Review Article

DOI: 10.22034/IJCHE.2021.299781.1134

DOR: 20.1001.1.17355400.1401.21.123.4.0

This journal is an open access journal licensed under an Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International license(CC BY-NC-ND 4.0).

A Review on the Extraction of Chlorophyll and Carotenoids from Microalgae

L. Nedaei[1], H. Shokrkar[2*]

1- B. Sc. Student of Chemical Engineering, Sahand University of Technology

2- Assistant Professor of Chemical Engineering, Sahand University of Technology

E-mail: shokrkar@sut.ac.ir

Abstract

Chlorophyll and carotenoids are essential compounds in many everyday products. These substances are used not only as an additive in pharmaceutical and health products but also as a natural food coloring. In addition, they have antioxidant and anti-mutagenic properties. Extraction of these compounds is based on cell degradation methods and the chemical solubility of the compounds. Methods of separation of these compounds include chromatographic, solvent, supercritical, enzymatic, ultrasound, and microwave methods. One of the most important issues related to the extraction of chlorophyll and carotenoids from microalgae in the culture medium is the need for an efficient, cost-effective, and high-yield extraction process. The greatest limitation in the biological processing of pigments is related to the installation of equipment and operation. Therefore, the purpose of this study is to investigate the main methods for the extraction of chlorophyll and carotenoids from microalgae by considering the advantages and disadvantages of each method.

Received: 14 August 2021
Accepted: 30 October 2021
Page Number: 45-58

Keywords:

Extraction,
Microalgae,
Chlorophyll,
Carotenoid

Please Cite this Article Using:

Nedaei, L., Shokrkar, H., "A Review on the Extraction of Chlorophyll and Carotenoids from Microalgae", Iranian Chemical Engineering Journal, Vol. 21, No. 123, pp. 45-58, In Persian, (2022).

مقـــالـــه مـــروری

DOI: 10.22034/IJCHE.2021.299781.1134
DOR: 20.1001.1.17355400.1401.21.123.4.0

This journal is an open access journal licensed under an Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International license(CC BY-NC-ND 4.0).

مروری بر استخراج کلروفیل و کاروتئونید از ریزجلبک‌ها

لیلا ندایی[۱]، هانیه شکرکار[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند

پیام نگار: h_shokrkar@sut.ac.ir

چکیده

کلروفیل و کاروتئونیدها نه‌تنها به‌عنوان افزودنی در محصولات دارویی و بهداشتی، بلکه به‌عنوان مواد رنگ‌کنندهٔ طبیعی که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند، استفاده می‌شوند. استخراج این ترکیبات براساس روش‌های تخریب سلولی و حلالیت شیمیایی ترکیبات است. از روش‌های جداسازی این ترکیبات، می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی، حلال، مایعات فوق بحرانی، آنزیمی، امواج فراصوت و مایکروویو اشاره کرد. از مهم‌ترین موضوعات مرتبط با استخراج کلروفیل و کاروتئونید از ریزجلبک‌ها در محیط کشت، احساس نیاز به یک فرایند استخراج کارآمد، مقرون به‌صرفه و با بازده بالاست. بیشترین محدودیت در پردازش زیستی رنگدانه‌ها مربوط به هزینه‌های نصب تجهیزات و بهره‌برداری از آن‌هاست. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی روش‌های اصلی در استخراج کلروفیل وکاروتئونید از ریزجلبک‌ها با در نظر گرفتن برتری‌ها و کاستی‌های هرکدام از روش‌هاست.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸
شماره صفحات: ۴۵ تا ۵۸

کلیدواژه‌ها:
استخراج،
ریزجلبک،
کلروفیل،
کاروتئونید

* تبریز، دانشگاه صنعتی سهند، دانشکدهٔ مهندسی شیمی

استناد به مقاله:
ندایی، ل.، شکرکار، ه.، "مروری بر استخراج کلروفیل وکاروتئونید از ریزجلبک‌ها"، نشریه مهندسی شیمی ایران، سال بیست‌ویکم، شماره ۱۲۳، صص. ۵۸-۴۵، (۱۴۰۱).

۱. مقدمه

ریزجلبک‌ها، ریزاندام‌های فتوسنتزی پروکاریوت یا یوکاریوت هستند که می‌توانند سریع رشد کنند و در شرایط سخت به‌علت ساختار تک‌سلویی یا چند سلولی ساده به‌راحتی زندگی کنند[۱]. ریزجلبک در تمام زیست‌بوم‌های روی کرهٔ زمین از اقیانوس‌ها و آب‌های تازه تا چشمه‌های آب گرم، برف، یخ و حتی در شن‌های صحرا وجود دارند. جلبک فاقد ریشه، ساقه و برگ و دارای کلروفیل به‌عنوان مادهٔ اولیهٔ رنگینهٔ فتوسنتزی است. جلبک تحت شرایط رشد طبیعی، نور را از خورشید، دی‌اکسیدکربن را از هوا و مواد غذایی را از زیستگاه آبی جذب می‌کند. ریزجلبک به‌سبب ساختار تک‌سلولی یا چندسلولی سادهٔ خود توانایی زنده‌ماندن را در شرایط ناملایم و سخت دارند[۱]. عوامل مؤثر بر رشد ریزجلبک‌ها شامل شدت و مقدار نور، دما، شوری، دی‌اکسیدکربن، اکسیژن، کنترل مقدار نیتروژن، شرایط عملیاتی مانند عمق، تنش ناشی از اختلاط و دورهٔ برداشت است[۲]. ریزجلبک کاربردهای تجاری زیادی در صنایع مختلف کشاورزی، شیمی، داروسازی، انرژی، غذا، کاغذ، شیشه و منسوجات دارد[۳،۴]. انواع چربی‌ها، اسیدهای چرب غیراشباع، روغن، رنگ‌های طبیعی، رنگدانه‌ها، انواع قندها، آنتی‌اکسیدان‌ها، زیست‌پلیمرها، پروتئین‌ها، خوراک دام مواد با ارزشی هستند که از این زیست‌توده استخراج می‌شوند[۵]. هرچند تولید ریزجلبک‌ها دارای کاستی‌هایی از قبیل سختی کنترل فرایند، تجمع زیاد دی‌اکسید کربن با راندمان پایین[۶]، مشکلات آلودگی و نیاز بهینه به مقادیر زیادی از نمک و تابش نور خورشیدی است[۶]. کشت ریزجلبک یکی از شاخه‌های مدرن زیست‌فناوری است. اولین کشت ریزجلبک را در سال ۱۸۹۰ بیجرینک[1] و همکاران انجام دادند[۵]. هم‌چنین، اولین کشت مقیاس بزرگ ریزجلبک را- در اوایل ۱۹۶۰ در ژاپن- نیهون[2] و همکاران با کشت کلرلا آغاز کردند[۷]. به‌طور تقریبی بیش از ۵۰،۰۰۰ گونه ریزجلبک وجود دارد که از این گذشته مجموعه‌های بزرگی از ریزجلبک را پژوهشگران درکشورهای مختلف به وجود آورده‌اند[۸]. به‌عنوان نمونه، بزرگ‌ترین مجموعهٔ ریزجلبک آب‌های تازه در دانشگاه کوییمبرا کشور پرتغال تنوع گسترده‌ای از ریزجلبک‌های مختلف را در اختیار دارد که می‌تواند برای کاربردهای گوناگون از قبیل فرآورده‌های با ارزش افزوده برای اهداف دارویی، فرآورده‌های غذایی برای مصارف خوراکی و نیز به‌عنوان منبع انرژی استفاده شوند[۹،۱۰]. امروزه ریزجلبک‌ها به‌دلیل سرعت رشد بالا و قابلیت رشد در محیط کشت‌های متنوع، به‌عنوان منبعی ارزشمند برای تولید رنگدانه‌ها توجه یافته‌اند[۲]. رنگدانه‌ها درون کلروپلاست سلول قرار دارند؛ استخراج کلروفیل وکاروتئونید از ریزجلبک شامل چندمرحله از جمله انتخاب ریزجلبک، کشت ریزجلبک (نور، آب، دی‌اکسیدکربن و مواد غذایی)، برداشت، خشک‌کردن، شکستن دیوارهٔ سلولی و در پایان استخراج کلروفیل وکاروتئونید است. از روش‌های جداسازی این ترکیبات، می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی، حلال‌ها، جذب سطحی، امواج فراصوت، مایعات فوق بحرانی اشاره کرد. بنابراین، هدف از این تحقیق بررسی و مطالعهٔ روش‌های استخراج کلروفیل وکاروتئونید از ریزجلبک‌هاست.

