معرفی روش های مختلف استحصال فایتوبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزی پروری

رودابه روفچایی[۱*]، زهرا صادقی [۲]، افشین امیری سندسی[۱]، مریم حسنی مقدم[۱]

[۱]پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی ، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

[۲] پژوهشکده گیاهان و مواد داروئی، دانشگاه شهید بهشتی، گروه فیتوشیمی، تهران، ایران

چکیده

فایتوبیوتیک‌ها، مشتقات گیاهی هستندکه از برگ، ریشه، غده یا میوه گیاهان بدست می‌آیند و بصورت جامد، خشک و یا به عنوان اسانس (روغن های اسانسی) جهت بهبود تغذیه مورد استفاده در پرورش دام و طیور قرار می‌گیرند. این مشتقات گیاهی در آبزی پروری کاربرد گسترده ای دارند، مانند؛ تحریک مصرف خوراک، افزایش رشد، افزایش ترشحات داخلی لوله گوارش، افزایش ایمنی، فعالیت ضد کوکسیدیوزی و انگلی. مواد موثره موجود ازگروه‌های مواد فعال زیستی شیمیائی همچون؛ آلکالوئیدها، فنل ها، فلاونوئیدها، ترپن‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند. جهت استحصال این مواد موثره روش‌های مختلفی مورد بهره برداری قرار می‌گیرد. انتخاب این روش ها حسب گونه گیاهی، نوع حلال، استفاده یا عدم استفاده از حرارت، تکنیک‌های مختلفی را طلب می کند که در این مقاله ضمن مروری بر کاربرد فایتوبیوتیک‌ها در آبزی پروری به معرفی تکنیک‌های کلاسیک و مدرن در این راستا پرداخته می‌شود. بررسی‌ها حاکی از آنست که روش‌های مدرن بدلیل کاهش مصرف مواد شیمیایی آلی و سنتزی و توجه به ایمنی محیط زیست، صرفه جوئی در زمان، کارایی و کیفیت بهتر ماده موثره استخراجی، مورد توجه محققین قرار دارد. با توجه به الزام بهره‌گیری از این مواد موثره ارزشمند زیستی جهت رسیدن به آبزی پروری پایدار، آشنایی با این تکنیک‌ها راه گشاست.

کلمات کلیدی: آبزی پروری، فایتوبیوتیک، عصاره، متابولیت ثانویه، ترکیبات فعال زیستی، ماده موثره

* نویسنده مسئول: Roofchaie@gmail.com

مقدمه

دو هدف عمده در بخش آبزی‌پروری استفاده از مکان‌های دارای پتانسیل پرورش آبزیان و نیز افزایش تولید در واحد سطح (افزایش کارایی) می باشد. کاهش هزینه‌های پرورش از طریق بهبود جیره‌های غذایی، افزایش مقاومت آبزیان پرورشی در برابر شرایط استرس‌زای پرورش و بیماری‌ها، از موارد مهم در بالا بردن کارایی تولید آبزیان می باشد. یکی از مشکلاتی که صنعت آبزی‌پروری همواره در کنار رشد قابل توجه خود با آن روبرو بوده، شیوع بیماری‌ها است که گسترش اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرار داده است (FAO[1], 2015).

آبزی پروری پایدار به تعادل بین سلامتی و وضعیت رشد ماهی بستگی دارد. استفاده از شیمی درمانی و آنتی بیوتیک ها برای مبارزه با بیماری های ماهی، خطر ابتلا به پاتوژن های مقاوم و آلودگی محیط زیست را ایجاد می کند. واکسن‌های تجاری برای ماهیان، تخصصی وگران بهاست (Cabello, 2006). از این رو مطالعات بسیاری در زمینه کاربردمواد طبیعی محرک رشد (NGPs)[2] جهت ارتقاءایمنی و رشد در آبزی پروری انجام گرفته است (Francis *et al*., 2005). از جمله این مواد طبیعی محرک رشد می‌توان به؛ پروبیوتیک‌ها، پر بیوتیک‌ها، سین بیوتیک‌ها و فایتویوتیک ها اشاره کرد. غیر قابل تضمین بودن زنده‌مانی پروبیوتیک اضافه شده در دستگاه گوارش، الزام رقابت پروبیوتیک معرفی شده با میکروبیوتای موجود در روده، توانایی تشکیل کلنی، همچنین پایداری طولانی مدت کلنی‌های تشکیل شده سبب شد که محققین درکنار بررسی پروبیوتیک‌ها ایده‌های جدیدتری در این باب اعم از بکارگیری پربیوتیک‌ها (اجزاء غذایی غیرقابل هضم که سبب افزایش رشد باکتری‌های مفید روده‌ای می‌شوند) و سین‌بیوتیک‌ها (ترکیب پروبیوتیک‌ها و پربیوتیک‌ها) ارائه کنند.گروهی از مطالعات نشان داد که درکاربرد این دسته از محرک‌ها بر روی آبزیان رابطه نزدیکی بین حد اثرگذاری مثبت و اثرات زیان‌بار مشاهده شده است و در این خصوص نمی توان اظهار نظری قطعی داشت (Ringø *et al*., 2010) تحقیقات دراین زمینه همچنان ادامه دارد.

فایتویوتیک ها:

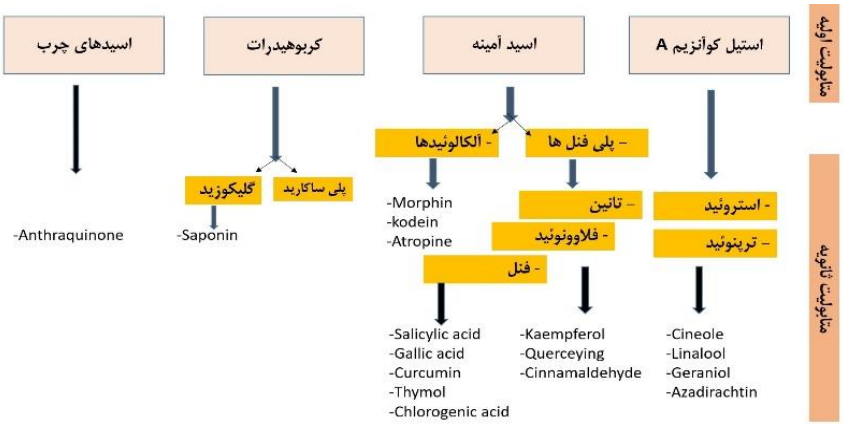
واژه phytobiotic از دو کلمه یونانی phyto و biotic به معنی"گیاهان حیات[3] " گرفته شده است. فایتوبیوتیک ها گروهی از ترکیبات فیتوشیمیائی هستند که به آنها متابولیت ثانویه، مواد فعال زیستی و ماده موثره نیز گفته می شود و از برگ، ریشه، غده یا میوه گیاهان دارویی و یا ادویه‌ای منشاء می‌گیرند. این ترکیبات جزء مواد طبیعی محرک رشد(NGP) هستند. بیشتر آنها اغلب به صورت محلی در دسترس‌اند، ارزان‌اند، علیه طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌ها عمل می‌کنند، زیست تخریب پذیری آسانی داشته و امکان استفاده از میزان این مواد در غلظت بالا وجود دارد(Xie *et al*., 2008; Yin *et al*., 2006).

