



تأثیر روش فراصوت بر استخراج رنگ خوراکی کلروفیل از برگ درخت شاتوت

حامد صابریان*، فرشته حسینی، شادی بلوریان

استادیار، گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

(تاریخ دریافت: 95/9/11، تاریخ پذیرش: 95/11/18)

چکیده

هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی استخراج کلروفیل از برگ درخت شاتوت با استفاده از روش فراصوت بود. برای بهینه‌سازی اثر شدت توان فراصوت (10-100٪) نسبت حلال به ماده جامد (10-5 میلی‌گرم بر لیتر)، دما (30-70 درجه سانتی‌گراد) و زمان (2-10 دقیقه) بر بازده کلروفیل کل و شاخص سبزی از طرح مرکب مرکزی با شش تکرار در نقطه مرکزی استفاده شد. نتایج بهینه‌سازی نشان داد که مدل درجه دوم برای بازده کلروفیل کل معنی‌دار بود و ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای آن 0/922 می‌باشد. نسبت حلال به ماده جامد، مهم‌ترین عامل اثرگذار مثبت بر بازده کلروفیل بود؛ اگرچه افزایش دمای استخراج، به‌طور قابل توجهی موجب کاهش بازده شد. افزایش شدت توان فراصوت نیز موجب افزایش معنی‌داری در بازده کلروفیل شد. بازده بیشینه تحت شرایط دمای $30/2^\circ\text{C}$ ، شدت توان فراصوت 100٪، زمان 9/83 دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد 9/99 (ml/g) پیش‌بینی شد و تحت این شرایط میزان کلروفیل کل 680/50 (میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک) به‌دست آمد. مقایسه دو روش متداول و فراصوت نیز نشان داد که بازده استخراج کلروفیل با استفاده از روش متداول (495/65 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک) به‌طور معنی‌داری کمتر از روش فراصوت (680/5 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک) بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش فراصوت، روشی کارآمد برای استخراج کلروفیل می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استخراج کلروفیل، روش فراصوت، شاتوت، بازده.

۱- مقدمه

محققین فعالیت آنتی اکسیدانی کلروفیل را تایید کردند که در نهایت پتانسیل پیش‌گیری از بیماری‌های مزمن را نیز به همراه خواهد داشت. هم‌چنین این ترکیب، مستعد فعالیت‌های ضدسرطانی^۱ در بدن انسان می‌باشد [12، 13].

با توجه به کاربردهای متعدد رنگ خوراکی کلروفیل (E_{141})، استخراج آن از گیاهان مورد توجه واقع شده است. برای تولید کلروفیل دو عامل مهم از جمله استفاده از گیاهان حاوی مقدار زیاد کلروفیل و روش استخراج کارآمد ضروری می‌باشد [14]. جهت یافتن روش‌های استخراج دوست‌دار محیط زیست، کاهش مصرف حلال، کوتاه کردن زمان استخراج و افزایش بازده، فناوری‌های جدیدی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که از جمله روش استخراج، استفاده از فناوری‌های فراصوت، استخراج با حلال فوق بحرانی و هم‌چنین استخراج به کمک مایکروویو می‌باشد [15]. از میان این روش‌ها، روش فراصوت به‌عنوان یک روش جایگزین کارآمد، ارزان قیمت و ساده نسبت به فناوری‌های استخراج متداول شناخته شده است که برای استخراج رنگدانه‌های گیاهان، ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدان‌ها به‌کار گرفته شده است [16، 17].

مک کینی گزارش کرد که استفاده از فناوری فراصوت در استخراج لیگنین از چوب، سبب کاهش زمان از روز به ساعت شده است [18]. روحانی و همکاران مشاهده کردند که طی استخراج کورکومینوئید از نمونه‌های زردچوبه با استفاده از تیمار فراصوت غیرمستقیم (در حمام فراصوت) در دمای 25 درجه، بازده کورکومینوئید حدود 3 برابر روش متداول بود [19]. کوکو و همکاران استخراج رنگ از روناس را مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که بیش‌ترین بازده استخراج با روش فراصوت طی زمان 18 دقیقه و دمای 36 درجه، حدود 63٪ بود درحالی که بیش‌ترین بازده استخراج با روش متداول حدود 58٪ بود و حتی جهت رسیدن به این بازده، 60 دقیقه زمان نیاز بود [20]. سازوکار روش استخراج با استفاده از روش فراصوت، به‌طور معمول به اثرات مکانیکی، حفره‌زایی و حرارتی نسبت داده می‌شود که منجر به تخریب حرارتی دیواره‌های سلولی، کاهش اندازه ذرات، و افزایش انتقال جرم از غشای سلولی می‌شود. اثرات مکانیکی روش فراصوت ممکن است به علت کاهش اندازه ذرات در ماتریس، منجر به افزایش سطح تماس بین فازهای

