حاضر، جهت صابونی‌کردن از NaOH در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. تحقیق Sun و همکاران (۲۰۱۵) مؤید آن است که دمای بالای صابونی‌کردن در مقایسه با دمای پایین (مثل ۴ درجه سانتی‌گراد) از راندمان بیشتری برخوردار می‌باشد. زمان صابونی‌کردن بایستی در حدی باشد که به رنگدانه آسیبی وارد نشود. برای زمان صابونی‌کردن در تحقیق حاضر، ۳ ساعت در نظر گرفته شد. اگر زمان صابونی‌کردن افزایش یابد، رنگدانه تجزیه شده و از کیفیت و غلظت آن کاسته می‌شود. در مطالعه Dewati و همکاران (۲۰۲۰) از روش مایکروویو به همراه استون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد که ماحصل آن اشکال مختلف آستاگزانتین شامل فرم آزاد (۵٪)، فرم مونو استر (۷۰٪) و فرم دی‌استر (۲۵٪) بود. در مطالعه حاضر، یکی از تیمارها جهت استخراج آستاگزانتین، حلال استون بود. با این تفاوت که به صورت منفرد و در دمای اتاق مورد استفاده قرار گرفت. جهت صابونی‌کردن آستاگزانتین در پژوهش Dewati و همکاران (۲۰۲۰) از سود الکلی و شیک‌کردن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. در تحقیق حاضر (به منظور صابونی‌کردن) از دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت استفاده گردید و راندمان آستاگزانتین از نتایج پژوهش Dewati و همکاران (۲۰۲۰) بیشتر بود. به‌نظر می‌رسد، طولانی‌شدن زمان صابونی‌کردن باعث تجزیه و آسیب به رنگدانه می‌گردد. مطالعه Dewati و همکاران (۲۰۲۰) همچنین نشان داد که با صابونی‌کردن، میزان استحصال آستاگزانتین در مقایسه با نمونه صابونی‌نشده

[1] Microfluidisation

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

بیشتر می‌باشد. این یافته با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد و نشان می‌دهد که بعد از استخراج اولیه، صابونی‌کردن باعث افزایش غلظت آستاگزانتین آزادشده می‌شود. صابونی‌کردن در کمتر از یک ساعت باعث آزادشدن آستاگزانتین می‌شود و سپس غلظت آستاگزانتین شرایط ثابت به‌خود می‌گیرد. هنگام استخراج اولیه، نتایج جذب نوری آستاگزانتین بیشتر مربوط به فرم‌های استری بوده است که با انجام فرآیند صابونی‌کردن، فرم آزاد رنگدانه به ماکزیمم غلظت خود می‌رسد.

در تحقیق حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه آستاگزانتین با استفاده از دو آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک) مورد ارزیابی گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت رنگدانه از ۵۰ به ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، روند فعالیت آنتی‌اکسیدانی ابتدا افزایشی و سپس ثابت می‌شود. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین استخراج‌شده با روش ترکیبی به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر از رنگدانه مستخرج با استفاده از روش منفرد بود. در مطالعه Dong و همکاران (۲۰۱۴) نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه مستخرج با تیمار ترکیبی HCl و استون بیشتر از سایر تیمارها بود که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد و آن را تائید می‌کند. علت این امر، به لحاظ استخراج بیشتر رنگدانه آستاگزانتین در تیمار ترکیبی می‌باشد. زیرا هر چه میزان استحصال رنگدانه بیشتر باشد، بالتبع فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز بالاتر خواهد بود. در مطالعه Dewati و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد که هر چقدر غلظت رنگدانه بیشتر شود، میزان IC_{50}[1] کاهش می‌یابد. در مطالعه Ceron و همکاران (۲۰۰۷) فرکشن‌های مختلف میکروجلبک هماتوکوکوس از نظر آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که قسمت‌های حاوی دی‌استر آستاگزانتین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از سایر متابولیت‌ها نظیر نئوگزانتین[2]، ویوگزانتین[3]، لوتئین، بتاکاروتن، آستاگزانتین مونواستر و آستاگزانتین آزاد است. در تحقیق پیش‌رو به دلیل صابونی‌کردن، اشکال مختلف آستاگزانتین تحت تاثیر قرار گرفته و به فرم آستاگزانتین آزاد تبدیل شده و در نتیجه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزایش یافته است. در تحقیق Irna و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آستاگزانتین استخراج‌شده از میگو مورد ارزیابی قرار گرفت. در تحقیق مذکور، از دو روش شیمیایی و فرآوری در فشار بالا جهت استخراج آستاگزانتین استفاده شد. نتایج آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در روش‌های فشار بالا و روش شیمیایی به ترتیب ۲۰/۴۷ و ۸۷/۹ درصد گزارش گردید. در مطالعه Tan و همکاران (۲۰۲۱) از روش‌های مختلف نظیر میکروفلودیزیشن[4] 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. در آزمایش‌های آنتی‌اکسیدانی با دو آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS، بهترین نتیجه مربوط به روش ترکیبی HCl بود و همچنین مطلوب‌ترین نتیجه FRAP نیز در روش مایعات یونی ثبت شد. به طور کلی و بر اساس تحقیقات می‌توان نتیجه گرفت با توجه به گونه انتخاب‌شده جهت استخراج رنگدانه و همچنین روش‌های مورد استفاده، راندمان استخراج و متعاقب آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز متغیر خواهد بود (Ou *et al*, 2001; Binsan *et al*, 2008; Zulueta *et al*, 2009).