۲. روش‌های استخراج کلروفیل و کاروتئونید

۲-۱ استخراج به‌کمک حلال

یکی از روش‌های استخراج، استفاده از حلال است. روند استخراج با حلال مستلزم مخلوط‌کردن دو مرحله (حلال + زیست توده) است تا تماس مناسب محلول با حلال، تا زمان ایجاد تعادل برقرارشود. انتقال از یک فاز به فاز دیگر با نسبت‌های شیمیایی انجام می‌شود. برتری اصلی این نوع استخراج، کاهش هزینه از نظر زیرساخت‌ها و رویه‌های عملیاتی است. از طرف دیگر، استخراج کاروتئونید با حلال، به‌دلیل عملیات حرارتی، اغلب به مقدار زیادی حلال آلی، یا حتی مدت‌زمان طولانی نیاز دارد[۱۱]. هنگام انتخاب یک حلال، حلالیت ترکیب، سمیت و تأثیر بوم‌شناختی بقایا از نکات مهمی است که باید در نظر گرفته شود. استخراج انجام‌شده با حلال‌های آلی زمانی اتفاق می‌افتد که حلال در دیوارهٔ سلول، جذب و باعث پارگی و درنتیجه قراردادن محتوای سلول برای استخراج می‌شود. استخراج کامل می‌تواند مدت‌زمان زیادی طول بکشد و معمولاً با هم‌زدن یا مخلوط‌کردن می‌توان بازدهٔ بهتری را به دست آورد[۱۱،۱۲]. تنها در موارد معدودی که ریز جلبک به‌دلیل ترکیب سلول به روش‌های سخت نیاز ندارد، استخراج حلال می‌تواند به اندازهٔ سایر روش‌ها کارآمد باشد. به‌عنوان مثال، *ایزوکروسیس گالبانا*[3] منبعی از فوکوکسانتین است که می‌توان از راه استخراج یک حلال با اتانول

1. Bijrink
2. Nihoon
3. Isochrysis Galbana

بـه دسـت آورد[۱۳]. اسـتخراج آسـتاگزانتین از هما*توکوکوس پلوویالیس*[1] با استفاده از حلال‌های آلی مانند کلروفـرم و متـانول یـا بیشتر از حلال‌های سازگار با محیط زیست مانند استون، استات اتیل و اتانول انجام می‌شود[۱۴]. استخراج یک حلال با استون مـی‌توانـد باعث تجزیه و استخراج رنگدانه‌های دیوارهٔ سلولی شود، اگرچه بـازده فرایند نسبتاً پایین و نیاز به‌مدت طولانی دارد[۱۴،۱۵]. هم‌چنین، در تحقیقات دیگر از حلال‌هایی مانند دی‌متیل اتر و هگزان در استخراج کاروتنوئیدها وکلروفیل استفاده شده اسـت[۱۶،۱۷]. کلروفیـل‌هـا و کاروتنوئیدها رنگدانه‌هـای محلـول در چربـی هسـتند کـه گیاهـان، جلبـک‌هـا، فیتوپلانکتـون‌هـا و برخـی قـارچ‌هـا و بـاکتری‌هـا تولید می‌کنند[۱۸،۱۹]. براساس نتایج[۲۰] در اتـانول ۱۰۰٪ بهتـر حل می‌شوند. مطالعاتی در زمینهٔ تأثیر حلال آلی انتخابی در فرایند استخراج رنگدانه‌ها از جلبک دریایی انجام شده است[۲۳-۲۱]. هدف از این مطالعات به‌دست‌آوردن یک حلال مـؤثر در فراینـد اسـتخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از سه جلبک دریایی (سبز، قرمز و قهوه‌ای) بود. به‌منظور تعیین مقدار کلروفیل در یک گونهٔ خـاص، ابتـدا بایـد کلروفیل داخل سلولی استخراج شود[۲۰]. فراینـد اسـتخراج شـامل نفوذ حلال آلی از غشای سـلول و حـل‌شـدن لیپیـدها و هـم‌چنـین لیپوپروتئین‌های غشاهای کلروپلاست است. مشخص شده اسـت کـه اختلال سلولی، حاصل از آسیاب‌کردن، همگن‌سازی، امواج فراصـوت، به‌طور چشم‌گیری باعث بالارفتن میزان استخراج کلروفیل با استفاده از حلال‌های آلی می‌شود.[۲۴]. سیمون و هلیول[۲۵] دریافتنـد کـه بـدون ایجـاد اخـتلال در سـلول، فقـط یـک چهـارم کلروفیـل و کاروتنوئیدهای بالقوه با استفاده از یک روش بهینـه قابـل اسـتخراج است. علاوه بـر اخـتلال سـلول، مشخصـه‌هـای دیگـری بـر کـارایی استخراج حلال آلی تأثیر می‌گذارند؛ از جمله شـرایط ذخیـره‌سـازی ریزجلبک‌های فیلترشده قبل از تجزیـه و تحلیـل، حـلال‌هـای آلـی استفاده‌شده، مدت‌زمان استخراج و تعداد مراحل استخراج در تجزیه و تحلیل است[۲۶]. آقاجانپور و همکاران[۲۷] در مطالعه‌ای از نمونهٔ جلبـک‌هـای قهـوه‌ای *سارگاسـوم آنگوسـتیفولیوم*[2] بـرای اسـتخراج کلروفیل و کاروتئونید استفاده کردند. این مطالعه با استفاده از حلال آب و اتانول با ۵ غلظـت ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصـد اتـانول، در ۳ مدت‌زمان استخراج ۲، ۴، ۶ سـاعت و ۴ نسـبت جامـد- مـایع ۵:۱، ۱۰:۱ و ۱۵:۱ انجام شده اسـت. حـد اکثـر میـزان کـل کلروفیـل و کاروتئونید در اتانول ۱۰۰ ٪ و مدت‌زمان ۴ ساعت و نسبت جامد بـه مایع ۵:۱ به‌ترتیب ۵/۲۸ و ۲/۱۸ بـه دسـت آمـد. بـرای کلروفیـل a حداکثر میزان در اتانول ۱۰۰٪ و مدت‌زمان ۶ ساعت و نسبت جامـد بـه مـایع ۱۰:۱، ۰/۰۶ بدسـت آمـد[۲۸]. در پـژوهش مـیس و همکاران[۲۰] شناسایی کاروتئونید و کلروفیل از جلبک‌های سـبز و استخراج آن با حـلال دی‌متیـل اتـر و اسـتون در دمـای ۴۱ درجـهٔ سلسیوس، نسبت مایع به حلال ۴۵:۱ و زمان ۲۰ دقیقه بررسی شد. شرایط عملیاتی برای هر دو حلال یکسـان بـود. میـزان کلروفیـل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتئونید از حلال استون به‌ترتیب برابـر بود با ۵/۹۰، ۴/۱۱، ۱۰/۰۱، ۲/۰۱ و از حلال دی‌متیل اتر به‌ترتیـب برابر بـا ۳/۹۵، ۴/۵، ۸/۴۵، ۴/۱۱ بـود. نتـایج حـاکی از آن بـود کـه میزان کاروتئونید وکلروفیل b اسـتخراجی بـا حـلال دی‌متیـل‌اتـر و میزان کلروفیل کل و کلروفیل a به‌هنگام استخراج با حـلال اسـتون بازده بالایی دارند[۲۰]. بـا توجـه بـه مطالعـات قبلـی بـر اسـتخراج کاروتئونید و کلروفیل با حلال آلی، سایمون و هلیول[۲۵]، سارتوری و گروبلار[۲۹] و جفری و همکاران[۳۰] متانول و اتانول را به‌عنـوان حلال‌های استخراج برتـر نسـبت‌بـه اسـتون دریافتنـد. در مطالعـات جفری و همکاران[۳۰] و سنچز و همکاران[۳۱]، دی‌متیـل‌فرامیـد حلال استخراج برتری نسبت‌به متانول ۹۰٪، اتـانول ۱۰۰٪ و اسـتون ۹۰٪ شناخته شد. استخراج با استفاده از دی‌متیل‌فرامید به اختلال سلول احتیاج ندارد؛ زیرا رنگدانه‌ها پـس از چنـد مرحلـه خیسـاندن کاملاً استخراج مـی‌شـوند. بـا ایـن حـال، طبیعـت سـمی دی‌متیـل فرامید از جذابیت آن به‌عنوان یک حلال کارآمد کاسته است[۳۰].