مطالعات حاکی از تاثیر این محرک‌ها برانگل‌های پوستی آبزیان، سیستم ایمنی آن‌ها وگاها بهبود رشد همراه با افزایش عملکرد سیستم ایمنی است (Reverter *et al*., 2014؛ روفچایی و همکاران، ۱۳۹۶).این محرک‌ها دامنه-گسترده ای از مواد فعال زیستی را دارا بوده و فعالیت گسترده‌ای مانند؛ تحریک مصرف خوراک، افزایش ترشحات داخلی لوله گوارش، افزایش ایمنی، فعالیت ضد میکروبی بر اساس درصد خلوصشان دارند (Sethiya, 2016). توانایی تاثیر فایتوبیوتیک‌ها بر ایمنی، رشد و کنترل عوامل انگلی آبزیان بخاطر وجود ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست. گروه اصلی این مواد عبارتند ازآلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، ترپنوئیدها، استروئیدها، روغن‌های اسانسی، پلی سارکاریدها و ساپونین‌هاکه وجودشان در محصولات گیاهی طبیعی اثبات شده است (Harikrishnan *et al*., 2011).

[1] Food and Agriculture Organization
[2] Natural growth promoters
[3] for life

متابولیت های ثانویه:

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیباتی آلی هستند که مستقیما در رشد، نمو یا تولید مثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات از متابولیت های اولیه (اسیدهای آمینه، چربی، کربوهیدرات) منشاء می‌گیرند و دارای ساختار شیمیایی پیچیده تری نسبت به متابولیت های اولیه بوده و برای حیات گیاه ضروری نیستند. آلکالوئیدها (مورفین، کدئین، آتروپین)، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، رنگدانه ها و تانین ها از جمله مهم ترین این ترکیبات هستند (Siddiqui *et al.*,2016).



شکل ۱ : متابولیت های اولیه و ثانویه (Germano, 2016)

سلولهای گیاهی مقادیر متنوعی از این فراورده ها را تولید می کنند. بسیاری از این ترکیبات سمی هستند و اغلب در وزیکول‌های خاص یا واکوئول ها ذخیره می شوند. این نوع ذخیره سازی از یک طرف نوعی سمیت زدایی برای گیاه است و از طرف دیگر نوعی مخزن ذخیره برای موادی نظیر مولکول‌های غنی از نیتروژن است. اگر چه متابولیت های ثانویه گیاهی بسیار رایج هستند، اما هر گیاهی قادر به تولید همه نوع ترکیب ثانویه ای نیست و برخی ترکیبات نیز تنها منحصر و محدود به گونه خاصی هستند و تجمع این متابولیت‌ها بر حسب نوع گیاه در اندام‌های مختلف گیاهی‌است.

جدول۱: نمونه هایی از تاثیر فایتوبوتیک ها بر کنترل انگل پوستی

نام علمی گیاه	نام فارسی	آبزی مورد استفاده	نوع استخراج گیاهی	نوع استفاده	انگل	رفرنس
Artemisia annua	گندواش	*Heterobranchus longifilis*	اتانلی	حمام	مونوژن	Ekanem and Brisibe, 2010
Artemisia argyi	درمنه	*Carassius auratus*	اتانلی - آبی	حمام	داکتیلوژیروس	Huang *et al.*, 2013
Asparagopsis taxiformis	مارچوبه	*Lates calcarifer*	آبی	حمام	مونوژن	Hutson *et al.*, 2012
Cinnamomum cassia	دارچین	*Carassius auratus*	متانلی - آبی	حمام	داکتیلوژیروس	Ji *et al.*, 2012

اهمیت متابولیت های ثانویه برای گیاهان از ماهیتی اکولوژیک برخوردار است و این ترکیبات نیز دارای کارکردهای متنوعی اند که از آن جمله می توان به عملکرد دفاعی در برابر صیادان، انگل‌ها و عوامل بیماریزا، فیتوالکسین‌ها (سموم گیاهی) در هنگام ابتلاء به قارچ جهت جلوگیری از گسترش میسلیوم قارچ در گیاه، رقابت های بین گونه‌ای، یا تسهیل فرآیندهای تولید و ایجاد ارتباط با گرده افشان‌ها اشاره کرد (Taiz and zeiger, 2013). ترکیبات گیاهی، توانایی مهار تولید آنیون‌های اکسیژن و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد را داشته و از این رو به عنوان مواد موثره محرک ایمنی درآبزیان مورد بررسی هستند (Citarasu, 2010).

فراورده های گیاهی که حاوی مواد موثره هستند:

اسانس : اسانس‌ها ترکیبات معطری هستند که در برخی گیاهان دارویی وجود دارند و به عنوان یکی از مواد موثره گیاه موردنظر، خواص درمانی و کاربردی فراوانی به آن بخشیده‌اند. اسانس ممکن است بطور مستقیم توسط پروتوپلاسم گیاه از طریق تجزیه مواد رزینی سلول ها یا هیدرولیز گلوکوزیدها حاصل می شود. ساختمان شیمیایی اسانس ها شامل استرها، آلدئید ها، الکل ها، فنول‌ها، کتین ها و ترپن‌ها می باشد.

الف) روش تقطیر : که به چند شکل مورد استفاده قرار می گیرد

تقطیر با آب، تقطیر با آب و بخار، تقطیر همزمان با آب و یک حلال آلی. هدف از تقطیر افزایش سطح تماس آب با مواد مؤثره گیاه و در نهایت خروج اسانس است.

ب) روش خراش ، فشار و تیغ زدن: بعضی از اسانس ها زمانی که حرارت می بینند تجزیه می شوند که برای استخراج آن ها باید از روش خراش دادن ، فشار و تیغ زدن استفاده شود . این روش شامل دو نوع روش اسفنجی و روش تیغ زدن و سوراخ کردن اندام مورد نظر می باشد. بطور کلی این روش برای گونه های گیاهی انتخاب می شود که اندام های گوشتی دارند.

ج)روش استخراج با حلال: با توجه به نوع اسانس از دو نوع حلال فرار و حلال غیر فرار استفاده می شود. اگر گیاه دارای اسانسی باشد که با حلال ترکیب می گردد، جداسازی آن سخت بوده و برای سهولت از حلال های فرار استفاده می شود.

د)استخراج با استفاده از آنزیم های هیدرولیز کننده: عموما این روش برای گروهی از اسانس ها استفاده می شود که منشاءگلوکزیدی دارند .

