Archive of SID

مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۰ شماره ۳/ سال ۱۳۹۹/ صفحات ۱۹ تا ۳۱

ارزیابی کیفیت بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا فیلیکوئیدس(*Azolla filiculoides*) تالاب انزلی به روش هیدرولیز قلیایی در فصل زمستان

مینا سیف زاده*[۱]

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۸

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

*مسئول مکاتبه :Email: m_ seifzadeh_ld@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: بتاکاروتن پیش‌نیاز ویتامین A و از افزودنی‌های غذایی است. بتاکاروتن در صنعت از طریق سنتز شیمیایی از β-ionone تهیه می‌شود. این رنگ از ترکیبات سنتتیک هست، که می‌تواند به آسانی از طریق مواد غذایی به مصرف‌کنندگان منتقل شود. بنابراین تحقیق در زمینه تهیه رنگ‌های طبیعی برای کاربرد در صنعت غذایی از اهمیت خاصی برخوردار است. **هدف**: این پروژه باهدف تعیین مقدار، کیفیت، درصد خلوص بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولای تالاب انزلی در فصل زمستان و مقایسه آن با نوع سنتتیک انجام شد. روش‌ها : برای اجرای این پروژه یک تیمار شامل بتا کاروتن استخراج‌شده به روش هیدرولیز قلیایی از آزولای تالاب انزلی در فصل زمستان سال ۱۳۹۳در نظر گرفته شد. تیمارها به مدت یک سال در دمای پنج درجه سلسیوس نگهداری شدند. از بتاکاروتن سنتتیک به‌عنوان شاهد استفاده شد. کیفیت تیمارها با استفاده از آزمایش‌های شیمیایی شامل تعیین مقدار و کیفیت بتاکاروتن، رنگ‌سنجی (هانترلب)، درصد خلوص و ویتامین A به‌وسیله HPLC، زمان ماندگاری و حلالیت بتاکاروتن طبیعی بررسی شد. **نتایج**: در نتایج آزمایش‌های شامل درصد خلوص، غلظت، رنگ‌سنجی، ترکیبات ویتامینه، حلالیت و زمان ماندگاری در بتاکاروتن آزمایشی در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵). طی زمان ماندگاری این فاکتورها در تیمارهای آزمایشی و شاهد تفاوت معنی‌دار نشان ندادند (P>۰/۰۵). بتاکاروتن طبیعی طی زمان نگهداری به مدت یک سال در دمای ۵ درجه سلسیوس از کیفیت مطلوبی برخوردار بود. **نتیجه‌گیری نهایی**: با توجه به عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا در مقایسه با نوع سنتتیک از حیث آزمایش‌های شیمیایی، خلوص، زمان ماندگاری و ارجحیت بتاکاروتن طبیعی استخراج‌شده از آزولا در مقایسه با نوع سنتتیک از حیث بهداشت مواد غذایی می‌توان کاربرد بتاکاروتن طبیعی تهیه‌شده از آزولا را به‌جای بتا کاروتن سنتتیک در صنعت غذایی پیشنهاد کرد.

واژگان کلیدی: آزولا، رنگدانه‌های طبیعی، بتاکاروتن، افزودنی غذایی، تالاب انزلی

مقدمه

بتاکاروتن یک نوع ترکیب آلی آلکنی و رنگدانه طبیعی با طیف رنگی زرد تا قرمز است و در بسیاری از گیاهان سبز، برخی از جلبک‌ها و ریزسازوارهای فتوسنتز کننده یافت می‌شود. امروزه بتاکاروتن به‌عنوان یک رنگ طبیعی به‌طور وسیعی در فرآورده‌های غذایی، لوازم آرایشی، غذای دام و طیور مورداستفاده قرار می‌گیرد. به‌علاوه این ماده هم یک آنتی‌اکسیدان قوی بوده و هم به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A در انسان و حیوانات به