۲-۲ استخراج با کروماتوگرافی

از تکنیک‌های کروماتوگرافی، برای تقسیم و کمی‌سـازی کلروفیـل و محصولات مشتق‌شدهٔ آن استفاده می‌شود. سـه نـوع کروماـتوگرافی؛ کاغذی، لایه نازک (TLC[3]) و کروماتوگرافی مایع فشار بالا (HPLC[4]) به‌طور گسترده استفاده می‌شود. کروماتوگرافی کاغذی بیشتر در دههٔ ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ در مراحل اولیهٔ توسعهٔ تکنیـک‌هـای کروماـتوگرافی استفاده می‌شد[۳۲]. این روش به‌طور مؤثر کلروفیل را به سه بخش، فـوفیتین‌هـا، کـاروتن‌هـا و سـایر محصـولات مشـتق‌شـده

1. H. Pluvialis
2. S. Angustifolium
3. Thin Layer Choromatography
4. Hight Performance Liquid Choromatography

جدا می‌کند[۳۰،۳۳]. با این حال، به‌دلیل سهولت در بازیابی کمی رنگدانه‌ها، TLC برکروماتوگرافی کاغذی ارجح است[۳۴]. در کروماتوگرافی کاغذی بازده استخراج هرگز از ۸۰٪ فراتر نمی‌رود[۳۷-۳۵]. علاوه بر این، TLC با تعداد نمونه‌های کمتر، کروماتوگرام‌هایی با وضوح بیشتر تولید می‌کند[۳۷،۳۸]. جاذب‌های آلی مانند ساکارز و سلولز کارآمدترین فازهای ثابت برای استفاده در کروماتوگرافی لایه‌نازک دوفازی هستند[۳۵]. رایلی و ویلسون[۳۷] و لین کو و شندرل[۳۸] از ژل سیلیکا به‌عنوان فاز ساکن استفاده کردند و موفق شدند تا تمام رنگدانه‌ها را به‌جز برخی از اجزای جزئی به‌طور کامل جدا کنند. با این حال، جفری و همکاران[۳۵] دریافتند که استفاده از ژل سیلیکا باعث تخریب کلروفیل می‌شود.HPLC از TLC برتر است؛ به‌دلیل نیاز به نمونهٔ کمتر برای تجزیه و تحلیل، سریع‌تر بودن و برخورداری از تشخیص خودکار است[۳۹،۴۰]. از کاستی‌های HPLC این است که با نمونه‌های آبی سازگار نیست؛ در حالی‌که بسیاری از حلال‌هایی که برای استخراج کلروفیل از ریزجلبک‌ها استفاده می‌شود، پایه‌آبی هستند[۳۲]. انواع مختلف آشکارساز وجود دارد که می‌تواند برای اندازه‌گیری غلظت رنگدانه‌های جداشده هنگام خروج از ستون استفاده شود. آشکارسازهای متداول مورد استفاده در تجزیه و تحلیل فلورسانس و جذب است. جفری و همکاران[۳۰] بیان می‌کند که هنگام استفاده برای تجزیه و تحلیل کلروفیل‌ها در بین کاروتنوئیدها، تشخیص فلورسانس حساس‌تر و انتخابی‌تر از آشکارسازهای جذب است. بابادی و همکاران[۴۱] به بررسی بازیابی کاروتئونیدها از چندین گونه ریزجلبک با استفاده از صابون‌سازی قلیایی پتاسیم هیدروکسید در دماهای مختلف و غلظت‌های مختلف پرداختند[۴۱]. سرون و همکاران[۴۲] بر روی ریزجلبک *کلامیدو موناس اسیدوفیل*[1]، در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و با شدت نور $160\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ مطالعه کردند. در این مطالعه تأثیر شدت نور زیاد، تشعش UV-A و دما بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد که در شدت نور $240\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ میزان کل کاروتنوئید تولیدشده برابر با $1\pm6\ mg\ L^{-1}$ و میزان بتاکاروتن تولیدشده برابر با $57/5\ mg\ L^{-1}$ $0/2\pm8/3$ است و این میزان تفاوت مهمی با شرایطی که شدت نور در آن $1000\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ باشد، ندارد. این ریزجلبک در شرایط کشت عادی نیز بتاکاروتن تولید می‌کند؛ اما تحت استرس‌هایی هم‌چون تشعشع UV-A، شدت نور $10\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ و یا در دمای ۴۰ درجهٔ سلسیوس افزایش می‌یابد[۴۲].

۳-۲ استخراج با جذب سطحی

در فرایند جذب سطحی، انتقال یک جزء از فاز گاز یا مایع به سطح جامد انجام می‌گیرد. جذب سطحی یک فرایند انتقال جرم است که به‌طور کلی به‌عنوان تراکم مواد در هنگام تماس دو فاز تعریف می‌شود. به‌عبارت دیگر مواد شیمیایی موجود در فاز مایع که ترجیحاً روی سطح جامد غیراشباع تجمع یافته‌اند، سبب می‌شوندکه مواد شیمیایی از فاز مایع خارج شوند[۴۳]. در فرایند جذب سطحی فاز مایع، برهمکنش‌های بین جاذب و جذب‌شونده و عوامل متعدد دیگری روی ظرفیت جذب جاذب تأثیر می‌گذارند. به‌طور کلی سه عامل روی جذب مؤثر هستند. ماهیت جاذب مانند ساختار فیزیکی (مساحت سطح، اندارهٔ ذرات، تخلخل)، ساختار شیمیایی (بار یونی)، گروه‌های عاملی (تنوع و تراکم آن‌ها)، شیمی مادهٔ جذب شونده (قطبیت، گروه عاملی، حلالیت، وزن مولکولی و اندازه) و شرایط محلول هم‌چون هم‌زدن، دما، pH، مقدار مصرفی جاذب و غلظت مادهٔ جذب شونده، هستند[۷]. از مادهٔ فعال سطحی کاتیونی، می‌توان برای بهبود استخراج محصولات با ارزش از ریزجلبک‌ها استفاده کرد. در پژوهشی تأثیر زمان و غلظت با دو مادهٔ فعال سطحی کاتیونی، دودسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید و هگزا دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید برای استخراج کاروتنوئیدها و کلروفیل a، از جلبک *دونالیلا سالینا*[2] بررسی شده است[۴۳]. استخراج رنگدانه‌ها با طول زنجیرهٔ آلکیل طولانی‌تر، هگزا دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید بیشتر است؛ زیرا زنجیرهٔ طولانی آلکیل‌هگزا دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید نفوذپذیری غشای سلولی را افزایش می‌دهد. در غلظت ۲۵ میلی مولار هگزا دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید و تیمار به‌مدت ۵ ساعت بالاترین میزان رنگدانه حاصل می‌شود. در مقابل، بازیابی چربی با طول کوتاه‌تر زنجیرهٔ آلکیل، دو دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید بیشتر است. دودسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید سلول‌ها را مختل و به حلال اجازه می‌دهد تا به چربی‌های بیشتری که در سلول‌ها وجود دارد، دسترسی پیدا کند. در غلظت ۱۰ میلی‌مولار دو دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید و مدت‌زمان ۵ ساعت بالاترین میزان چربی‌ها حاصل می‌شود[۴۲]. در پژوهش

1. Chlamydomonas Asidoful

2. D. Salina

رستگاری و همکاران[۴۴]، تأثیر مادهٔ فعال سطحی آنیونی سدیم دو دسیل سولفات با غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و PHهای ۷، ۸، ۹،۱۰ در رشد جلبک *دونالیلا ویریدس*[1] بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های متفاوت مادهٔ فعال سطحی سدیم دودسیل سولفات در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و دورهٔ نوری صفر تا ۲۴ ساعت و سرعت نور ۶۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بر رشد و در نتیجه بر میزان استخراج کلروفیل و کاروتئونید تأثیرگذار است. براساس نتایج، در غلظت محدودهٔ ۱۰ میلی‌گرم برلیتر مادهٔ فعال سطحی موجب مهار رشد، سموم‌شدگی تودهٔ جلبکی و درنتیجه کاهش کلروفیل و کاروتئونید می‌شود. که با یافته‌های جیمنز و همکاران[۴۵] تطابق دارد. با کنترل محیط کشت حاوی مادهٔ فعال سطحی در محدودهٔ PH برابر ۸، بیشترین تراکم سلولی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمده است. نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های مسسیک[۴۶] مطابقت دارد. در بررسی مسسیک[۴۶] بر روی جلبک *دونالیلا سالینا* در محیط کشت حاوی مادهٔ فعال سطحی، سدیم دودسیل سولفات در محدودهٔ PH برابر ۹، بیشترین تراکم سلولی و استخراج کلروفیل و کاروتئونید در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمده است.