ه) استخراج اسانس به روش دی اکسید کربن :در بیشتر اسانس هایی که منشاء ترپنی دارند از این روش استفاده می شود این گاز تحت فشار بالا تبدیل به مایع غیر قطبی شده و مواد آروماتیک موجود در گیاه را بدون هرگونه تغییر و تخریب در خود حل می‌کند چراکه دمای بحرانی آن تنها ۳۱ درجه سانتیگراد بوده که برای استخراج اسانس‌های حساس به دما، ایده آل است. از طرف دیگر چون در سیستم هوا حضور ندارد، ترکیبات طبیعی در خطر اکسیداسیون قرار نمی گیرند. (قازجهانیان و جعفری‌زاده، ۱۳۹۱).

عرق گیاهی: عرق گیاهی مخلوطی از آب و مولکول‌های اسانس شناور در آن است که باعث معطر شدن آب می شود. از این فرآورده گیاهی در آبزی پروری کمتراستفاده می‌شود.

عصاره:در صورتیکه مواد موجود در سلول‌های گیاهی با استفاده از حلال‌های مختلف از جمله آب یا حلال‌های آلی از گیاهان استخراج شوند به این محصول عصاره گفته می شود. در صورتیکه عصاره با حلال‌هایی چون اتانل و متانل استخراج شود با توجه به قطبیت های آنها حاوی کلیه مواد موجود در گیاه بوده و به عصاره بدست آمده عصاره تام می‌گویند. در صورتیکه عصاره گیری با حلال‌های دیگر انجام شود ممکن است بعضی از مواد موجود در گیاه خارج گردد. اکثر فرآورده های گیاهی امروز با آب و اتانول از گیاهان استخراج می‌شوند (Mandal *et al*., 2007).

حلال‌های مورد استفاده در عصاره و اسانس گیری گیاهان : حلال، مواد موثره گیاهی را از پودر خشک شده

جدا نموده و در خود حل می‌کند. افزودن آب به حلال ممکن است به افزایش بازده با افزایش قطبیت جهت جذب ترکیبات فعال زیستی قطبی کمک کند. همانطور که در جدول ۲ گردآوری شده، استون، متانل، اتانل، آب جزء حلال‌های قطبی هستندکه ترکیبات فنلی چون فلاونوئیدها و اسیدهای پلی فنلی درآن‌ها حل می‌شوند. کلروفرم، اتیل استات و دی کلرومتان با قطبیت متوسط گروهی از فنل‌ها، فلاونوئید ها و ساپونین هائی که گلیکوزیله هستند، را جدا می کنند. تولوئن، بنزن، تتراکلریدکربن و هگزان جزء حلال‌های غیر قطبی طبقه بندی می‌شوند و برای استخراج اسیدهای چرب، روغن وترکیبات استرولی بکار می‌روند (Mandal *et al.*, 2015).

جدول۲ : نقطه جوش وقطبیت حلال‌های پرکاربرد درعصاره گیری

حلال	آب	استیک اسید	اتانل	متانل	استن	اتیل استات	کلروفرم	دی کلرومتان	بنزن	تولوئن	تتراکلرید کربن	هگزان
نقطه جوش	۱۰۰	۱۱۸	۷۸/۳۷	۶۴/۷	۵۶	۷۷	۶۱	۳۹/۶	۸۰	۱۱۱	۷۷	۶۸
پلاریته	۹	۶/۲	۵/۲	۵/۱	۵/۱	۴/۴	۴/۱	۳/۱	۲/۷	۲/۴	۱/۶	۰/۲

کاربرد فایتوبیوتیک ها در آبزی پروری:

همانطور که بررسی جداول۱ و۳ نشان می‌دهد مدت زمان مصرف فایتوبیوتیک، نوع حلال بکار برده شده و نحوه مصرف(تغذیه، تزریق، حمام) در آبزیان مورد بررسی حسب گونه مورد پرورش و هدف کاربردی متفاوت است. بیشتر مصرف فایتوبیوتیک‌ها جهت کنترل عوامل انگلی بصورت حمام می‌باشد و حلال مصرفی جهت رسیدن به ماده فعال زیستی موثره در راستای کنترل عوامل انگلی متفاوت است. بررسی‌ها نشان داده است که حمام عصاره اتانلی گیاه گندواش و عصاره آبی مارچوبه جهت کنترل مونوژن در آبزیان به‌ترتیب در نرمتن هتروبرانکوس و ماهی باس دریایی موفقیت آمیز بوده و حمام عصاره متانلی گیاه درمنه و دارچین بطور معنی داری داکتیلوژیروس را در ماهی کاراس کنترل کرده است جدول۱ همانطور که درجدول۳ مشاهده می شود ماهیانی چون سی باس، قزل آلا، تیلاپیا تحت مصرف تغذیه‌ای پودر سیر در غذا در طول بازه های زمانی مختلف منجر به بهبود فاکتورهای ایمنی و رشد شدند. استفاده از عصاره زنجبیل این تاثیر را در ماهی قزل آلا تحت استفاده تغذیه ای از عصاره آبی و در مورد سی باس بصورت مصرف پودر داشته است. تاثیر عصاره گیاه ریحان بر بهبود فاکتورهای رشد و ایمنی در کپور معمولی بصورت تزریق عصاره متانلی بوده است. در بررسی های دقیق‌تر، خالص سازی عصاره های مورد بررسی نشان داده که ترکیبات فعال زیستی چون آنتراکوئینون، تیمول(فلاونوئید)، آلیسین، ساپونین، سینئول، سینا آلدئید، آزادراکتین، کامفور، کورکومین شکل۱حسب فایتوبیوتیک مورد استفاده، موجب افزایش فاکتورهای ایمنی و بعضا رشد در آبزی مصرف کننده شده است (روفچائی و همکاران، ۱۳۹۶ ؛ Reverter *et al.*, 2014). استفاده یا عدم استفاده از حرارت، نوع حلال و نحوه استفاده از این عصاره (تغذیه، تزریق، حمام) و زمان و مدت استفاده در چرخه زیستی آبزی بسیار حائز اهمیت است. معمولی‌ترین فاکتورهای موثر بر فرآیند استخراج مواد بستگی تام به انتخاب بخش گیاه (ریشه، ساقه، برگ، گل)، زمان و فصل برداشت گیاه، تکنیک استحصال عصاره و نوع حلال انتخابی دارد(Hernandez *et al.*, 2009).