1. Anti-mutagenic

استفاده از رنگ‌های مصنوعی در صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارد. با این حال، تمایل فزاینده‌ای برای جایگزینی آن‌ها با رنگ‌های با منشا طبیعی به‌وجود آمده است. اثرات جانبی متعددی از قبیل اثرات آلرژیک، اثرات عصبی و رفتاری (مانند بیش‌فعالی) و هم‌چنین سمیت ناشی از مصرف رنگ‌های مصنوعی در طولانی مدت مشاهده شده است. این درحالی است که رنگ‌های مشتق شده از منابع طبیعی، علاوه بر این‌که دارای کیفیت، کارایی و ویژگی‌های حسی مناسبی هستند، دارای اثرات دارویی متعددی از قبیل اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد کلسترول و دیابت نیز می‌باشند و بنابراین نقش مهمی در ارتقاء سلامتی انسان برعهده دارند [3-1].

کلروفیل‌ها متداول‌ترین رنگدانه سبز طبیعی هستند که در گیاهان یافت می‌شوند. از آن‌جایی که کلروفیل یک بخش جدایی‌ناپذیر غذاهای گیاهی می‌باشد، در طول تاریخ به‌عنوان یک جزء رژیم غذایی انسان بوده است [4]. این رنگدانه طبیعی با استفاده از حلال‌های آلی از برخی از گیاهان سبز خوراکی مانند علف، یونجه، گزنه، اسفناج، برگ برخی از گیاهان مانند توت، شاتوت، چغندر قند و غیره استخراج می‌شود [4، 5]. بنابراین ماده اولیه لازم جهت استخراج این محصول گران‌قیمت، بسیار ارزان است. دو نوع کلروفیل a و b که کلروفیل‌های غالب در گیاهان عالی می‌باشند، ساختار مشابهی دارند و تفاوت آن‌ها در گروه R است. اگر R یک گروه متیل (CH_3) باشد، کلروفیل از نوع a ($C_{55}H_{72}MgO_5N_4$) و اگر عامل فرمیل (CHO) باشد، کلروفیل از نوع b ($C_{55}H_{70}MgO_5N_4$) است [6-8].

کلروفیل جهت رنگ کردن فراورده‌های لبنی، روغن‌های خوراکی، کیک، نوشیدنی‌ها، آب میوه، ژله‌ها، پاستا، فرمولاسیون غذای کودک، آدامس، شکر و محصولات قنادی و هم‌چنین در حفظ رنگ سبزی‌های منجمد و یا کنسرو شده کاربرد دارد [9، 10]. به دلیل اثرات سلامتی بخش کلروفیل، بسیاری از محصولات محتوی آن از قبیل مکمل‌ها و آب میوه‌های غذایی مورد استقبال قرار گرفته‌اند. تولیدکنندگان این محصولات مدعی هستند که تشابه شیمیایی بین کلروفیل و گروه پروستتیک (هم) هموگلوبین ممکن است مسئول محافظت بدن انسان در برابر چندین بیماری باشد [11]. برخی از

مایع و جامد شود و در نتیجه باعث افزایش بازده شود [21]. استفاده از روش فراصوت و طرح مرکب مرکزی در سه سطح (مطابق جدول 1) انجام پذیرفت. شرایط استخراج شامل توان فراصوت (100-10٪)، نسبت حلال به ماده جامد (10 به 1 تا 5 به 1 میلی‌لیتر بر گرم)، دمای استخراج (70-30 درجه) در طی زمان (10-2 دقیقه) بود. جهت بهینه‌سازی استخراج از حلال اتانول 90٪ استفاده شد. همه آزمون‌های استخراج تا حد امکان در شرایط نور کم انجام شد. پروب دستگاه فراصوت داخل نمونه (یک سانتی متر بالاتر از کف سلول) قرار گرفت و تیمار فراصوت اعمال شد. باتوجه به این‌که طی فرایند اعمال فراصوت، دمای نمونه‌ها افزایش می‌یابد، جهت تنظیم دما از سیرکولاتور آب استفاده شد. نمونه‌ها در دمای 4 درجه و دور 8000 rpm برای مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی جمع‌آوری شد. آزمون‌ها در دو تکرار انجام شدند [24].