۲-۴ استخراج با مایعات فوق بحرانی

اولین‌بار در سال ۱۸۷۹ هانای[2] و هوگارت[3] از استخراج مایعات فوق بحرانی به‌عنوان یک روش استخراجی جای‌گزین معرفی کردند. با این حال، حدوداً در سال ۱۹۶۰ بود که این روش استخراج به‌طور کامل بررسی شد. استخراج مایعات فوق بحرانی مبتنی بر استفاده از یک حلال در شرایط بحرانی دما و فشار است[۴۷]. انتخاب حلال مهم‌ترین موضوع در طراحی یک فرایند استخراج فوق بحرانی است. حلال‌هایی که به‌عنوان سیال فوق بحرانی به کار می‌روند باید دارای ویژگی‌هایی مانند حلالیت بالا، جداسازی آسان از نمونه، ارزان بودن، فشار بحرانی پایین و سازگاری با محیط زیست باشند. سازگاری با محیط زیست از نکات مورد توجه در انتخاب یک سیال فوق بحرانی است که در این میان دی‌اکسید کربن بسیار مورد توجه است؛ زیرا این ماده دارای نقطهٔ بحرانی پایین (دما ۳۱/۰۶ درجهٔ سلسیوس و فشار ۷۲/۸ بار)، ارزان‌قیمت، پایدار، غیر قابل اشتعال و از نظر زیست‌محیطی قابل پذیرش است و می‌تواند به‌آسانی به سیستم برگردانده شود[۱۵،۴۸]. بنابراین، برای رسیدن به توانایی بیشتر در حلالیت و یا گزینش‌پذیری مناسب‌تر می‌توان از افزودن مقدار کمی کمک‌حلال قطبی مانند متانول، اتانول، استون و یا آب به دی‌اکسید کربن بهره برد[۴۹]. به‌طور کلی، SFE[4] به‌دلیل مصرف کمتر حلال‌های آلی و زمان استخراج کوتاه‌تر، هنگامی که با استخراج به‌روش حلال‌های آلی مقایسه می‌شود، به‌عنوان یک روش سبز شناخته می‌شود. با این حال، محدودیت اصلی SFE هنوز هزینهٔ اجرا و بهره‌برداری از آن است[۱۵،۴۹]. استخراج با مایعات فوق بحرانی با کربن دی‌اکسید برای استخراج کاروتنوئیدها در بسیاری از ریزجلبک‌ها استفاده شده است. در *دونالیلا سالینا*[5]، جیم و همکاران[۵۰] فشار ۴۴۳ بار و دمای ۲۷/۵ درجهٔ سلسیوس را شرایط بهینه برای استخراج β کاروتن یافتند. لیائو و همکاران[۵۱] در *نانوچلروسیس آکلاتا*[6] برای افزایش عمل‌کرد استخراج از افزودن اتانول (به‌عنوان حلال مشترک) استفاده کردند. شرایط مطلوب برای استخراج کاروتنوئیدها در ۳۵۰ بار، دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس تعیین شد[۵۰]. در مورد *نانوچلروسیس گادیتانا*[7]، راضی و همکاران[۵۲] از CO_2 فوق بحرانی برای استخراج کاروتنوئیدها و کلروفیل استفاده کردند. بیشترین عمل‌کرد در فشار ۴۰۰ بار و دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس و بالاترین نسبت کاروتنوئیدها/کلروفیل‌ها نیز با کاهش فشار (۲۰۰ بار) و حفظ دما در ۶۰ درجهٔ سلسیوس به دست آمد. شرایط مطلوب برای استخراج لوتئین و β کاروتن در *سندسموس آلمرینسیس*[8] در دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس و فشار ۴۰۰ بار حاصل شد[۵۲]. برای *سندسموس آبلیکوس*[9]، گیدس و همکاران[۵۳] از روش مایعات فوق بحرانی استفاده کردند. استخراج کاروتنوئیدها، کلروفیل‌ها و نسبت کل کاروتنوئیدها به کلروفیل در ۲۵۰ بار و ۶۰ درجهٔ سلسیوس با استفاده از اتانول (۷/۷) به‌عنوان حلال مشترک به دست آمد.

بنابراین استخراج کلروفیل و کاروتنوئیدها به‌روش سیال فوق بحرانی از ریزجلبک‌ها به تراکم مایع بستگی دارد که تابعی از فشار و دماست. در دمای ثابت، افزایش فشار باعث افزایش تراکم مایع

1. D. Viridis
2. Hanay
3. Hogart
4. Supercritical Fluid Extraction
5. D. salina
6. Nannochloropsis Oculata
7. Nannochloropsis Gaditana
8. S. Almeriensis
9. Scenedesmus Obliquus

می‌شود. حتی اگر این قدرت حلالیت سیال فوق بحرانی را افزایش و ضریب انتشار آن را کاهش دهد. افزایش دما در فشار ثابت نیز تأثیر مضاعفی دارد. افزایش دما باعث افزایش فشار بخار رنگدانه‌ها می‌شود و از این رو حلالیت بهتری ایجاد می‌کند. بنابراین، عمل‌کرد استخراج کلروفیل و کاروتنوئیدها به شرایط عملیاتی بستگی دارد[۵۴،۵۵].

۲-۵ استخراج آنزیمی

در استخراج آنزیمی، از آنزیم‌هایی استفاده می‌شود که قادر به شکستن غشا و یا دیوارهٔ سلولی ریزجلبک‌ها باشند و اجزای داخل سلول آن‌ها را در معرض حلال قرار دهند. برتری اصلی استفاده از استخراج آنزیمی، ویژگی آنزیم‌ها برای شکستن دیوارهٔ سلولی است[۵۶،۵۷]. چنان‌که در مورد سلولاز، سلولز و همی‌سلولز یکی از اجزای اصلی در بیشتر دیواره‌های سلولی است. از برتری‌های روش آنزیمی می‌توان به استفاده از شرایط واکنش از نظر pH و دما، عدم خوردگی و میزان استخراج بالاتر و عدم نیاز به مراحل خشک‌کردن را نام برد[۵۸]. از طرف دیگر، برخی محدودیت‌ها مانند هزینهٔ بالای آنزیم‌ها[۵۹]، ضرورت اطمینان از شرایط پایدار در طول این فرایند و حساسیت به تغییرات دما و pH وجود دارد[۶۰]. بیشترین استخراج به روش آنزیمی در ریزجلبک‌ها مربوط به استخراج کاروتنوئیدها است که معمولاً به‌عنوان یک مرحلهٔ اولیه استفاده می‌شود و پس از آن به استخراج حلال نیاز دارد[۵۶،۵۷،۶۱]. به‌طور خاص، برای استخراج رنگدانه‌ها، توانندی و همکاران[۶۲] روش استخراج آنزیمی را پیشنهاد کردند. در این حالت، استخراج با لیزوزیم به مدت ۲۰ ساعت، دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و تحت pH برابر با ۳ انجام می‌شود. البته، افزایش کارایی استخراج در صورتی امکان‌پذیر است که قبل از استخراج آنزیمی، زیست‌توده تحت درمان قرار گیرد[۶۲].