بررسی روش های استخراج و شناسایی ترکیبات فعال زیستی در میوه ها و گیاهان دارویی:

از آنجائی‌که کیفیت یک عصاره و اثر بخشی آن بر بهبود کیفیت پرورش دام و آبزی به انتخاب یک روش بهینه استخراج بستگی دارد (Sasidharan, 2012) انتخاب

روش مناسب در این راستا بسیار کلیدی است از اینرو مروری داریم بر روش های استخراج ترکیبات فعال زیستی که بطور کل به دو روش استخراج می‌شوند:

الف: روش های کلاسیک و سنتی

استخراج توسط سوکسله، پرکولاسیون و ماسیراسیون

روش های عصاره گیری سنتی با کمک و بدون دخالت حرارت انجام پذیر است. ابتدا گیاه را خشک نموده (در فور، دمای اتاق، سایه) تا رطوبت آن گرفته شود حتی الامکان این خشک شدن در دمای زیر ۴۰ درجه انجام می‌شود تا مواد موثره آسیب کمتری ببیند سپس با آسیاب پودر می کنیم تا سطح تماس حلال و گیاه بیشتر شود (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

استخراج به‌کمک سوکسله (با دخالت حرارت):

دستگاه سوکسله از چهار قسمت : منبع گرمایی، بالن دستگاه، سوکسله و مبرد تشکیل شده. پودر خشک گیاه را در یک بشر ریخته و روی آن حلال می‌ریزند تا بصورت خمیردرآید سپس خمیر برآمده (تورژسانس پیدا کرده) را در ظرف مخصوص که اصولا از جنس کاغذ است قرار می‌دهند تا نصف با خمیر پر می‌کنند و سوکسله را بر روی بالن که در اجاق الکتریکی قرار دارد می‌گذارند و با گیره ثابت می‌کنند از بالای محفظه سوکسله حلال مورد نظر کم کم اضافه می‌شود تا به نصف بالن برسد پس از افزودن حلال، سوکسله را بر روی مبرد قرار داده و آب لوله را باز می کنند. سپس اجاق الکتریکی را روشن کرده و حرارت آن را طوری تنظیم می‌کنند تا حلال درون بالن بطور متعادل بجوشد عمل عصاره‌گیری بر حسب نوع گیاه و حلال و میزان گیاه ممکن است از ۵ تا ۵۰ ساعت طول بکشد. با تبخیر مرتب حلال از بالن تحتانی به طور مداوم حلال خالص بر روی ماده گیاهی قرار گرفته و موجب خروج کامل مواد موثره از درون سلول‌های گیاهی می شود. در این روش می توان از حلال‌هائی با نقطه جوش پائین استفاده کرد. حلال مورد استفاده هگزان یا سایر حلال‌های شیمیایی مناسب بوده و حداکثر تا نقطه جوش، حرارت را باید تنظیم کرد. البته در دمای استخراج بالا برخی از اجزای فرار ممکن است از دست بروند. این مسئله استفاده از آن را برای استخراج ترکیبات حساس به حرارت محدود می کند(صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

استخراج به‌کمک پرکولاتور(بدون دخالت حرارت):

در صورتیکه بخواهیم عصاره بدست آمده شبیه گیاه اصلی بوده و سالم بماند بهتر است از روش بدون حرارت (پرکولاسیون و ماسیراسیون) استفاده شود این روش نسبت به سوکسله به زمان و مصرف حلال بیشتری نیاز داشته و گرانتر تمام می‌شود. پرکولاتور آزمایشگاهی از جنس شیشه بوده و در قسمت پائین آن شیری جهت کنترل خروج حلال تعبیه شده است، پرکولاتور را تا دو سوم حجمش پودر خشک شده گیاه می ریزن و سپس با حلال پرکولاتور را پر می‌کنند. برای خیس خوردن پودر باید چند ساعت تا یک روز صبر کرد. پس از آن شیر پرکولاتور را باز تا حلال به آهستگی جریان یابد. همیشه باید حلال را بطوری فراهم و اضافه نمود تا از خشک شدن سطح پودر داخل پرکولاتور جلوگیری بعمل آید (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

ماسیراسیون(خیساندن):

پودر گیاه را در ظرف مناسب ریخته حلال مورد نظر را اضافه می کنند در ظرف را جهت جلوگیری از تبخیر می‌بندند و ظرف را در مدت بین یک تا ۵ روز در حرارت اتاق قرار می‌دهند. بعد از اینکه تعادل مواد حلال دربافت گیاهی برقرار شد، عصاره را صاف و باقیمانده گیاه را با دستگاه پرس تحت فشار عصاره گیری می‌کنند(صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

استخراج با حلال به شیوه خیساندن وبا استفاده از سوکسله یکی از متداولترین روش‌های اسخراج می‌باشد، از معایب این روش، طولانی بودن زمان استخراج و مصرف مقادیر زیادی حلال است که مستلزم مراحل اضافی و صرف هزینه و وقت برای بازیافت حلال و تغلیظ عصاره میباشد که باعث آسیب به محیط زیست می‌گردد (صادقی، ۱۳۹۳). همچنین در روش سوکسله از حرارت استفاده می شود که منجر به تجزیه گرمایی برخی ترکیبات می‌گردد.

ب : روش های مدرن استخراج شامل :

روش های نوین استخراج؛ غیر سمی، سریع، مکانیزه و دارای حساسیت بالابوده ازلحاظ هزینه به صرفه و از لحاظ محیط زیستی ایمن و دوستدار طبیعت می‌باشند (Turner,2006). از پرکاربردترین‌ها جهت استخراج عصاره های گیاهی؛ ۱: استخراج با انرژی مافوق صوت(UAE) [۴]، ۲: میدان الکتریکی پالسی(PEF)[۵]، ۳: هضم آنزیمی(EAE[۶])، ۴: استخراج به کمک امواج ماکروویو (PEF[۷])،۵ : استخراج به کمک مایکروویو بدون حلال(SFM[۸])، ۶: سیال فوق بحرانی(SFE)[۹]، ۷: حلالهای شتابدار (ASE) [۱۰]، ۸: استخراج به کمک مایع تحت فشار(PLE[۱۱])، ۹:استخراج با آب داغ تحت فشار(PHWE[۱۲])، ۱۰: استخراج با حلال به کمک غشا (MAS[۱۳])،۱۱: میکرو استخراج با فاز جامد (SPM[۱۴])، ۱۲: استخراج با لوله جاذب متحرک (SBS[۱۵]).

استخراج بوسیله اولترا سونیک (UAE):

استخراج به کمک اولتراسوند بر تکرار فشار بالا و فشار پایین است. این تناوب چرخه فشار بالا و فشار پایین ۲۰،۰۰۰ بار در ثانیه از فراصوت نیروهای برشی شدید ایجاد می‌کند. این استرس شدید بر غشاء، سوراخ هایی بردیواره سلولی ایجاد می کند و منتج به انتقال مواد داخل سلولی به حلال اطراف می شود. از طریق این سیستم بازده بالاتر درمدت زمان کوتاه تر می توان بدست آورد. از آنجا که استخراج اولتراسونیک یک فرایند تجدید پذیر است، نتایج استخراج را می توان برای کیفیت یک عصاره استاندارد کردو تکرار نمود. با تنظیم و کنترل مدت زمان و فشار می توان ترکیب مایع خروجی از فرآیند استخراج را کنترل و بازتولید نمود (Turner, 2006).