2-3- اندازه‌گیری کلروفیل با استفاده از روش اسپکتروسکوپی

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل، مایع رویی به‌دست آمده بعد از عمل سانتریفیوژ در مراحل قبل، با استفاده از استون 80٪ رقیق شد و جذب نمونه‌ها در طول موج‌های 663 و 645 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل BC47358، شرکت Biochrom، ساخت انگلستان) خوانده شد و با استفاده از معادله (1) میزان کلروفیل کل محاسبه گردید [25]:

(1)

= کلروفیل کل (میلی‌گرم به ازای 100 گرم وزن خشک نمونه) $\times 1000/100 \times (20/2 A_{663} + 8/02 A_{645}) \times$ فاکتور رقیق سازی

2-4- اندازه‌گیری شاخص رنگی

شاخص سبزی (a^*) عصاره‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه هانتربل ColorFlex HunterLab، مدل C04-1005-631، ساخت تایوان صورت پذیرفت [26].

صابریان و همکاران بیان کردند که از میان منابع گیاهی مختلف (شامل یونجه، توت، شاتوت و چمن)، بیش‌ترین بازده کلروفیل کل از برگ درخت شاتوت (692 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک) به‌دست آمد و سپس چمن حاوی بیش‌ترین میزان کلروفیل بود (435 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک). بنابراین، بازده بالای برگ شاتوت می‌تواند مقدمه‌ای برای مدیریت و جمع‌آوری این منبع مستعد جهت استخراج کلروفیل در سطح صنعتی باشد [22].

با توجه به اهمیت کلروفیل به‌عنوان رنگ سبز طبیعی در صنایع غذایی و ضرورت استفاده از افزودنی‌های طبیعی به جای انواع سنتزی به خاطر ایمنی و حتی اثرات سلامتی بخش آن‌ها، در این تحقیق، بهینه‌سازی اثر شدت توان فراصوت (100-10٪) نسبت حلال به ماده جامد (10-5 میلی‌لیتر بر گرم)، دما (70-2 درجه) و زمان (10-2 دقیقه) بر بازده کلروفیل کل و شاخص سبزی در برگ درخت شاتوت مورد بررسی قرار گرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های برگ شاتوت از باغ دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند و پس از شستشو، در آون با دمای 50 °C تا رسیدن به وزن ثابت (24 ساعت) خشک شدند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب تیغه‌ای پودر شده و از الک با مش 50 عبور داده شدند و تا زمان انجام آزمون، در نایلون در دمای اتاق نگه داری شدند. استون و اتانول با درجه آزمایشگاهی از شرکت دکتر مجللی خریداری شد [23].

2-2- بهینه‌سازی استخراج کلروفیل با استفاده از روش فراصوت

بهینه‌سازی استخراج کلروفیل از گیاه انتخابی در مرحله قبل با

جدول (1) متغیرهای مستقل و سطوح آن‌ها در طرح مرکب مرکزی

شدت توان فراصوت (%)	نسبت حلال به ماده جامد (ml/g)	زمان (min)	دما (°C)	سطوح فاکتورها
10	5:1	2	30	-1
55	1 : 7/5	6	50	0
100	10:1	10	70	+1

5-2- طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرایندها به کار می‌رود و پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند و امکان استخراج اطلاعات بیش‌تری از تحلیل این طرح نسبت به روش فاکتوریل وجود دارد [27]. روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) جهت ارزیابی ضرایب مدل انتخابی به کار گرفته شد و آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 انجام شد. جهت مقایسه بازده کلروفیل استخراجی با استفاده از دو روش متداول و فراصوت، آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان 95٪ انجام شد.