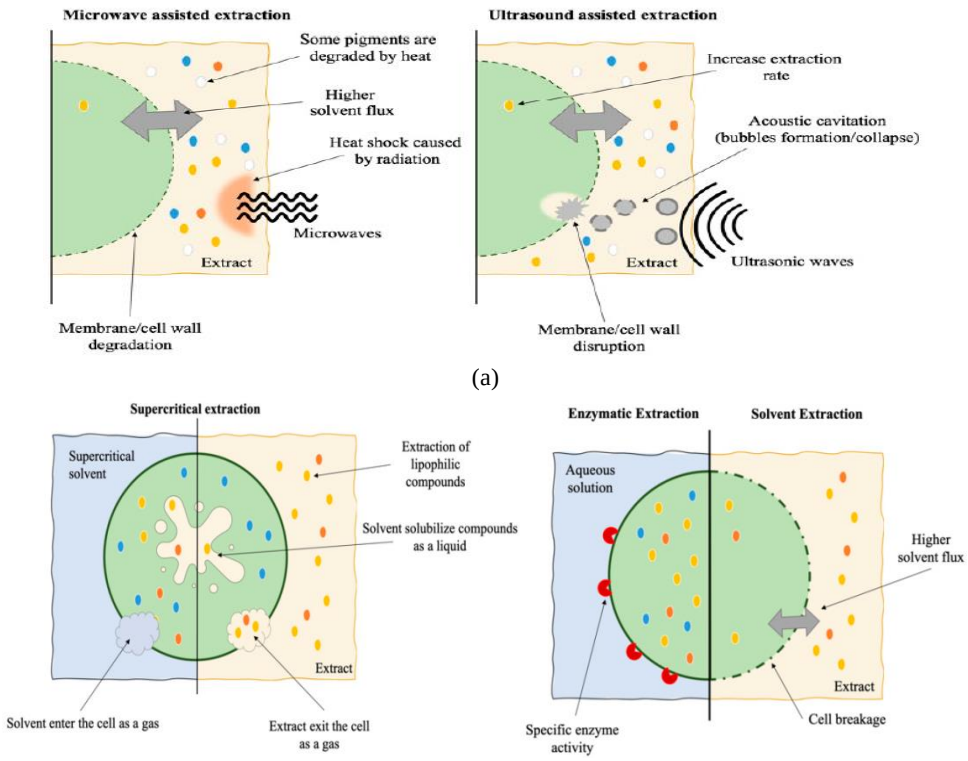
۲-۶ استخراج با امواج مایکروویو (MAE[1]) و امواج فراصوت (UAE[2])

در مورد استخراج رنگدانه‌ها، هر دو روش استخراج با کمک امواج مایکروویو (MAE) و استخراج با کمک امواج فراصوت (UAE)، پیشنهاد شده است؛ اگرچه فقط چندمطالعه در مورد بهینه‌سازی آن‌ها انجام شده است. به‌دلیل شوک حرارتی ایجادشده هنگام تابش به محلول، باعث تخریب دیوارهٔ سلول می‌شود. محدودیت اصلی استفاده از MAE به‌عنوان یک فرایند حرارتی، قابلیت حرارتی محدود رنگدانه‌هاست. برتری‌های اصلی MAE کاهش زمان استخراج و مصرف کم حلال است که آن را به یک روش استخراج سبز تبدیل کرده است[۵۹]. هنگام انجام MAE در شرایط خلأ می‌توان از دماهای پایین استفاده کرد؛ اگرچه این گزینه به‌طور چشم‌گیری هزینهٔ فرایند استخراج را افزایش می‌دهد[۶۳]. در مورد امواج فراصوت، فرایند در استفاده از حفرهٔ صوتی برای تولید حباب‌های حفره استوار است، که به‌طور محلی فشار را هنگام فروپاشی افزایش می‌دهد. درنتیجه با اختلال، در دیوارهٔ سلول حلال نفوذ و میزان استخراج بالاتری حاصل می‌شود[۵۰]. بنابراین امواج فراصوت عملکرد استخراج را افزایش، زمان و انرژی فرایند را کاهش می‌دهد؛ هم‌چنین قابلیت تولید مجدد محصول، مصرف حلال کمتر و دامنهٔ دمای پایین (۷۰ درجهٔ سلسیوس) را تضمین می‌کند[۵۰،۶۴]. جوین و همکاران[۶۳]، از MAE برای به‌دست‌آوردن فیکوبیلی پروتئین از *پورفیریدیوم پرپریم*[3] استفاده کردند. از طرف دیگر، فایکوسیانین و آلوفیکوسیانین در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس با روش استخراج امواج فراصوت به‌طور مؤثرتری استخراج شد[۵۴]. دما با نوسان توان مصرفی کنترل می‌شود[۵۰]. هم‌چنین در مطالعهٔ دیگری، پسکوئیت و همکاران[۶۵] مایکروویو را برای استخراج کاروتنوئیدها و کلروفیل‌ها از *سیلندر ودکا کلستروم*[4]، با یک شرایط مطلوب در ۵ دقیقه و ۵۰ وات، در ۵۶ درجهٔ سلسیوس، با نرخ استخراج بالاتر در مقایسه با استخراج به کمک حلال و امواج فراصوت پیشنهاد می‌کنند. دی و راتود[۶۴] با استفاده از روش استخراج امواج فراصوت استخراج بتاکاراتن از *اسپیرولینا پلاتنسیس*[5] را بهینه کردند. با استفاده از هپتان در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و شدت صوتی الکتریکی $167\ W.cm^{-2}$، بیش از ۸ دقیقه، شرایط مطلوب پیدا شد[۶۴]. زو و همکاران[۶۶] استخراج آستاگزانتین بهینه از *هماتوکوکوس پلوویالیس*[6] را با استفاده از روش استخراج امواج فراصوت، و استفاده از یک روش سطح پاسخ انجام دادند. نتیجهٔ مطلوب در قدرت اولتراسوند ۲۰۰ وات، فرکانس ۴۰ کیلوهرتز، دمای ۴۱/۱ درجهٔ سلسیوس، در طول ۱۶ دقیقه حاصل شد.

1. Microwave Assisted Extraction
2. Ultrasound Assisted Extraction
3. Porphyridium Purpureum
4. Cylindrotheca Closterium
5. S. Platensis
6. H. Pluvialis

اصولاً رنگدانه‌ها در برابر عواملی مانند دما، نور و pH بسیار حساس هستند و خشک‌کردن نامناسب می‌تواند منجربه از دست‌رفتن بیش از حد رنگدانه‌ها شود[۶۷]. خشک‌کردن به‌دلیل افزایش ماندگاری، حمل و نقل آسان و افزایش بهره‌وری استخراج کلروفیل و کاروتئونید و دیگر ترکیبات زیست‌فعال یک مرحلهٔ حیاتی در برداشت تودهٔ زندهٔ جلبکی شناخته می‌شود. در مطالعهٔ مارتلی و همکاران[۶۸] خشک‌کردن جلبک *ایزوکریسس گالبانا*[1] با روش‌های آون، نور خورشید، انجمادی و پاششی بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که روش‌های خشک‌کردن هیچ‌گونه تأثیری روی سطوح کلروفیل a نداشتند[۶۸]. در پژوهشی دیگر با خشک‌کردن جلبک *ساک کارینا لاتیسیما*[2] با هوای گرم در دماهای مختلف و انجماد هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر میزان رنگدانهٔ کلروفیل مشاهده نکردند[۵۵]. در مطالعهٔ رضی و همکاران[۵۲] بالاترین میزان کلروفیل b و کاروتنوئید در روش خشک‌کن انجمادی و کمترین مقدار این دو شاخص در نمونه‌های خشک‌شده با آون ثبت شد. هم‌چنین بالاترین میزان فایکوبیلی پروتئین و بتاکاروتن را با روش خشک‌کن انجمادی در جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*[3][۵۵] و بالاترین میزان رنگدانهٔ فیکوسیانین را در نمونه‌های خشک‌شدهٔ جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* با روش انجمادی گزارش دادند[۶۹]. در پژوهشی دیگر درصد کلروفیل اندازه‌گیری‌شده در نمونه‌های خشک‌شدهٔ جلبک کلرلا در روش خشک‌کن انجمادی بالاتر از روش خشک‌کن پاششی گزارش شد[۵۲]. در تحقیق اشاره‌شده با افزایش دما از ۴۰ به ۸۰ درجهٔ سلسیوس در روش آون میزان کاروتنوئیدها در نمونه‌های خشک‌شدهٔ جلبک به‌شکل معنی‌داری کاهش یافتند[۷۰]. در مطالعهٔ لینگ و همکاران[۷۱] با افزایش درجهٔ حرارت تا بیش از ۶۰ درجهٔ سلسیوس باعث کاهش مقدار رنگدانه‌های محلول در آب می‌شود[۷۱]. طرحوارهٔ انواع سامانه‌های استخراجی در شکل (۱) نشان داده شده است.