www.SID.ir

Archive of SID

کار می‌رود (دیاس ریبریو و همکاران ۲۰۱۱، زاکینتینوس و ورزاکس ۲۰۱۶، اصدق و همکاران ۱۳۹۹). وجود خواص و فواید فراوان علاقه‌مندی زیادی جهت تولید صنعتی این ماده فراهم کرده است. این نوع بتاکاروتن تجزیه‌پذیر بوده و در بسیاری از گیاهان ازجمله آزولا وجود دارد (مک‌دوگول ۲۰۰۲). افزودنی‌های غذایی از قبیل رنگ دهنده‌های طبیعی مواد مفیدی هستند که امروزه از آن‌ها به‌منظور بهبود کیفیت، ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و رفع مشکلات تکنولوژیکی تولید مواد غذایی استفاده می‌شود. رنگ غذایی یا افزودنی رنگ را می‌توان به‌عنوان هر نوع رنگ، رنگ‌دانه یا ماده‌ای که سبب بهبود کیفیت و ظاهر غذاهای عمل‌آوری شده یا تازه می‌شود، تعریف کرد. تجربه ثابت نموده است که مصرف‌کنندگان به رنگ مواد غذایی حساس بوده و رنگ باکیفیت و ویژگی‌های حسی رابطه‌ی مستقیم دارد (استاهل و همکاران ۲۰۰۸). با توجه به این‌که مصرف‌کننده ابتدا کیفیت هر نوع ماده غذایی را به‌وسیله‌ی رنگ آن ارزیابی می‌نماید، رنگ را می‌توان به‌عنوان فاکتوری که نشان‌دهنده کیفیت مواد غذایی بوده و کیفیت خوب و یا بد مواد غذایی را نشان می‌دهد، مطرح کرد. به‌موازات طعم و مزه، شکل و اندازه این فاکتور یکی از مهم‌ترین خصوصیات حسی مواد غذایی را تشکیل می‌دهد. بنابراین رنگ یکی از بهترین مشخصه‌های کیفی ماده‌ی غذایی بوده و در افزودنی‌های مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ترکیبات رنگی طبیعی از منابع گیاهی مانند میوه‌ها، سبزی‌ها، دانه‌ها و ریشه‌های گیاهان استخراج می‌شود. این رنگ‌ها، رنگ‌های گیاهی نیز نامیده شده‌اند. ما در غذاهای روزانه مقادیر زیادی از رنگ‌دانه‌های طبیعی به‌خصوص آنتوسیانین، کاروتنوئید و کلروفیل را مصرف می‌کنیم (ویلچز و همکاران ۲۰۱۱). اما، جذب این مواد از طریق مواد غذایی فرآوری شده بارنگ‌های طبیعی حائز اهمیت است. همچنین رنگ‌ها در مواد غیر غذایی مانند دارویی، لوازم‌آرایشی و دستگاه‌های پزشکی نیز استفاده می‌شوند (برانن و همکاران ۲۰۰۱، هاپکینز ۲۰۰۶، مصطفی و ابراهیم ۲۰۱۲).

رنگ‌های مصنوعی مواد رنگی هستند که درنتیجه سنتز مواد آلی به دست می‌آیند و دامنه کاربرد آن‌ها نامحدود بوده و در صنایع مختلفی مانند غذایی و غیره کاربرد دارند. با نظر به اهمیت روزافزون این ترکیبات و مصرف بالای افزودنی‌ها در واحدهای صنعتی جهان تحقیقات زیادی در مورداستفاده از این رنگ‌ها انجام شد. نتایج این تحقیقات نشان داد که رنگ‌های سنتتیک فاقد ارزش غذایی بوده و بسیاری از رنگ‌های مصنوعی ازنظر مصرف در غذای انسان قابل‌قبول نبوده و عامل ایجادکننده اختلالاتی از قبیل آسم، کهیر، واکنش‌های آنافیلاکتیک، اختلال در خواب، ایجاد فشارخون، آلرژی، کاهش سطح ویتامین‌ها، سرطان‌زایی، اختلالات کبدی، تومورهای بدخیم، اختلال در فرایندهای مغزی مانند قدرت یادگیری و رفتار به‌ویژه در کودکان و نوجوانان، کاهش ضریب هوشی کودکان و بروز پیش فعالی در کودکان هستند (اکرمی و همکاران ۱۳۹۵، ریمبای و همکاران ۲۰۰۸). علاوه بر این، این رنگ‌ها سبب تجمع مواد سنتتیک در مواد غذایی، عوارض ناشی از انتقال آن به انسان و تأثیر آن بر سلامت انسان و تضعیف سیستم ایمنی می‌باشند. با توجه به مشکلات فراوان حاصل از مصرف رنگ‌های مصنوعی، اخیراً محدودیت‌های بسیاری از جانب سازمان‌های بین‌المللی و انستیتوهای تحقیقاتی در مورداستفاده از این رنگ‌ها وضع‌شده است. لذا در سطح جهانی مطالعه و جستجو برای یافتن پیگمان‌های طبیعی مناسب به‌عنوان رنگ افزودنی آغاز شد. پیگمان‌های طبیعی اثرات سوء ذکر شده برای رنگ‌های مصنوعی را نداشته و در تحقیقات مختلف تأثیرات مثبت آن‌ها بر سلامت عمومی به‌دفعات مورد تائید قرارگرفته است (کایوانو و بیورا ۲۰۱۲، هایگورا سایپارا و همکاران ۲۰۰۶).