3- نتایج و بحث

3-1- بهینه‌سازی استخراج کلروفیل با استفاده از روش فراصوت

استخراج اولتراسوند یکی از روش‌های مناسب استخراج است که به دلیل کارایی بالا در مقایسه با روش‌های قدیمی استخراج، سبب کاهش مصرف انرژی و مصرف حلال می‌شود. از روش فراصوت به‌عنوان یک روش آزمایشگاهی برای استخراج مواد موثره گیاهی از قبیل ترکیبات فنلی و آنتوسیانینی [28]، آتاتو [29]، روغن، پروتئین و ترکیبات زیست فعال از گیاهان استفاده شده است [30]. مقادیر پاسخ‌ها (بازده کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و شاخص سبزی) تحت شرایط مختلف آزمون در جدول (2) مشاهده می‌گردد. با توجه به گستردگی نتایج و هم‌چنین روند مشابه کلروفیل‌های a و b با کلروفیل کل، تنها به تجزیه و تحلیل کلروفیل کل پرداخته شد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای بازده کلروفیل کل استخراجی از شاتوت در جدول شماره 3 نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دو برای بازده کلروفیل کل معنی‌دار بود و ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای آن 0/922 بود که بیانگر آن است که 92/2٪ تغییر در پاسخ‌ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. به عبارت

دیگر، تنها 7/8٪ تغییرات کل توسط مدل، قابل پیش‌بینی و توضیح نمی‌باشد. هم‌چنین ضریب تبیین اصلاحی ($R^2_{adj} = 0/86$) به ضریب تبیین نزدیک است که بیانگر وجود همبستگی بالا بین مقادیر آزمون و مقادیر پیش‌بینی شده است. آزمون عدم برازش (Lack of fit) بیانگر عدم موفقیت مدل جهت نشان دادن داده‌ها در نقاطی که در دامنه مدل رگرسیونی وجود ندارند، می‌باشد [31]. مطابق جدول (3)، عدم برازش معنی‌دار نبود. بنابراین همه نتایج حاکی از این بودند که مدل رگرسیونی خطی تحت شرایط مختلف دما، زمان و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی بازده کلروفیل کل را پیش‌بینی می‌کند.

آنالیز رگرسیون چندگانه (مدل درجه دوم) بر روی داده‌های آزمون انجام شد و معادله (2) برای پاسخ‌های پیش‌بینی شده بازده کلروفیل کل به صورت کدگذاری شده به‌دست آمد:

$$TCC = 455/12 - 82/45 X_1 + 17/20 X_2 + 15/47 X_3 + 44/32 X_4 - 11/75 X_1 X_2 - 5/84 X_1 X_3 - 29/88 X_1 X_4 + 14/58 X_2 X_3 + 18/35 X_2 X_4 + 9/47 X_3 X_4 + 30/93 X_1^2 - 26/88 X_2^2 + 9/44 X_3^2 - 1/62 X_4^2 \quad (2)$$

در این رابطه X_1, X_2, X_3 و X_4 به ترتیب کدهای دما، شدت توان فراصوت، زمان و نسبت حلال به ماده جامد می‌باشند. معنی‌داری هر پارامتر با شاخص p مشخص گردید. همان‌طور که در جدول (4) مشاهده می‌شود، اثر خطی متغیرهای X_1, X_2 و X_4 و اثر متقابل $X_1 X_4$ و $X_2 X_4$ به‌طور قابل توجهی بازده کلروفیل کل را تحت تاثیر قرار داد ($p < 0/05$) به طوری که افزایش نسبت حلال به ماده جامد و شدت فراصوت موجب افزایش بازده و افزایش دما موجب کاهش بازده استخراج کلروفیل شد که این مساله در شکل (2) (a-d) نیز قابل مشاهده است. همان‌طور که در معادله (1) مشاهده می‌شود، بزرگ‌ترین ضریب خطی مربوط به دما می‌باشد (82/45-) و در نتیجه افزایش دما اثر معکوسی بر بازده استخراج داشته است (مطابق شکل 2a و b) و از آنجایی که کلروفیل ترکیبی حساس به حرارت است، موجب تخریب کلروفیل شده است [32]. ون‌البه و شوارتز بیان کردند که فرایند حرارتی میوه‌ها و سبزیجات سبزرنگ منجر به حذف یون منیزیم و تشکیل مشتقات