برتری‌ها و کاستی‌های روش‌های استخراج در جدول (۱) آورده شده است.



شکل ۱. (a) استخراج به‌روش فراصوت و مایکروویو. (b) استخراج به‌روش آنزیمی و حلال. (c) استخراج به‌روش سیال فوق بحرانی[۷۲].

Figure1. (a) Extraction by ultrasound and microwave. (b) extraction by enzyme and Solvent methods. (c) Extraction by supercritical fluid method[72].

1. I. Galbana
2. Saccharina Latissima
3. Spirulina Platensis

جدول ۱. برتری‌ها و کاستی‌های روش‌های مختلف برای استخراج رنگدانه از ریزجلبک‌ها[۷۵-۷۳، ۵۳-۵۰، ۲۲].

Table 1. Advantages and disadvantages of different methods for pigment extraction from microalgae [23,50-53,73-75].

Methodology	Advantages	Limitations
Solvent extraction	Reduced cost in terms of infrastructure and operating	Less efficiency High amount of organic solvents Time-consuming
Enzymatic	Specificity High cell disruption	High cost of enzymes Requires very controlled process Need of separation of the enzymes
Pressure	High cell disruption Reduced need of solvent	High energy requirement High cost of infrastructure
Supercritical extraction	Eco-friendly Optimal temperature below degradation point for pigments	High cost of infrastructure Hard operating process
High voltage electrical discharge	Reduced time of extraction High cell disruption	High energy requirement
Electric fields	Lower energy input Reduced time of extraction Reduced need of solvent	High cost of infrastructure
Ultrasoundassisted	Reduced time of extraction Reduced need of solvent	High cost of infrastructure High cost of infrastructure

خلاصه‌ای از تکنیک‌های مختلف برای استخراج رنگدانه‌ها از ریزجلبک‌ها در جدول (۲) آورده شده است.

۳. نتیجه‌گیری

رنگدانه‌های موجود در ریزجلبک‌ها به‌دلیل زیست‌فعال‌بودن و ویژگی‌های طبیعی، برای کاربردهای صنعتی کاربرد بسیاری دارند. استخراج این ترکیبات براساس روش‌های تخریب سلول و حلالیت شیمیایی ترکیبات است. طبق یافته‌های این تحقیق، استانداردسازی پروتکل استخراج زیست‌توده برای جذب رنگدانه‌های مورد علاقه همچنان یک چالش است؛ درنتیجه، انتظار می‌رود تا با ظهور روش‌ها و فرایندهای جدید، مدل‌های سیستمی نوینی برای تهیه و تولید و استخراج رنگدانه‌های طبیعی در مقیاس صنعتی به کار گرفته شود. از طرف دیگر روش‌های قدیمی استخراج جامد- مایع نیاز به مقادیر بالای حلال دارند و زمان‌بر هستند. حجم بالای حلال مصرفی نه‌تنها هزینه‌های عملیاتی را بالا می‌برد؛ بلکه مشکلات زیست‌محیطی نیز درپی دارد. روش‌های استخراجی جدید به‌عنوان جای‌گزین این روش برتری‌هایی از قبیل کاهش زمان استخراج، کاهش مصرف حلال، بازده استخراج و هم‌چنین تکرارپذیری دارند. تجزیه‌وتحلیل اولیه به ما نشان می‌دهد که استخراج مایع فوق بحرانی از روش‌های دیگر استخراخ برتر است. یکی از مهم‌ترین برتری‌های آن خلوص بالای عصاره است. علاوه بر نیاز به مراحل پردازش کمتر، SFE به‌میزان قابل توجهی ایمن‌تر از روش‌های استخراجی دیگر است و می‌تواند در دمای متوسط کار کند تا تخریب عصاره را به حداقل برساند. با این حال برای بهبود درک سازوکار استخراج، حذف موانع فنی و بهبود طراحی سیستم‌های استخراج در مقیاس بالا برای استفاده‌های صنعتی، تحقیقات بیشتری لازم است.

جدول ۲. مشخصه‌های مورد بررسی در استخراج رنگدانه‌ها از ریزجلبک‌ها، با استفاده از روش‌های مختلف استخراج.

Table 2. The parameters investigated in pigments extraction from microalgae using different extraction methods.

Extraction Method	Product	Species	Processing Parameters	Extraction Yield (mg/g)	Ref.
Supercritical CO_2 extraction	Carotenoids and chlorophyll	Nannochloropsis gaditana	S: SC-CO_2 p: 400 bar T: 60 ˚C; t: 3 h	Carotenoids: 0.34 Chlorophylls: 2.23	[52]
Ultrasoundassisted extraction	Carotenoids	H. pluvialis	S: ethanol: ethyl acetate (1:1, v:v); P: 200W; F: 40 kHz; T: 41.1 ˚C t: 16 min	27.58 ± 0.40	[22]
High-pressure homogenization	Carotenoids	Nannochloropsis sp	S: water/recovered with hexane: isopropanol (3:2, v:v) p:1000 bar; T: n.s.; c: 4 cycles	Violoxanthin: 2.50±0.24 Antheraxanthin:1.74±0.34 Zeaxanthin: 1.93±0.24 Carotene: 10.07±1.70	[66]
Pressurized liquid extraction	Carotenoids and chlorophyll	Chlorella vulgaris	S: ethanol: water (9:1, v:v); p: 100 bar; Lutein: T: 148 ˚C; t: 35 min; Carotene: T: 117 ˚ C; t: 25 min; Chlorophyll a: T: 173 ˚C; t: 15 min; Chlorophyll b: T: 170 ˚C; t: 3 min	Lutein: 3.70 carotene: 0.67 Chlorophyll a: 10.83 Chlorophyll b: 6.81	[66]
Pressurized liquid extraction	Carotenoids	Phormidium spp	S: ethanol; p: 100 bar; T: 150 ˚C; t: 20 min	n.s	[73]
Continuous pressurized solvent extraction	Carotenoids	Gloeothece sp	S: ethanol; p: 180 bar; T: 60 ˚C; c:3 cycles	Lutein: 2.9±0.1 Carotene: 1.5±0.1	[74]
Pulsed electric fields	Carotenoids	C. vulgaris	S: citrate-phosphate McIlvaine buffer/recovered with ethanol; E: 20 $kV.cm^{-1}$; T: n.s.; t: 25 pulses of 3µs	1.00	[75]
High voltage electrical discharge	Chlorophyll, Carotenoids	N. oculata	S: water; E: 40 $kV.cm^{-1}$; T: 20 to 30 ˚C; t: 400 pulses of 4µs	n. s	[56]
Supercritical CO_2 extraction	Carotenoids	Scenedesmus obliquus	S: SC-CO_2; p: 250 bar; T: 60 ˚C; t: 4 h	0.18	[53]
Supercritical CO_2 extraction	Carotenoids	Synechococcus sp	S: SC-CO_2; p: 300 bar; T: 50 ˚C; t: 3 h	1.51	[22]
Supercritical CO_2 extraction	Carotenoids	D. salina	S: SC-CO_2; p: 400 bar; T: 30 ˚C; t: 90min	115.43	[50]
Supercritical CO_2 extraction	Carotenoids	Nannochloropsis oculata	S: SC-CO_2 + Ethanol; p: 350 bar; T: 50 ˚C; t: 30 min	7.62	[51]

n.s.—not specified. SC-CO_2—supercritical CO_2 extraction. **S**—solvent; **T**—temperature; **t**—time; **c**—cycles of extraction; **p**—pressure; **P**—power; **Pd**—power density; **E**—electric field; **F**—frequency.

مراجع

[1] Zamani, M., Shokrkar, H., Ebrahimi, S., "Investigation of protein extraction from microalgae using different pretreatment methods", Iranian Chemical Engineering Journal, Vol. 19, No. 113, pp.18-27, In Persian, (2021).