میدان الکتریکی پالسی(PEF):

روش میدان الکتریکی استفاده از پالس‌های ولتاژ بالا در بین دو الکترود ۲۰ و ۸۰ کیلو وات بر سانتی متر است که به عنوان یک تکنیک غیر حرارتی با نفوذپذیری در غشا، در خروج مواد موثره گیاهی در دو دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است. اعمال پالس ها در مدت زمان کوتاه در حد میکرو ثانیه است که تجزیه شوندگی الکتریکی سلولها را موجب شده و نفوذ پذیری آن ها را افزایش می‌دهد. بطوریکه برای جدا کردن قند از چغندر قند با استفاده ار میدان ۱/۲ تا ۲/۵ کیلو وات بر سانتی متر و تعداد یک تا دویست پالس می‌توان به میزان قابل توجهی سلول‌های چغندر قند را تخریب کند (Fincan *et al*., 2004).

استخراج به کمک آنزیم (EAE) :

با اضافه کردن آنزیم های خاصی مانند آمیلاز، پکتیناز در فرآیند استخراج از طریق شکستن دیواره سلولی و هیدرولیز پلی ساکارید و چربی باعث افزایش بازیابی می شود. این روش به عنوان یک فناوری سازگار با محیط زیست برای استخراج روغن و ترکیبات فعال زیستی به رسمیت شناخته شده، زیرا در این سیستم از آب بعنوان حلال به جای مواد شیمیایی آلی استفاده می شود(Puri *et al*., 2012).

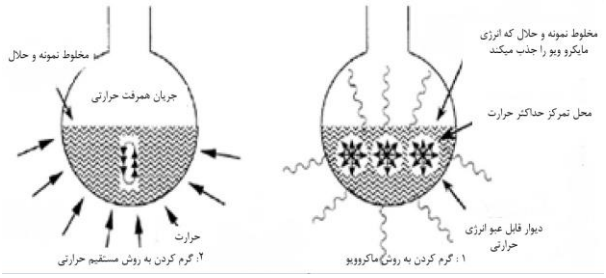
استخراج با کمک امواج مایکروویو(MAE):

این روش بر اساس حرارت دهی و استفاده از حلال‌های آلی می باشد. نمونه و حلال مناسب آن در یک ظرف ریخته می شوند، فشار تنظیم می گردد و با مایکروویو حرارت داده می شود. بعد از ۵ تا ۲۰ دقیقه (زمان ۴۰ ثانیه نیز در پژوهش‌ها دیده شده) استخراج کامل گشته، سپس حلال فیلتر می‌گردد. کارایی گرم شدن حلال‌های

---

[3] Ultra sound extraction
[۵] Puls electric field
[۶] Enzyme assisted extraction
[۷] Microwave heating
[۸] Solvent free microwave extraction
[۹] Supercritical fluids
[۱۰] Accelerated Solvent Extraction
[۱۱] Pressurized liquid extraction
[۱۲] Pressurized hot water extraction
[۱۳] Membrane Assisted Solvent Extraction
[۱۴] Solid-phase microextraction
[۱۵] Stir Bar Sorptive Extraction

مختلف به ضریب پراکنش آنها بستگی دارد. استخراج با کمک امواج مایکروویو براساس جذب انرژی مایکروویو توسط مولکول های قطبی ترکیبات شیمیایی است شکل ۲. انرژی جذب شده با ثابت دی الکتریک جسم متناسب است، که موجب چرخش دوقطبی در میدان الکتریکی می شود (معمولا ۲/۴۵ گیگا هرتز) است. اتانول و متانول نسبت به آب مقدار کمتری از انرژی مایکروویو را جذب می کنند. از طرف دیگر هگزان و سایر حلال‌های غیر قطبی در مقابل مایکروویو خنثی هستند و حرارت ایجاد نمی کنند. بهینه سازیMAE بستگی به ترکیب حلال، حجم حلال، دما و زمان استخراج و ویژگی نمونه مورد نظردارد (Hemwimon *et al*., 2007).



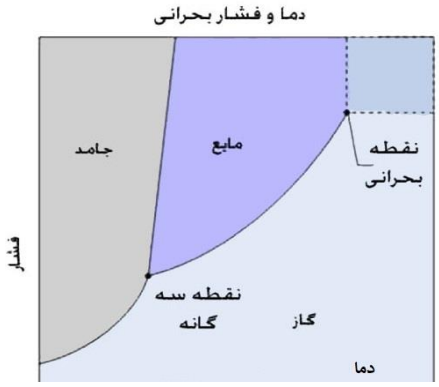
شکل ۲ : مقایسه گرم شدن محلول با روش متداول(۱) و روش مایکروویو(۲)

استخراج توسط مایکروویو بدون حلال Solvent (free microwave extraction):

این روش برای استخراج اسانس بکار می‌رود. در این روش گیاه مورد نظر به صورت تازه در داخل بالن در آون مایکروویو قرار می‌گیرد. عمل استخراج اسانس توسط تقطیر آب میان بافتی به کمک امواج مایکروویو صورت می‌گیرد. این روش علاوه بر جداسازی، نوعی پیش تغلیظ هم به شمار می‌آید. اسانس جمع آوری شده می‌تواند مستقیما به دستگاه GC-MS تزریق شود و مورد جداسازی قرار گیرد (Lucchesi *et al*., 2005).

استفاده از روش سیال فوق بحرانی (SFE) :

روش استخراج با سیال فوق بحرانی در اوایل دهه ۷۰ به دلیل افزایش ناگهانی مورد توجه قرار گرفت. این سیال ها از نظر خواص انتقالی مانند گازها، نفوذپذیری بالا و ویسکوزیته‌ی پائینی دارند از نظر قدرت حلالیت، شبیه به حلال های مایع هستند. در منطقه بالاتر از نقطه بحرانی که در آن سیال، فوق بحرانی نامیده می شود شکل ۳. مرحله‌ای است که تمایز بین فاز گاز و مایع وجود ندارد و دانسیته مایع با دانسیته گاز برابر می گردد. از آنجایی که در فرآیند های استخراج با این روش، فشار بالاتر از فشار بحرانی می باشد، بر خلاف عملیات های انجام شده در فاز مایع، فشار متغیر در کنترل فرآیند موثر است.کربن دی اکسید و آب معمول ترین و شناخته شده ترین سیالات فوق بحرانی مورد استفاده هستند. این روش مناسب استخراج ترکیبات حساس نسبت به حرارت می باشد و نیز مقدار نمونه، زمان و حلال مورد استفاده در این روش کمتر است از اینرو جزء روشی سازگار با محیط زیست می‌باشد. این دستگاه به راحتی به دستگاه کروماتوگرافی وصل می شود و برای ترکیبات با فراریت بالا مناسب است (Lang and Wai,2001).