جدول (2) شرایط آزمون با طرح مرکب مرکزی و نتایج استخراج کلروفیل از گیاه شاتوت

ردیف	دما (X_1)	شدت توان مصرفی (X_2)	زمان (X_3)	نسبت حلال به ماده جامد (X_4)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	a*
1	30	10	2	5	313	81/4	394/39	3/96
2	30	100	2	10	432	103	535	4/17
3	30	100	10	5	346	86	432	3/86
4	30	55	6	7/5	438/5	107	545/5	4/01
5	30	10	2	10	413	99	512/4	4/12
6	30	100	2	5	326	80/69	406/69	3/88
7	30	10	10	10	392	94	486	4/13
8	30	10	10	5	328/75	83/6	412/35	3/92
9	30	100	10	10	551	131/43	682/43	4/11
10	50	55	6	5	318	90/42	408/42	3/76
11	50	55	10	7/5	392	118/47	511/47	3/82
12	50	55	6	7/5	351	92	443	3/96
13	50	55	6	7/5	3	109	410	3/76
14	50	100	6	7/5	324	93	448	3/76
15	50	55	6	7/5	318	90	417/17	3/76
16	50	55	6	5	365	98	460	3/92
17	50	55	6	10	357	96	543/3	3/90
18	50	55	2	7/5	393	119	462/38	4/08
19	50	55	6	7/5	330	106	439	3/92
20	50	10	6	7/5	365	98	453/0	3/97
21	50	55	6	7/5	321	106	427	3/93
22	70	100	10	5	224	83	307	3/96
23	70	100	2	5	215	88	303	3/75
24	70	10	2	5	230	75	305	3/60
25	70	10	10	5	220	83	313	4/06
26	70	10	10	10	222/5	97	319/5	3/77
27	70	10	2	5	220	98/6	318/6	3/99
28	70	55	6	7/5	271	76	347	3/87
29	70	100	10	10	203	80/5	383/5	3/95
30	70	100	2	10	217	99	326	3/96

کلروفیل از قبیل فنوفیتین‌ها می‌شود و همین امر منجر به از دست رفتن رنگ سبز می‌گردد. پدram نیا و همکاران گزارش کردند که طی استخراج آنتوسیانین زرشک در دماهای پایین از دست رفتن رنگ سبز می‌شود و همین امر منجر به از دست رفتن رنگ سبز می‌گردد. پدram نیا و همکاران گزارش کردند که طی استخراج آنتوسیانین زرشک در دماهای پایین با استفاده از روش فراصوت، با افزایش دما تا 50 درجه بازده استخراج افزایش می‌یابد اگرچه دماهای بالاتر موجب تخریب آنتوسیانین می‌شود [33].

جدول (3) آنالیز واریانس مدل‌های مختلف برای بازده کلروفیل کل

منبع	جمع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	میزان F	میزان احتمال (P-Value)	R ²
میانگین	5/4×10 ⁶	1	5/4×10 ⁶			
مدل خطی	1/6×10 ⁵	4	41442	17/44	0/0001	0/736
مدل 2FI	27284	6	4547	2/69	0/0462	0/857
مدل درجه دوم	14642	4	3660	3/14	0/0461	0/922
مدل درجه سوم	7284	8	910	0/62	0/7383	0/955
باقی مانده	10199	7	1457			
کل	5/63×10 ⁶	30	1/87×10 ⁵			

جدول (4) آنالیز واریانس و معنی‌داری ضرایب رگرسیون در بهینه‌سازی استخراج کلروفیل به روش فراصوت

منبع	درجه آزادی	جمع مربعات	میانگین مربعات	F	p
مدل	14	2/08×10 ⁵	14835	12/73	*0/0001
X ₁	1	1/21×10 ⁵	1/21×10 ⁵	104	0/0001
X ₂	1	5568	5568	4/75	0/0451
X ₃	1	4241	4241	3/64	0/0639
X ₄	1	34740	34740	29/81	0/0001
X ₂ X ₁	1	2047	2047	1/76	0/1796
X ₃ X ₁	1	630	630	0/54	0/4949
X ₄ X ₁	1	14706	14706	12/62	0/0027
X ₂ X ₃	1	3198	3198	2/74	0/1012
X ₂ X ₄	1	5133	5133	4/40	0/0440
X ₃ X ₄	1	1569	1569	1/35	0/2745
2 X ₁	1	2342	2342	2/01	0/1565
2 X ₂	1	1755	1755	1/51	0/2145
2 X ₃	1	275	275	0/24	0/6554
2 X ₄	1	1/5	1/5	0/0001	0/9387
باقی مانده	15	17484	1166		
عدم برازش	10	16667	1666	10/21	**0/057
خطا	5	816	163		
کل	29	2/25×10 ⁵			

مدل در سطح 5٪ معنی‌دار است.
** عدم برازش در سطح 5٪ معنی‌دار نمی‌باشد.