نتایج پژوهش Tan و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد که با افزایش غلظت رنگدانه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نیز افزایش می‌یابد به‌طوری‌که هنگام استفاده از تیمار HCl ترکیبی، در غلظت ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بالاترین میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی در آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH ثبت گردید (نزدیک به ۱۰۰ درصد). در تحقیق حاضر، مشابه مطالعه Tan و همکاران (۲۰۲۱) تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، روند افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشهود بوده اما پس از آن، افزایش فعالیت بسیار کند و تقریباً ثابت بود. به عبارت دیگر، نیاز به

[1] Half-maximal inhibitory concentration
[2] Neoxanthin
[3] Vioxanthin
[4] Microfluidization

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

غلظت‌های بالای آستاگزانتین در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌باشد. به‌نظر می‌رسد، وجود مقادیر بالای آستاگزانتین به همراه اسیدهای چرب چند زنجیره غیراشباع یکی از عوامل بالابودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه است (Sindhu and Sherief, 2011).

از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که روش مورد استفاده جهت استخراج و خالص‌سازی آستاگزانتین، به صورت بالقوه‌ای بازده استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این رنگدانه را تحت تائیر قرار می‌دهد. به این صورت که (بنابر بر یافته‌ها)، روش ترکیبی (HCl و استون) نسبت به تیمار منفرد (استون) منجر به تولید محصولی با بازده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری می‌گردد. در ادامه می‌توان ادعا کرد، غلظت آستاگزانتین یکی از فاکتورهای موثر در بروز و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن است و افزایش غلظت تا حد معینی، این خاصیت را در آستاگزانتین تشدید می‌کند. لذا، در صورت استفاده از رنگدانه مذکور در فرآورده‌های غذایی (به عنوان آنتی‌اکسیدان)، باید به این فاکتور مهم (غلظت) توجه ویژه گردد.

تشکر و قدردانی

محققین پژوهش حاضر بر خود لازم می‌دانند از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر جهت حمایت مالی و در اختیار نهادن تجهیزات تخصصی آزمایشگاهی تقدیر و تشکر به‌عمل آورند.

منابع

Ambati, R.R., Phang, S.M., Ravi, S. and Aswathanarayana, R.G., 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152. Doi: 10.3390/md12010128

Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M. and Kishimura, H., 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106(1), 185-193. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.05.065

Cerón, M.C., García-Malea, M.D.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernández, J.M., Del Río, E. and Molina, E., 2007. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 1112-1119. Doi: 10.1007/s00253-006-0743-5.

Chen, H.M. and Meyers, S.P., 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, 47(3), 892-896. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb12739.x

Dewati, P.R., Rohman, A. and Budiman, A., 2020. A Preliminary Study of Extraction and Purification Processes of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialisas* a Natural Antioxidant. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012032). IOP Publishing. Doi: 10.1088/1757-899X/778/1/012032

Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S. and Liu, Y., 2014. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 1-7. Doi: 10.1155/2014/694305.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

Irna, C., Jaswir, I., Othman, R. and Jimat, D.N., 2018. Comparison between high-pressure processing and chemical extraction: Astaxanthin yield from six species of shrimp carapace. *Journal of Dietary Supplements*, 15(6), 805-813. Doi: 10.1080/19390211.2017.1387885

Kang, C.D. and Sim, S.J., 2007. Selective extraction of free astaxanthin from *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. *Biotechnology Progress*, 23(4), 866-871. Doi: 10.1021/bp0700354

Liu, X. and Osawa, T., 2007. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 187-193. Doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.120

Liu, X.J., Wu, Y.H., Zhao, L.C., Xiao, S.Y., Zhou, A.M. and Liu, X., 2011. Determination of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* by first-order derivative spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 94(6), 1752-1757. Doi: 10.5740/jaoacint.10-177

Liu, Z.W., Zeng, X.A., Cheng, J.H., Liu, D.B. and Aadil, R.M., 2018. The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(9), 2212-2219. Doi: 10.1111/ijfs.13810

Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodriguez, M.D.L., De La Ossa, E.M., Lubián, L.M. and Montero, O., 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77(3), 948-952. Doi: 10.1016/j.talanta.2008.07.032