شکل ۳: نمائی از وضعیت فوق بحرانی حلالها بر حسب تغییرات فشار و دما

استخراج با حلال شتاب یافته (ASE) :

روش استخراج با حلال شتاب یافته نوعی فرآیند استخراج جامد- مایع است که در دماهای بالا (معمولا بین ۵۰ تا ۲۰۰درجه سانتیگراد) و فشارهای حدود ۱۰ تا ۱۵ مگاپاسکال انجام می گیرد. بنابراین، روش ASE نوعی روش استخراج با حلال تحت فشار بوده و مشابه SFE (استخراج با حلال فوق بحرانی) می باشد. مهمترین مزیت

سامانهASE، کاربرد حلال های غیر سمی مانند آب و دی اکسید کربن است که هم از نظر اقتصادی و هم زیست محیطی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. برای استخراج ترکیبات قطبی، روش ASE موثرتر و بهتر از روش SFE است. همچنین در مقایسه با روش سنتی سوکسله، در روش ASE نیاز به مصرف حلال بسیار کمتر بوده و زمان استخراج نیز به میزان قابل توجهی کاهش می یابد. معمولا از روش ASE برای استخراج ترکیبات مقاوم در دماهای بالا مانند آلاینده های زیست محیطی استفاده می‌شود (جبرائیلی و همکاران، ۱۳۹۰).

استخراج با مایع تحت فشار (PLE)

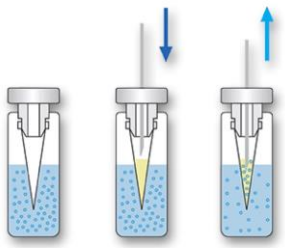
اصول این روش تا حدودی ساده‌تر از روش سیال فوق بحرانی است. در این روش محفظه نمونه با حلال پر می گردد، سپس محفظه تا دمای مورد نظر گرم می شود و تحت فشار قرار می گیرد تا حلال در حالت مایع باقی بماند. حلال حاوی ماده حل شده در یک ظرف خالی جمع می گردد. از فواید این روش قابلیت استفاده مجدد از همان حلال می باشد. استخراج با حلال شتاب یافته یک شکل از استخراج با حلال تحت فشار است و یک فرایند استخراجی است که در دمای بالا بین ۵۰ تا۲۰۰ درجه سانتی گراد و در فشار مابین ۱۵ تا ۲۲ مگاپاسکال انجام می گیرد این روش بعنوان یک تکنیک مناسب برای استخراج ترکیبات موثره گیاهی است و در مقایسه با روش های قدیمی مثل استخراج با سوکسله کاهش عمده‌ای درمصرف مقدار حلال و زمان استخراج دارد. دراین روش افزایش دما باعث افزایش سرعت استخراج شده و فشار بالا حلال را در حالت مایع نگه می‌دارد از این رو فرایند استخراج سریعتر و با ایمنی بیشتری صورت می‌گیرد (جبرائیلی و همکاران ،۱۳۹۰).

استخراج با آب داغ تحت فشار(PHWE)

استفاده از آب با دماهای بالا به عنوان حلال در استخراج ترکیبات قطبی یا نیمه قطبی کاربرد دارد. در یک سیستم تحت فشار و در دمای بین ۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتیگراد، آب زیر نقطه بحرانی و در دمای بالای ۳۷۴ درجه و فشار ۲۱۸ اتمسفر فوق بحرانی می گردد. در اینجا از واژه PHWE برای آب مایع با دمای بالای ۱۰۰ درجه و فشار نسبتا پایین حدود ۲۰ اتمسفر استفاده می‌گردد. اصول PHWE مانند PLE می باشد، اما در اینجا از آب به عنوان حلال استفاده می گردد. آب یک حلال ویژه است، زیرا خصوصیات فیزیکی آن با افزایش دما تغییر می کند و در دماهای بالا شبیه یک حلال آلی عمل می‌کند. این استخراج در عرض یک ساعت انجام می‌گیرد و سیستم توسط CO_2 تحت فشار قرار می‌گیرد. این فرآیند به دلیل استفاده از آب به عنوان حلالی سازگار با محیط زیست و با کارایی بالا در چهارچوب فناوری های شیمیایی سبز قرار می‌گیرد (گل محمد و همکاران،۱۳۸۷).

استخراج با حلال به کمک غشا(MAS)

از غشاهای بدون منفذ برای استخراج ترکیبات قطبی و غیر قطبی از نمونه های مایع با مقادیر کم حلال استفاده می گردد. این غشاء یک فاز مایع یا جامد پلیمری است که بین دو فازی که معمولا آبی است قرار گرفته است. یکی از این دوفاز، فاز دهنده است که شامل ترکیباتی است که باید استخراج گردند و فاز دیگر فاز پذیرنده است که در این فاز ترکیبات استخراج شده جمع آوری می‌گردند شکل ۴. نیروی پیش برنده در فرایند استخراج از طریق غشاء، شیب غلظت می باشد. از مزایای این روش استفاده از مقادیر کم حلال و همچنین مکانیزه شدن از طریق اتصال با HPLC[۱۶] می باشد. در این روش فقط نمونه های مایع و گازی می تواند فرایند شوند (De jager *et al*.,2009).



شکل ۴ : استخراج با حلال به کمک غشاء

[۱۶] High-performance liquid chromatography

میکرو استخراج با فاز جامد (SPME):

در SPME از یک فیبر سیلیکا استفاده می‌گردد که درسطح خارج با یک فاز ساکن مناسب به ضخامت ۵ تا ۱۰۰ میکرومتر از پلیمرهای مختف مانند پلی دی متیل سیکلوکسان PDMS پوشانده شده اند. اندازه کوچک فیبر و حالت لوله ای آن این امکان را می دهد که درون سوزن یک وسیله سرنگ مانند جا گیرد. از فوائد اصلی آن این است که نیازی به حلال نداشته یا مقادیر ناچیزی از حلال نیاز بوده و قابل اتوماسیون می‌باشد. از پارامترهای مهم موثر بر این روش می توان به نوع ضخامت فیبر پوشاننده، زمان استخراج و ویژگی‌های نمونه اشاره کرد (Vas and Vekey, 2004).

استخراج با لوله جاذب متحرک (SBSE):

این روش مشابه روش SPME بوده و از جاذب های مشابه استفاده می گردد. استخراج به کمک حرکت کردن لوله متحرک پوشانده شده با پلی دی متیل سیکلوکسان (PDMS) در زمان مشخص می‌باشد لوله متحرک از نمونه بیرون آورده می شود و ترکیبات جذب شده توسط حرارت یا توسط یک مایع جدا می گردند. این روش نسبت به SPMEحساسیت بالاتر و تکرارپذیری بهتری دارد، اما برخلاف SPME نمی تواند به صورت مستقیم به تکنیک-های جداسازی مانند GC وصل گردند (Prieto *et al*.,2010).