مطابق جدول (4)، شدت توان فراصوت تاثیر معنی‌داری بر بازده کلروفیل داشت و با افزایش توان، بازده افزایش یافت. زو و همکاران مشاهده کردند که با افزایش توان فراصوت از 100 و 250 وات، بازده ملانین از 54 به 85 میلی‌گرم به ازای 100 گرم افزایش یافت [34]. افزایش بازده استخراج با استفاده از امواج فراصوت، عمدتاً به اثر کاویتاسیون (حفره زایی) صوتی ایجاد شده در حلال با عبور امواج فراصوت نسبت داده می‌شود و شدت اثر این امواج با افزایش توان فراصوت، افزایش پیدا

جامد 9/99 ml/g پیش‌بینی شد و تحت این شرایط میزان کلروفیل کل پیش‌بینی شده 650/50 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک به‌دست آمد. ارزش مدل با انجام آزمون تحت شرایط بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت و بازده 680/5 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک به‌دست آمد. بنابراین تنها انحراف 4/42 درصدی بین داده‌های آزمون و مقادیر پیش‌بینی شده وجود داشت و مدل با قدرت پیش‌بینی 95/48٪ تایید شد.

3-3- مقایسه تاثیر روش فراصوت و متداول بر بازده استخراج کلروفیل

همان‌طور که مشاهده شد، بهترین شرایط استخراج دمای $30/2^{\circ}\text{C}$ ، شدت توان 100٪، زمان 9/83 دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد 9/99 ml/g بود. بنابراین، این شرایط برای مقایسه با روش استخراج متداول (به عنوان نمونه کنترل) انتخاب شد. شرایط استخراج کنترل مشابه روش فراصوت بود با این تفاوت که امواج فراصوت اعمال نشد. برای این‌که دمای نمونه کنترل به 30°C برسد، دمای آب سیرکولاتور 35°C تنظیم گردید. مطابق شکل (2)، نتایج حاکی از آن بود که روش فراصوت در دمای 30 درجه نسبت به روش متداول، بازده کلروفیل را به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) افزایش داد. بازده استخراج کلروفیل با استفاده از روش متداول 495/65 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک بود که طی روش فراصوت به 680/5 میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک افزایش یافت. سیواکومار و همکاران مشاهده کردند که استفاده از روش فراصوت موجب افزایش قابل توجهی (حدود 80٪) در بازده استخراج رنگدانه چغندر در مقایسه با روش متداول شد [38]. نتایج هی و همکاران نیز حاکی از آن بود که بازده استخراج فنول و آنتوسیانین کل از زغال اخته با استفاده از روش فراصوت به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از روش متداول بود. میزان آنتوسیانین و فنول کل استخراجی طی روش فراصوت به ترتیب 2/5 و 3/2 برابر بیش‌تر از روش متداول بود. استخراج بیش‌تر ترکیبات طی روش فراصوت، به امواج فراصوت نسبت داده می‌شود که منجر به تشدید نفوذ حلال به نمونه می‌شود و سرعت انتقال جرم ترکیبات به حلال را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، فرایند فراصوت با شکستن دیواره سلولی گیاه، منجر به انتقال ترکیبات به حلال می‌شود [39].

می‌کند. فراصوت هم‌چنین یک اثر مکانیکی اعمال می‌کند و سطح تماس بین فاز جامد و مایع را افزایش می‌دهد و در نهایت موجب نفوذ بیش‌تر حلال به بافت نمونه می‌شود [35].

مطابق معادله (1)، بزرگ‌ترین ضریب مثبت (44/32+) مربوط به نسبت حلال به ماده جامد بود و بنابراین مهم‌ترین عامل معنی‌دار و افزایش دهنده بازده کلروفیل بوده است. بنابراین، همان‌طور که در شکل (2) (c و d) مشاهده می‌شود با افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بازده کلروفیل افزایش قابل توجهی پیدا کرده است. علت این امر را می‌توان افزایش نفوذ حلال آلی به ماتریس سلول‌های گیاهی و در نتیجه افزایش انحلال‌پذیری و استخراج ترکیب رنگی دانست [36]. یلمه و همکاران مشاهده کردند که با افزایش نسبت دانه آناتو به حلال طی استخراج با روش فراصوت، ابتدا میزان بازده استخراج رنگ آناتو افزایش یافت و سپس به علت اشباع شدن حلال، بازده کاهش یافت [29].