قرار گرفتن در معرض نور خورشید منجر به تجمع نسخه‌هایی از پروتئین‌های متعلق به خانواده پروتئین‌های القاءپذیر تحت تأثیر نور بالا در سیانوباکتری‌ها می‌شود. علاوه بر سیانوباکتری‌ها این پروتئین‌ها در گیاهان نیز وجود داشته و شامل پروتئین‌های متصل به کلروفیل a/b۱ گیاهی و پروتئین‌های اولیه القاء پذیر به نور هستند. با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

این‌که کاروتنوئیدها از ترکیبات وابسته به کلروفیل و این پروتئین‌ها هستند قرار گرفتن در معرض نور خورشید می‌تواند ساخته‌شدن این پروتئین‌ها و بتاکاروتن را در گیاه تحریک کند. علاوه بر نور خورشید رسیدن نور ماورای بنفش به گیاهان به دلیل پارگی لایه ازون نیز سبب تحریک ساخته‌شدن این پروتئین‌ها و بتاکاروتن می‌شود (اسچیبر و کارلی ۲۰۰۵ ، آگوستیانو و همکاران ۲۰۰۳).

سنتز بتاکاروتن در فصل زمستان به دلیل مناسب بودن دما (زیر ۳۰ درجه سلسیوس) برای سنتز لیکوپن و نور خورشید می‌باشد (پراسانا ۲۰۰۴، هوتچینگز ۲۰۰۳). لیکوپن به‌عنوان پیش‌نیاز سنتز بتاکاروتن هست (هاکت و همکاران ۲۰۰۲). علاوه بر این تولید بتاکاروتن تحت تأثیر مراحل بلوغ برگ‌های گیاه بوده به‌طوری‌که در فصل زمستان در برگ‌های نابالغ مقدار سنتز بتا کاروتن نسبتاً بالا می‌باشد (ونوگوپال ۲۰۰۶).

آزولا علاوه بر این که از پروتئین غنی بوده دارای چربی و کلسترول کم و برای غذای ورزشکاران و بدن-سازان به عنوان منبع عالی برای کنترل و کاهش وزن است. آزولا دارای موادی است که به بالانس قند در بدن کمک می‌کند. این گیاه به عنوان مکمل غذایی پروتئینی و رژیمی برای اقشار مختلف جامعه و در تمام سنین کاربرد دارد. پودر تهیه شده از آزولا به عنوان چاشنی غذایی در تهیه انواع غذاها در آشپزخانه‌ها نیز قابل استفاده است. علاوه بر این، آزولا دارای آنتی‌اکسیدان بتاکاروتن می‌باشد. این خاصیت آزولا سبب می‌شود که این پودر علاوه بر جنبه غذایی و دارا بودن ارزش غذایی، ارزش دارویی نیز داشته باشد و در برنامه غذایی بیماران گنجانده شود. آزولا به دلیل توقف اشتها و افزایش مصرف انرژی به عنوان غذای رژیمی محسوب شده است (لژون و همکاران ۲۰۰۰).

این پروژه باهدف تعیین مقدار، کیفیت، درصد خلوص رنگ‌دانه، مقایسه با نوع طبیعی آن (سیگما) و بررسی ارزش اقتصادی بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولای تالاب انزلی انجام شد

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

آزولا در فصل زمستان ۱۳۹۳ نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری آزولا فیلیکوئیدس[1] استفاده از تور مخروطی و در غرب تالاب انزلی با مختصات جغرافیایی ۳۷ درجه و ۲۸ دقیقه عرض شمالی و ۴۹ درجه ۲۵ دقیقه طول شرقی انجام شد.

برای تهیه بتاکاروتن از آزولا **از** آون خشک (Memert/آلمان)، هیتر (چین/Dragon lab) و سوکسله (Behr-AK5/ آلمان)، HPLC(آمریکا Shimadzu/ Model:SCL-10Avp) و آسیاب برقی (مولینکس فرانسه) استفاده شد.

بتاکاروتن از آزولا به روش هیدرولیز قلیایی (هوسوتانی ۲۰۰۱) استخراج شد. از ترکیبات سود، آسکوربات سدیم، پترولیوم‌اتر، ان‌هگزان، سولفات سدیم، استونیتریل، متانول، متیل استات برای عمل آوری بتاکاروتن از آزولا استفاده شد. کلیه ترکیبات شیمیایی استفاده شده برای تهیه بتاکاروتن مرک بودند.