جدول ۳: فایتوبیوتیک‌ها موثر بر فاکتورهای ایمنی و رشد آبزیان با بررسی نوع و میزان و مدت زمان مصرف

نام گیاه	نام علمی گیاه	نام آبزی	نوع استخراج گیاهی	نوع استفاده	مدت زمان مصرف(روز)	رفرنس
سیر	*Allium sativum*	*Lates calcarifer*	پودر خشک گیاه	تغذیه دهانی	۱۴	Talpur and Ikhwanuddin, 2012
		Oreochromis niloticus	پودر خشک گیاه	تغذیه دهانی	۳۰-۶۰-۹۰	Aly *et al*., 2008
		Oncorhyncus mykiss	پودر خشک گیاه	تغذیه دهانی	۱۴-۵۸	Fazlolahzadeh *et al*., 2011
زنجبیل	Zingiber officinale	*Lates calcarifer*	پودر	تغذیه دهانی	۱۵	Talpur *et al.* 2013
		Oncorhyncus mykiss	عصاره آبی و پودر	تغذیه دهانی	۱-۴	Dügenci *et al*., 2003 Nya and Austin, 2009 Haghighi and Rohani, 2013
ریحان	Ocimum sanctum	*Cyprinus carpio*	عصاره متانلی	تزریقی		Pavaraj *et al*.,2011

نتیجه گیری کلی

جهت رسیدن به آبزی پروری پایدار و تولید انبوه، ضرورت استفاده از مکمل‌های رشد و ایمنی اجتناب ناپذیر است. با توجه به اینکه کشور از تنوع گونه ای گیاهی مناسبی برخوردار بوده که پتانسیل استفاده در آبزی پروری را دارد، تمرکز بر روی استحصال فایتوبیوتیک‌ها در آینده ضروری بنظر می‌رسد(روفچائی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Reverter *et al*., 2014).

روش عصاره گیری پر کاربردترین روش جهت استحصال فایتوبیوتیک‌ها است وکیفیت یک عصاره و اثر بخشی آن به انتخاب یک روش بهینه استخراج بستگی دارد. آشنایی با روش ها و تکنیک‌های استحصال عصاره، مسیر استحصال مواد موثره کارا را در این زمینه هموار می سازد(Harikrishnan *et al*., 2011). بررسی‌ها حاکی از آن است که روش های سنتی نیاز به زمان و نیروی بیشتری دارند و در مقایسه با روش های مدرن، مصرف

نمونه و حلال در آنها بالاتر است (Mandal *et al*., 2007).

به طور کلی می‌توان گفت، استفاده از سیال فوق بحرانی برای استخراج ترکیبات غیرقطبی یا قطبیت متوسط استفاده می گردد. در حالیکه روش‌های استخراج با مایع تحت فشار و ماکروویو می توانند برای ترکیباتی با قطبیت مختلف بکار روند. همچنین روش‌های میکرو استخراج با فاز جامد و استخراج با لوله جاذب متحرک می توانند برای استخراج ترکیات آلی فرار و ترکیبات آلی کوچک با فراریت کم بکار روند (صادقی، ۱۳۹۳). با مروری بر تحقیقات انجام شده تاکنون به نظر می‌رسد استخراج به کمک امواج ماکروویو(MAE) ساده ترین، سریعترین و راحت ترین گزینه برای استخراج ترکیبات گیاهی حساس به حرارت می باشد(شیرزاد و شریفی، ۱۳۹۲).

توصیه ترویجی

ایران با داشتن تنوع اقلیمی و قرار گرفتن در موقعیت جغرافیایی خاص و داشتن حدود هشت هزار گونه گیاهی از لحاظ نوع گونه و میزان ماده موثره، می‌تواند از این ترکیبات شیمیایی گیاهی علاوه بر مصرف بالینی جهت بهبود کیفیت پرورش آبزیان بهره برداری کند. از اینرو با توجه به کثرت تحقیقات انجام شده در دنیا بر روی عصاره های گیاهی و با توجه به بررسی مروری فایتویوتیک های بومی کشور(روفچائی و همکاران، ۱۳۹۵)، تمرکز بر گونه های گیاهی موجود در کشور و استفاده از سیستم‌های نوین استخراج از جمله کمک از امواج مایکرو ویو(MAE) می‌تواند راه‌گشایی جهت ادامه تحقیقات بر روی اثر بخشی فایتوبیوتیک های بومی در مدیریت کنترل و پیشگیری بیماری‌ها و بهبود کیفیت پرورش آبزیان کشور باشد.

منابع

صادقی، م.، ۱۳۹۳. تکنیک‌های جدید استخراج مواد موثره گیاهان دارویی.کتابچه خلاصه مقالات اولین کنگره سراسری فرآوری‌های نوین، موسسه آموزش عالی مهر آروند، تهران۱۵ بهمن ۱۳۹۳.

شیرزاد، ف.ز و شریفی، ت.،۱۳۹۲. بررسی روش های استخراج و شناسایی ترکیبات بیواکتیو در میوه ها و گیاهان دارویی. کتابچه خلاصه مقالات بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی شیراز، دانشگاه شیراز،۷ تا ۹ آبان ۱۳۹۲.

روفچایی، ر.، میرواقفی، ع.، عبداللهی، و.، ۱۳۹۵. بررسی اثر فیتوبیوتیک های بومی بر پاسخ ایمنی ماهی ها و سخت پوستان. بهره برداری و پرورش آبزیان، جلد پنجم، شماره دوم، صفحات ۱-۱۳.

صمصام شریعت، ه.، ۱۳۸۶ .عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان داروئی. انتشارات مانی، ۲۵۸ صفحه.

نجفی، ف.، عبادی، م ت.، عباسیان، ج.،۱۳۹۰. فرآیندهای برداشت، خشک کردن و فرآوری گیاهان دارویی و معطر. انتشارات دانشگاه شهید بهشتی تهران،۳۸۰ صفحه.

جبرائیلی، ش.، قره خانی، م.، سول نژاد، ن.، پاکزادی، م.،۱۳۹۰. استخراج با حلال شتاب یافته روشی نوین در استخراج ترکیبات موثره از گیاهان دارویی. کتابچه خلاصه مقالات اولین همایش ملی امنیت غذائی، ۲۰ مهر ۱۳۹۶.

قازجهانیان، م. ع.، جعفری زاده، ه. استفاده از دی اکسید کربن فوق اشباع بعنوان حلال جایگزین در استخراج اسانس های گیاهی. همایش ملی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی، همایش ملی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی بجنورد، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، ۵ لغایت ۶ مهرماه۱۳۹۱صفحه ۱۳۵.

گل محمد، ف.، ایکانی، م.، شکرالله زاده، س.،۱۳۸۷. مروری بر استخراج با آب فوق گرم و کاربرد آن در استحصال مواد موثره گیاهان داروئی. فصلنامه گیاهان داروئی، سال هفتم، شماره ۲۷، صفحات ۱-۲۴ .