زمان استخراج تاثیر معنی‌داری بر بازده استخراج نداشت. واسموند و همکاران نیز مشاهده کردند که زمان استخراج در تاثیری بر بازده استخراج کلروفیل نداشت [37]. کنگ و همکاران مشاهده کردند که در یک دمای مشخص، با افزایش زمان فرایند فراصوت از 2 تا 79 دقیقه، بازده کلروفیل افزایش یافت و در زمان 79 دقیقه به اوج رسید ولی بعد از آن کاهش یافت زیرا در دماهای بالا و زمان طولانی، اکسیداسیون و تخریب کلروفیل صورت می‌پذیرد و موجب کاهش بازده می‌شود [23].

از میان مدل‌هایی که برای پیش‌بینی شاخص سبزی (a* Value) استفاده شده بود، تنها مدل خطی، معنی‌دار بود اما میزان ضریب تبیین نسبتاً کم بود ($R^2 = 0/78$) که حاکی از کیفیت پایین مدل برای پیش‌بینی است.

3-2- شرایط بهینه استخراج جهت بیشینه سازی بازده کلروفیل و ارزیابی شرایط بهینه

براساس نتایج مذکور، شرایط بهینه متغیرهای آزمون برای استخراج کلروفیل از شاتوت با استفاده از نرم‌افزار DesignExpert پیش‌بینی شد. راندمان بیشینه تحت شرایط دمای $30/2^{\circ}\text{C}$ ، شدت توان 100٪، زمان 9/83 دقیقه و نسبت حلال به ماده

روش فراصوت حاکی از آن بود که با افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بازده کلروفیل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. افزایش شدت توان فراصوت نیز موجب افزایش بازده شد. دمای بالا موجب تخریب کلروفیل شد و بیش‌ترین تاثیر منفی را بر بازده داشت. بازده بیشینه کلروفیل تحت شرایط دمای $30/2^{\circ}\text{C}$ ، شدت توان 100% ، زمان $9/83$ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد $9/99$ (میلی‌لیتر بر گرم) پیش‌بینی شد و تحت این شرایط میزان کلروفیل کل $680/50$ (میلی‌گرم به ازای 100 گرم ماده خشک) به‌دست آمد. مقایسه نتایج دو روش فراصوت و متداول حاکی از آن بود که روش فراصوت به‌طور قابل توجهی موجب افزایش بازده استخراج شد و این مساله از نظر اقتصادی بسیار مقرون به صرفه است.

از مزایای روش فراصوت نسبت به روش‌های متداول استخراج، افزایش بازدهی استخراج با حفره‌زایی است با این وجود که امکان کاهش دمای فرایند و استخراج ترکیبات حساس به حرارت وجود دارد و زمان فرایند نیز کوتاه‌تر می‌باشد [40]. از آنجایی که کلروفیل ترکیبی حساس (نسبت به حرارت، نور و اکسیژن) می‌باشد، می‌توان با افزایش بازده استخراج (یا به عبارت دیگر کاهش دما و زمان فرایند) با استفاده از فناوری‌های نوینی مانند فراصوت، موجب کاهش آسیب حرارتی به ترکیب زیست فعال شد.

4- نتیجه‌گیری

نتایج بهینه‌سازی استخراج کلروفیل از شاتوت با استفاده از

منابع

- طبیعی، بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران. دانشگاه شیراز.
- [7] Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*: CRC Press.
- [8] سحری، م. ع. (1381) شیمی ترکیبات رنگی (در مواد غذایی)، چاپ اول، انتشارات دانشمند، ص 23-44.
- [9] مومنی، ت. ک. (1378) کلروفیل و پایداری آن، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، سارنگ، 1-117.
- [10] Humphrey, A. (2004). Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J. Food Sci.*, 69, 422-425.
- [11] Hughes, J. H., Latner, A. L. (1936). Chlorophyll and haemoglobin regeneration after haemorrhage. *J. Physiol.*, 86, 388-395.
- [12] Sato, M., Fujimoto, I., Sakai, T., Kimura, R., Murata, T. (1979). An antioxidative component in the commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Yakugaku Zasshi*, 99, 1055-1057.
- [13] Sato, M., Imai, K., Kimura, R., Murata, T. (1984). Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondria [1] Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends Food Sci. Technol.*, 52, 1-15.
- [2] Gostner, J. M., Becker, K., Ueberall, F., Fuchs, D. (2015). The good and bad of antioxidant foods: An immunological perspective. *Food Chem. Toxicol.*, 80, 72-79.
- [3] Patakova, P. (2013). Monascus secondary metabolites: Production and biological activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40(2), 169-181.
- [4] Schoefs, B. t. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, 13(11), 361-371.
- [5] سازمان ملی استاندارد و تحقیقات صنعتی، 1392. افزودنی‌های خوراکی مجاز- رنگ‌های خوراکی- فهرست و ویژگی‌های عمومی. شماره 740. 66.
- [6] باقری، س. ل؛ رادی، م؛ امیری، ص. (1392) بررسی ساختار شیمیایی و پایداری کلروفیل به عنوان یک رنگیزه