Mayne, S.T., 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, 10(7), 690-701. Doi: 10.1096/fasebj.10.7.8635686

Miki, W., 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 63(1), 141-146. Doi: 10.1351/pac199163010141

Molino, A., Rimauro, J., Casella, P., Cerbone, A., Larocca, V., Chianese, S. and Musmarra, D., 2018. Extraction of astaxanthin from microalgae *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. *Journal of Biotechnology*, 283, 51-61. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.010

Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R.L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. Doi: 10.1021/jf010586o

Ranga Rao, A., 2011. *Production of astaxanthin from cultured green alga Haematococcus pluvialis and its biological activities* (Doctoral dissertation, University of Mysore).

Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D. and Ravishankar, G.A., 2006. An efficient

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7585-7588. Doi: 10.1021/jf060737t

Sindhu, S. and Sherief, P.M., 2011. Extraction, characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of carotenoids from the shell waste of arabian red shrimp *Aristeus alcocki*, ramadan 1938. In *The Open Conference Proceedings Journal* (Vol. 2, No. 1). Doi: 10.2174/2210289201102010095

Sun, W., Lin, H., Zhai, Y., Cao, L., Leng, K. and Xing, L., 2015. Separation, Purification, and Identification of (3S, 3′ S)- trans-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 50(9), 1377-1383. Doi:10.1080/01496395.2014.976873

Tan, Y., Ye, Z., Wang, M., Manzoor, M.F., Aadil, R.M., Tan, X. and Liu, Z., 2021. Comparison of Different Methods for Extracting the Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Chemical Composition and Biological Activity. *Molecules*, 26(12), 3569. Doi: 10.3390/molecules26123569

Valduga, E., Valério, A., Tatsch, P.O., Treichel, H., Furigo, A. and Di Luccio, M., 2009. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Food and Bioprocess Technology*, 2(2), 234-238. Doi: 10.1007/s11947-008-0133-3

Yuan, J.P. and Chen, F., 2000. Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalgae *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, 68(4), 443-448. Doi: 10.1016/S0308-8146(99)00219-8

Zulueta, A., Esteve, M.J. and Frígola, A., 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316. Doi: 10.1016/j.foodchem.2008.09.033.

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]

Comparison and evaluation of extraction efficiency and antioxidant activity of astaxanthin extracted from Haematococcus microalgae (*Haematococcus pluvialis*) using acetone solvent and acid-acetone combined technique

Safari R.[1*]; Nasrollahzadeh H.[1]; Reyhani Poul S.[2]; Yaghoubzadeh Z.[1]; Rezaei M.[1]

* Safari1351@gmail.com

1-Caspian Sea Ecological Research Center, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Sari, Iran
1- Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

The aim of the present study was to extract, saponify and purify astaxanthin pigment from *Haematococcus* microalgae (*Haematococcus pluvialis*) and evaluate its antioxidant activity (DPPH free radical scavenging activity and reduction of ferric ions). For extraction, two single (extraction using acetone solvent or ACE) and combined (extraction by pretreatment with hydrochloric acid and then extraction with acetone or HCl-ACE) methods were used. According to the results, amount of extracted astaxanthin (mg/g) by two methods of acetone (ACE) and hydrochloric acid pretreatment (HCl-ACE), in the extraction, saponification and final purification stages were 4.09 (13.65%), 8.49 (28.30%), 14.59 (48.65%) and 9.49 (31.65%), 13.59 (45.30%) and 25.09 (83.65%), respectively. DPPH free radical inhibition activity of extracted astaxanthin with two ACE and HCl-ACE methods (50 to 300 µg/ml) ranged from 66.25 to 76.26% and 85.39 to 94.06%, respectively. These values for ferric ion reduction power were in the absorption range of 0.61 to 0.75 and 0.78 to 0.92 at the wavelength of 700 nm, respectively. The pigment extracted using the combined method (compared to the single method) had significantly more antioxidant activity (p<0.05). In addition, in both tests, increasing the concentration of astaxanthin up to 100 µg/ml, the trend of antioxidant activity was recorded as increasing and then constant (no significant difference between the concentrations of 200 and 300 µg/ml). Comparison of the antioxidant activity of astaxanthin with synthetic antioxidants showed that the pigment extracted by combination method (at high concentrations) had the activity closer or even more than BHA and BHT. According to the findings, the combined method (acid-acetone) compared to the single method (acetone) can improve the extraction efficiency and antioxidant activity of this pigment. Therefore, the method used for the extraction and purification of astaxanthin potentially affects its extraction efficiency and antioxidant activity, and by choosing the extraction optimum method, the mentioned two indicators can be improved in the pigment.

Keywords: *Haematococcus* microalgae, Astaxanthin, Extraction efficiency, Antioxidant activity

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.3.8.4]