Aly, S.M., Atti, N.M.A. and Mohamed, M.F., 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. Abstracts of the 8th

International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 12-14 october 2008.

Citarasu,T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquacutue International,18: 403-414.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology, 8:1137-44.

De Jager, L.S., Perfetti, G.A. and Diachenko, G.W., 2009. Comparison of membrane assisted solvent extraction, stir bar sorptive extraction, and solid phase microextraction in analysis of tetramine in food. Journal of Separation Science, 32: 1081-1086.

Dügenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. Journal Ethnopharmacol, 88:99–106.

Ekanem, A.P. and Brisibe, E.A., 2010. Effects of ethanol extract of Artemisia annua L. against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. Parasitology Research, 106: 1135–1139.

FAO. Aquaculture Department (2015) The state of world fisheries and aquaculture 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2015.

Fazlolahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S. and Seifi, S., 2011. Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of rainbow trout in temperature stress. Australian Journal of basic and applied sciences,5:84-90.

Fincan,M., Devito, F. and Dejmek, P., 2004.Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. Journal of food Engineering, 64: 381-388.

Francis, G., Makkar, H. P., and Beck, K., 2005.Quillaja saponins- a natural growth promoter for fish. Animal feed science and technology,121: 147-157.

Germano, A. Biotechnology of plant secondary metabolism: Methods and Springer New York, 2016.P: 180.protocols.

Haghighi, M. and Rohani, M.S., 2013. The effects of powdered ginger (*Zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of medicinal plant and herbal therapy research, 1: 8-12.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish.(Review).Aquaculture, 317 : 1–15.

Hemwimon, S., P. Pavasant. and A. Shotipruk.,2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. Separation and Purification Technology 54: 44-50.

Hernandez- Hernandez, E., Ponce-Alquicira, E. and Jaramillo-Flores, M. E., 2009.Antioxodant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. Meat Science, 81: 410-417.

Huang, A.-G., Yi, Y.-L., Ling, F., Lu, L., Zhang, Q.-Z. and Wang, G.-X., 2013. Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitology Research, 112: 4065–4072.

Hutson, K.S., Mata, L., Paul, N.A. and de Nys, R., 2012. Seaweed extracts as a natural control against the monogenean *ectoparasite, Neobenedenia* sp., infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*).

Internationalo journal Parasitology, 42: 1135–1141.

Ji, J., Lu, C., Kang, Y., Wang, G.-X. and Chen, P., 2012. Screening of 42 medicinal plants for in vivo anthelmintic activity against *Dactylogyrus* intermedius (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitology ResEarch,111: 97–104.

Lang, Q and Wai, C. M,2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- Apractical review. Talanta, 53: 771–782.

Lucchesi, M.E., Chemat, F. and Smadja, J., 2005.Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herb. journal of chromatography A, 1043: 323-327.

Mandal, S. C. Mandal, V. and Kumar Das, A, 2015. Essentials of botanical extraction: principles and application. Elsevier, medical, 5: 207.

Mandal, V., Y. Mohan. and S. emalatha.2007. Microwave-assisted extraction- an innovative and promising extraction tool for medicinal plant search. Pharmacognosy reviews, 1:7-18.

Nya, E.J. and Austin, B., 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal fish disease, 32: 971–977.

Pavaraj, M., Balasubramanian, V., Baskaran, S. and Ramasamy, P., 2011. Development of immunity by extract of medicinal plant *Ocimum* sanctum on common carp *Cyprinus carpio* (L.). Research Journal Immunology,4:12-18.

Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L.A., Etxebarria, N. and Zuloaga, O. 2010. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. Journal Chromatogr A, 1217: 2642-66.

Puri, M. and Barrow, C., 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in Biotechnology, 30:38-44.

Ringø, E., Olsen, RE., Gifstad, Tø., Dalmo, RA., Amlund, H. and Hemre, GI., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition, 16:117-36.

Sasidharan, S., Logeswaran, S. and Latha, L.Y., 2012.Wound healing activity of *Elaeis guineensis* leaf extract.International journal of molecular sciences, 13:336-47.

Sethiya, N. K., 2016. Review on Natural Growth Promoters Available for Improving Gut Health of Poultry: An Alternative to Antibiotic Growth Promoters. Asian Journal of Poultry Science,10 : 1-29.

Siddiqui, M. W., Prasad, K. and Bansal, V, 2016. Plant secondary metabolites stimulation extraction and utilization.P:375.

Taiz, L. and Zeiger, E.2013. plant physiology.2013. Sinauer associates Lin., Publishers Sunderland, Massachusetts U. S. A. PP:778.

Talpur, A.D. and Ikhwanuddin, M., 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against Vibrio harveyi infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). Aquaculture, 364: 6–12.

Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M. and Ambok Bolong, A.-M., 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against Vibrio harveyi. Aquaculture, 400: 46–52.

Turner, C, 2006. Modern extraction techniques food and agriculture. P:4-20.

Vas, G. and Ve key, K., 2004. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. Journal Of Mass Spectrometry,39: 233–254.

Xie, J., Liu, B., Zhou, Q., Su, Y., He, Y. and Pan, L., 2008. Effects of anthraquinone extract from rhubarb Rheum officinale Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. jian. Aquaculture, 281: 5–11.

Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Juna, X. and Jeney, Z., 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, Oreochromis *niloticus*. Aquaculture, 253 1–4, :39-47.

Introduction of various methods for the extraction of phytobiotics used in aquaculture

Rufchaie R. [1*]; Sadeghi Z. [2]; Amiri Sandosi A.[1] ; Hasani Moghadam M.[1]

[1]Inland Waters Aquaculture Research center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agriculture research Education and Extension Organization (AREEO),Bandar-e Anzali, Iran

[2] Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Department of Phytochemistry, Tehran, Iran

Abstract

Phytobiotics are plant derivatives derived from leaves, roots, tubers or fruit plants, solid, dry or essential oils to improve nutrition for livestock and poultry farming. These plant derivatives are well-practiced in aquaculture, such as: stimulating food intake, increasing growth, increasing digestive tract discharges, increasing immunity, anti-coccidiosis and parasitic activity. Existing materials are from bioactive chemical groups such as alkaloids, phenols, flavonoids, terpenes and polysaccharides. Various methods are used to extract these effective ingredients. The choice of these methods in terms of plant species, solvent type, use or non-use of heat requires different techniques. In this paper, while reviewing the use of phytobiotics in aquaculture, the introduction of classical and modern techniques in this regard has been considered. Reports indicate that methods Modern due to the reduction of organic and synthetic chemicals and, saving time, efficiency and better quality of the extractive material are of interest to researchers. And given the need to take advantage of these valuable biomass in aquaculture, familiarity with these techniques in the future will be the key to achieving sustainable aquaculture.

Keywords: Aquaculture, Phytobiotic, Extract, Secondary metabolite, Bioactive compounds, Active ingredient

*Corresponding author: Roofchaie@gmail.com