- Song, H., Xia, C. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. *J. Food Sci. Tech.*, 51(9), 2006-2013.
- [24] Özkan, G., Bilek, S. E. (2015). Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food Chem.*, 176, 152-157.
- [25] Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, *Plant Physiol.*, 24, 1-16.
- [26] Saberian, H., Hamidi-Esfahani, Z., Abbasi, S. (2013). Effect of pasteurization and storage on bioactive components of Aloe vera gel. *Nutr. Food Sci.*, 43(2), 175-183.
- [27] Hill, W.J. Hunter, W.G. 1966. A review of response methodology: A literature survey, *Technometrics*, 8 (4), 571-510.
- [28] Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrason.Sonochem.*, 14(6), 767-778.
- [29] یلمه، م.؛ حبیبی نجفی، م. ب.؛ حسینی، ف.؛ فرهوش، ر. (1393) ارزیابی اثر ضدباکتریایی رنگ آناثو بر سالمونلا انتریتیدیس موجود در سس مایونز، *مجله علوم غذایی و تغذیه*، جلد 11، شماره 44، ص 17-22.
- [30] Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatography A*, 1125(2), 147-151.
- [31] Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X., Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bulletin*, 32, 16–722.
- [14] Humphrey, A. (1980). Chlorophyll. *Food Chem.*, 5, 57–67.
- [15] Wang, L. Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 300-312.
- [16] Annegowda, H., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A., Mansor, S. (2012). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *J. Food Sci. Tech.*, 49(4), 510-514
- [17] Tiwari, B., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P., O'Donnell, C. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason. Sonochem.*, 17(3), 598-604.
- [18] Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140(2), 315-322.
- [19] Rouhani, S., Alizadeh, N., Salimi, S., Hajj-Ghasemi, T. (2009). Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of *Curcuma Longa* L. *Extraction*, 6, 7.
- [20] Cuoco, G., Mathe, C., Archier, P., Chemat, F., Vieillescazes, C. (2009). A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection. *Ultrason. Sonochem.*, 16(1), 75-82.
- [21] Shirsath, S., Sonawane, S., Gogate, P. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status. *Chem. Eng. Process.: Process Intensif.*, 53, 10-23.
- [22] صابریان، ح.؛ حسینی، ف.؛ بلوریان، ش. (1396) بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ طبیعی کلروفیل از یونجه و بررسی ویژگی‌های کمی و کیفی آن در مقایسه با منابع گیاهی مختلف، *مجله علوم و صنایع غذایی (در نوبت چاپ)*.
- [23] Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S.,

and comparison with the conventional method. *Food Chem.*, 178, 106-114.

[32] Von Elbe, J., Schwartz, S. (1996). Carotenoids: Biology and treatment. *Food Chem.*, 10, 651-722.

[33] پدram نیا، ا؛ شریفی، ا؛ توکلی پور، ح. (1389) بهینه‌سازی فرایند استخراج آنتوسیانین زرشک در حضور امواج فراصوت، مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، شماره 4، ص 45-52.

[34] Zou, Y., Xie, C., Fan, G., Gu, Z., Han, Y. (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 11(4), 611-615.

[35] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem.*, 106(2), 804-810.

[36] Agarwal, P. C., Pruthi, J. S. (1968). A study of factors governing the recovery and quality of pectin from fresh mandarin orange waste (peel and pomace). *Indian Food Packer*; 22(3), 5-9.

[37] Wasmund, N., Topp, I., Schories, D. (2006) Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia*, 48, 125-144.

[38] Sivakumar, V., Anna, J. L., Vijayeeswarri, J., Swaminathan, G. (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrason. Sonochem.*, 16(6), 782-789.

[39] He, B., Zhang, L.-L., Yue, X.-Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.-L., Yue, P.-X. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem.*, 204, 70-76.

[40] خواجه نوری، م؛ حقیقی اصل، ع. (1393) بررسی استخراج ترکیبات طبیعی گیاهان با کمک امواج میکروویو و فراصوت، مجله فناوری‌های نوین غذایی، جلد 1، شماره 3، ص 81-91.