[2] Shokrkar, H., Ebrahimi, S., Zamani, M., "Experimental study and neural network modeling of enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production", Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering, Vol. 36, No. 2, pp.181-191, In Persian, (2017).

[3] Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Moraes, L., Zaparoli, M., orais, M. G., "Progress in the physicochemical treatment of microalgae biomass for value-added product recovery", Bioresource technology. Vol. 301, pp. 122-127, (2020).

[4] Mehta, P., Singh, D., Saxena, R., Rani, R., Gupta, R. P., Puri, S. K., Mathur, A. S., "High-Value

Coproducts from Algae-An Innovational Way to Deal with Advance Algal Industry", Waste to wealth. Springer, Singapore. pp. 343-363, (2018).

[5] Vassilev, S. V., and Vassileva, C. G., "Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview", Fuel. Vol. 181, pp. 1-33, (2016).

[6] Panis, G., and Carreon, J. R., "Commercial astaxanthin production derived by green alga Haematococcus pluvialis: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line", Algal Research. Vol. 18, pp. 175-190, (2016).

[7] Lautenbacher, S., Roscher, S., Strian, F., "Inhibitory effects do not depend on the subjective experience of pain during heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS): a contribution to the psychophysics of pain inhibition", European Journal of Pain. Vol. 6, No. 5, pp. 365-374, (2002).

[8] Jackson, B. A., Bahri, P. A., Moheimani, N. R., "Repetitive non-destructive milking of hydrocarbons from Botryococcus braunii", Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 79, pp. 1229-1240, (2017).

[9] Martínez, J. M., Gojkovic, Z., Ferro, L., Maza, M., Álvarez, I., Raso, J., Funk, C., "Use of pulsed electric field permeabilization to extract astaxanthin from the Nordic microalga Haematococcus pluvialis", Bioresource Technology. Vol. 289, p. 121694, (2019).

[10] Khoo, K. S., Chew, K. W., Ooi, C. W., Ong, H. C., Ling, T. C., Show, P. L., "Extraction of natural astaxanthin from Haematococcus pluvialis using liquid biphasic flotation system", Bioresource Technology. Vol. 290, p. 121794, (2019).

[11] Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A., Guedes, A., "Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria-A Review on Current Methodologies", Applied Sciences. Vol. 11, No. 11, pp. 5187, (2021).

[12] Li, S., Ji, L., Shi, Q., Wu, H., Fan, J., "Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae Porphyridium spp", Bioresource technology. Vol. 292, p. 122048, (2019).

[13] Fernández-Sevilla, J. M., Fernández, F. A., Grima, E. M., "Biotechnological production of lutein and its applications", Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 86, No. 1, pp. 27-40, (2010).

[14] Mannozzi, C., Fauster, T., Haas, K., Tylewicz, U., Romani, S., Dalla Rosa, M., Jaeger, H., "Role of thermal and electric field effects during the pre-treatment of fruit and vegetable mash by pulsed electric fields (PEF) and ohmic heating (OH)", Innovative Food Science & Emerging Technologies. Vol. 48, pp. 245-253, (2018).

[15] Guedes, A. C., Amaro, H. M., Malcata, F. X., "Microalgae as sources of carotenoids", Marine drugs. Vol. 9, No. 4, pp. 625-644, (2011).

[16] Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 14, No. 1, pp. 217-232, (2010).

[17] Zarnowski, R., Suzuki, Y., "Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains", Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 17, No. 5, pp. 649-663, (2004).

[18] Dominguez, H., "Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals", Elsevier Science. Vol. 3, No. 1, pp. 123-132, (2013).

[19] Jaswir, I., "Isolation of fucoxanthin and fatty acids analysis of Padina australis and cytotoxic effect of fucoxanthin on human lung cancer (H1299) cell lines", African journal of biotechnology. Vol. 10, No. 81, pp. 18855-18862, (2011).

[20] Mise, T., Ueda, M., Yasumoto, T., "Production of fucoxanthin-rich powder from Cladosiphon okamuranus", Aadvances Journal Food Sciences. Technol. Vol. 3, No. 1, pp. 73-76, (2011).

[21] Sabeti, S. G., Salehi, A. E., Bolourian, Sh., "Optimization of carotenoid pigments extraction from persimmon fruit (Diospyros kakiI)", Iranian journal of Food Science and Technology Vol. 14, No. 68, pp. 234-242, (2017).

[22] Macıas-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodrıguez, M., de La Ossa, E. M., Lubián, L. M., Montero, O., "Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from Synechococcus sp", The Journal of Supercritical Fluids. Vol. 39, pp. 323-329, (2007).

[23] Warkoyo, W., Saati, E., "The solvent effectiveness on extraction process of seaweed pigment", Makara Journal of Technology. Vol. 15, No. 1, pp. 5-8, (2011).

[24] Raguraman, V., MubarakAli, D., Narendrakumar, G., Thirugnanasambandam, R., Kirubagaran, R., and Thajuddin, N., "Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from Padina tetrastromatica: Purification, characterization and biomedical application", Process Biochemistry. Vol. 73, pp. 211-219, (2018).

[25] Simon, D., and Helliwell, S., "Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae", Water research. Vol. 32, pp. 2220-2223, (1998).

[26] Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., "Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods", Unesco Pub, Paris, Farnce. Vol. 10, No. 2, pp. 578-579, (2005).

[27] Aghajanpoor SorKohi, N., Babakhani Lashkan, A., Tabarsa, M., "Optimization of brown alga pigment extraction conditions Sargassum angustifolium

Persian Gulf using the response level method (RSM)", Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources. Vol. 71, No. 4, pp. 390-401, In Persian, (2019).

[28] Borowitzka, M. A, "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters", Journal of biotechnology. Vol. 70, No. 1-3, pp. 313-321, (1999).

[29] Sartory, D. P., Grobbelaar, J. U., "Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis", Hydrobiologia. Vol. 114, No. 3, pp. 177-187, (1984).

[30] Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. (Eds.), "Phytoplankton Pigments in Oceanography", Guidelines to Modern Methods, UNESCO, Paris, Farnce. Vol. 10, No. 2, pp.523-525, (1997).

[31] Macías-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodriguez, M. D. L., De La Ossa, E. M., Lubián, L. M., Montero, O., "Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from Dunaliella salina", Talanta. Vol. 77, No. 3, pp. 948-952, (2009).

[32] Mantoura, R. F. C., Llewellyn, C. A., "The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography", Analytica Chimica Acta. Vol. 151, pp. 297-314, (1983).

[33] Sartory, D. P., "The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry", Water Research. Vol. 19, No. 5, pp. 605-610, (1985).

[34] Abaychi, J. K., and Riley, J. P., "The determination of phytoplankton pigments by high-performance liquid chromatography", Analytica Chimica Acta. Vol.107, pp. 1-11, (1979).

[35] Jeffrey, S. W., "Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics . Vol. 162, No. 2, pp. 271-285, (1968).

[36] Madgwick, J. C., "Chromatographic determination of chlorophylls in algal cultures and phytoplankton", Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts. Elsevier. Vol. 13, p. 459, (1966).

[37] Riley, J. P., Wilson, T. R. S., "The use of thin-layer chromatography for the separation and identification of phytoplankton pigments", Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Vol. 45, No. 3, pp. 583-591, (1965).

[38] Co, D. Y. L., Schanderl, S. H., "Separation of chlorophylls and related plant pigments by two-dimensional thin-layer chromatography", Journal of Chromatography A. Vol. 26, No. 2, pp. 442-448, (1967).

[39] Wright, S. W., Shearer, J. D., "Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton", Journal of Chromatography A. Vol. 294, pp. 281-295, (1984).

[40] Shoaf, W. T., "Rapid method for the separation of chlorophylls a and b by high-pressure liquid chromatography", Journal of Chromatography A. Vol. 152, No. 1, pp. 247-249, (1978).

[41] Eghbali Babadi, F., "Identification of carotenoids and chlorophylls from green algae Chlorococcum humicola and extraction by liquefied dimethyl ether", Food and bioproducts processing. Vol. 123, pp. 296-303, (2020).

[42] Garbayo, I., Cuaresma, M., Vílchez, C., Vega, J. M., "Effect of abiotic stress on the production of lutein and β-carotene by Chlamydomonas acidophila", Process Biochemistry. Vol. 43, pp. 1158-1161, (2008).

[43] Lai, Y. S., Zhou, Y., Eustance, E., Straka, L., Wang, Z., Rittmann, B. E., "Cell disruption by cationic surfactants affects bioproduct recovery from Synechocystis sp. PCC 6803", Algal Research. Vol. 34, pp. 250-255, (2018).

[44] Rastegari, A., Darki, B., "Biophysical effect of anionic surfactant on growth dynamics and computational prediction of extracellular signal-regulated kinases in Dunaliella viridis Microalgae", Iranian Journal of Plant Biology. Vol. 20, No. 4, pp. 1-20, In Persian, (2018).

[45] Jiménez, C., Cossío, B. R., Rivard, C. J., Berl, T., Capasso, J. M., "Cell division in the unicellular microalga Dunaliella viridis depends on phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs)", Journal of experimental botany. Vol. 58, pp. 1001-1011, (2007).

[46] Posudin, Y. I., Massjuk, N. P., Lilitskaya, G. G., "Photomovement of Dunaliella Teod", Ukraine, Naukova Dumka. Vol. 20, pp. 891-892, (2010).

[47] Abrahamsson, V., Cunico, L. P., Andersson, N., Nilsson, B., Turner, C., "Multicomponent inverse modeling of supercritical fluid extraction of carotenoids, chlorophyll A, ergosterol and lipids from microalgae", The Journal of Supercritical Fluids. Vol. 139, pp. 53-61, (2018).

[48] Macías-Sánchez, M. D., Mantell Serrano, C., Rodríguez Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L. M., and Montero, O., "Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent", Journal of separation science. Vol. 31, pp. 1352-1362, (2008).

[49] Gallego, R., Bueno, M., Herrero, M., "Sub- and supercritical fluid extraction of bioactive compounds

from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – An update", TrAC Trends in Analytical Chemistry. Vol. 116, pp. 198-213, (2019).

[50] Juin, C., Chérouvrier, J. R., Thiéry, V., Gagez, A. L., Bérard, J. B., Joguet, N., Kaas, R., Cadoret, J. P., Picot, L., "Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from Porphyridium purpureum". Applied biochemistry and biotechnology. Vol. 175, No. 1, pp. 1-15, (2015).

[51] Liau, B. C., Shen, C. T., Liang, F. P., Hong, S. E., Hsu, S. L., Jong, T. T., Chang, C. M. J., "Supercritical fluid extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity", Journal of Supercritical Fluids. Vol. 55, pp. 169-175, (2010).

[52] Razi, N., Shamsaie, M., Hosseini Shekarabi, S. P., "A comparative study of different drying methods on some proximate composition and pigments of marine microalgae Isochrysis galbana Aquaculture Sciences", Journal of Aquaculture Sciences .Vol. 7, No. 12, pp. 12-20, In Persian, (2020).

[53] Guedes, A. C., Gião, M. S., Matias, A. A., Nunes, A. V., Pintado, M. E., Duarte, C. M., Malcata, F. X., "Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of Scenedesmus obliquus for use in food processing", Journal of Food Engineering. Vol. 116, pp. 478-482, (2013).

[54] Natarajan, R., Ang, W. M., Chen, X., Voigtmann, M., Lau, R., "Lipid releasing characteristics of microalgae species through continuous ultrasonication", Bioresour Technol. Vol. 158, pp. 7-11, (2014).

[55] Stévant, P., "Effects of drying on the nutrient content and physico-chemical and sensory characteristics of the edible kelp Saccharina latissima", Journal of Applied Phycology. Vol. 30, No. 40, pp. 2587-2599, (2018).

[56] Amaro, H. M., Guedes, A. C., Preto, M. A., Sousa-Pinto, I., Malcata, F. X., "Gloeothece sp. as a Nutraceutical Source — An Improved Method of Extraction of Carotenoids and Fatty Acids", Marine drugs. Vol. 16, No. 9, p. 327, (2018).

[57] Kumar, S. J., Kumar, G. V., Dash, A., Scholz, P., Banerjee, R., "Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review", Algal Research. Vol. 21, pp. 138-147, (2017).

[58] Sierra, L. S., Dixon, C. K., Wilken, L. R., "Enzymatic cell disruption of the microalgae Chlamydomonas reinhardtii for lipid and protein extraction", Algal Research. Vol. 25, pp. 149-159, (2017).

[59] Gong, M., Bassi, A., "Carotenoids from microalgae: A review of recent developments", Biotechnology advances. Vol. 34, No. 8, pp. 1396-1412, (2016).

[60] Vernès, L., Li, Y., Chemat, F., Abert-Vian, M., "Biorefinery Concept as a Key for Sustainable Future to Green Chemistry —The Case of Microalgae. In Plant Based "Green Chemistry 2.0", Springer Singapore. pp. 15-50, (2019).

[61] Zuorro, A., Maffei, G., Lavecchia, R., "Optimization of enzyme-assisted lipid extraction from Nannochloropsis microalgae", Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. Vol. 67, pp. 106-114, (2016).

[62] Tavanandi, H. A., Vanjari, P., Raghavarao, K. S. M. S., "Synergistic method for extraction of high purity Allophycocyanin from dry biomass of Arthrospira platensis and utilization of spent biomass for recovery of carotenoids", Separation and Purification Technology. Vol. 225, pp. 97-111, (2019).

[63] Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., Oh, Y. K., "Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review", Bioresource Technology. Vol.244, pp. 1317-1328, (2017).

[64] Dey, S., Rathod, V. K., "Ultrasound assisted extraction of β-carotene from Spirulina platensis", Ultrasonics Sonochemistry. Vol. 20, No. 1, pp. 271-276, (2013).

[65] Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Picot, L., "Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction", Process Biochemistry. Vol. 46, pp. 59-67, (2011)

[66] Zou, T. B., Jia, Q., Li, H. W., Wang, C. X., Wu, H. F., "Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis", Marine drugs. Vol. 11, No. 5, pp. 1644-1655, (2013).

[67] Oliveira, E. G. D., Rosa, G. S. D., Moraes, M. A. D., Pinto, L. A. D. A., "Phycocyanin content of Spirulina Platensis dried in spouted bed and thin layer", Journal of Food Process Engineering. Vol. 31, pp. 34-50, (2008).

[68] Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., Ferrari, D., "Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from Spirulina platensis for food industry applications", Process Biochemistry. Vol. 49, pp. 154–159, (2014).

[69] Pour Hosseini, S. R., Tavakoli, O., Sarrafzadeh, M. H., "Experimental Optimization of SC-CO_2 Extraction of Carotenoids from Dunaliella salina", The Journal of Supercritical Fluids. Vol. 121, pp. 89-95, (2016).

[70] Lin, L. P., "Microstructure of spray-dried and freeze-dried microalgal powders", Food Structure. Vol. 4, No. 2, pp. 341-348, (1985).

[71] Ling, A. L. M., Yasir, S., Matanjun, P., Bakar, M. F. A., "Effect of different drying techniques on the

phytochemical content and antioxidant activity of Kappaphycus alvarezii", Journal of Applied Phycology. Vol. 27, No. 4, pp. 1717-1723, (2015).

[72] Krishnan, R. Y., Rajan, K. S., "Microwave assisted extraction of flavonoids from Terminalia bellerica: Study of kinetics and thermodynamics", Separation and Purification Technology. Vol. 157, pp. 169-178, (2016).

[73] Bernaerts, T. M., Verstreken, H., Dejonghe, C., Gheysen, L., Foubert, I., Grauwet, T., Van Loey, A. M., "Cell disruption of Nannochloropsis sp. improves in vitro bioaccessibility of carotenoids and ω3-LC-PUFA", Journal of Functional Foods. Vol. 65, pp. 103770, (2020).

[74] Cha, K. H., Lee, H. J., Koo, S. Y., Song, D. G., Lee, D. U., Pan, C. H., "Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from Chlorella vulgaris", Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 58, No. 2, pp. 793-797, (2010).

[75] Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Cifuentes, A., García-Blairsy, R. G., Señoráns, F. J., Ibáñez, E., "Pressurized Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Phormidium Species", Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 56, No. 10, pp. 3517-3523, (2008).