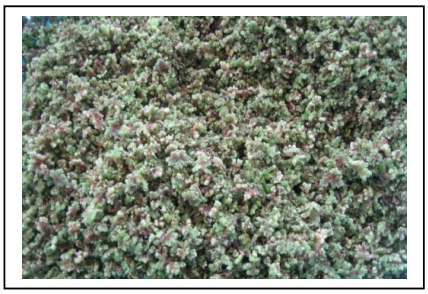
آماده‌سازی نمونه

آزولا بعد از برداشت تصادفی از تالاب انزلی با آب شیرین جهت حذف اپی‌فیت‌ها، رسوب و مواد آلی شستشو شد. سپس قسمت‌های خوراکی آن جمع‌آوری‌شده و دوباره با آب بهداشتی شهر کاملاً شسته شد (شکل ۱). سپس آزولا توسط آون و دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد. از قسمت‌های خوراکی آزولا (ساقه و برگ) برای استخراج بتاکاروتن استفاده شد. میزان این قسمت‌ها در یک کیلوگرم آزولا اندازه‌گیری گردید. سپس این قسمت‌های خوراکی خشک‌شده و مقدار آزولای خشک به‌دست‌آمده از یک کیلوگرم آزولای تر در وزن خشک نیز محاسبه شد. سپس با تنظیف خشک‌شده و برای استخراج بتاکاروتن استفاده شد.

[1] *Azolla filiculoides*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- برگ خوراکی آزولا
Fig 1- Edible leaves of *Azola*

استخراج بتاکاروتن

برای اجرای این پروژه یک تیمار و یک شاهد در نظر گرفته شد. تیمار آزمایشی شامل بتاکاروتن استخراج‌شده از گونه وحشی آزولا بود. پنج گرم از پودر خشک‌شده با ۲۵ میلی‌لیتر سود یک مولار مخلوط شد. مخلوط فوق با استفاده از استایر هموژنه شد. بعد از خنک شدن آسکوربات سدیم به مقدار ۵۰۰ پی‌پی‌ام به آن افزوده شد. سپس رنگ‌دانه طی مدت‌زمان ۳ ساعت در یک دستگاه سوکسله با حلال (۱۰۰ میلی‌لیتر پترولیوم‌اتر و ان‌هگزان به نسبت ۵۰:۵۰) استخراج شد. رنگ‌دانه به‌دست‌آمده با استفاده از فاز جامد روی ستون ODS خالص شد. سپس نمونه شسته شده و حلال (۱۰۰ میلی‌لیتر پترولیوم‌اتر و ان‌هگزان به نسبت ۵۰:۵۰) جدا شد. نمونه تهیه‌شده در شیشه‌های در پیچ‌دار ۲۵۰ میلی‌لیتری تیره‌رنگ به مدت یک سال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

برای ارزیابی کیفیت عصاره نهایی درصد خلوص از آزمایش‌های HPLC (تزریق ۱ میلی‌لیتر از مایع فیلتر شده با استفاده از سرنگ میکرولیتری به HPLC Reversed phase) (خلیل و وارانیس ۱۹۹۶) با طول‌موج ۴۶۰ نانومتر، رنگ‌سنجی (میزان ماده رنگی) با استفاده از دستگاه هانترلب مدل Colorflex ساخت آمریکا، تعیین ترکیبات ویتامینه به روش HPLC(انجمن متخصصان شیمی تجزیه شماره ۹۴۱/۱۵ ۱۹۶۰)، حلالیت و مقایسه زمان نگهداری عصاره به‌دست‌آمده بازمان نگهداری نمونه شاهد (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۰ ۱۳۹۲) استفاده گردید.

فرکشن

شرایط کروماتوگرافی برنامه Perkin Elmer از HPLC شامل LC-1000 pump دارای ستون استیل بی‌رنگ ODS بر پایه سیلیکا (YMC-Triart C18)، C18 پلیمری با سایز ذره ۵ میکرومتر، سایز سوراخ ۱۲۰ آنگستروم، تیمار شده با سیلانول، مقدار کربن ۲۰ درصد و طول ۲۵۰ میلی‌متر در I.D ۴ میلی‌متر استفاده شد. و به تعیین‌کننده LC 250 UV/VIS متصل شد. شناسایی پیک‌ها توسط نرم‌افزار CSW32 و سیستم HPLC (Shimadzu SCL-10Avp) انجام شد (های و همکاران ۲۰۰۶، مولر ۱۹۹۷). در این دستگاه برای اندازه‌گیری بتاکاروتن از فاز متحرک استونیتریل- متانول- اتیل استات (۸۸:۱۰:۲)، نسبت جریان ۱ میلی‌متر بر دقیقه و طول‌موج ۲۵۰ نانومتر استفاده شد.

از رنگ بتاکاروتن استاندارد شرکت سیگما آلدریچ به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد.

تعیین ارزش غذایی آزولا

قبل از استخراج بتاکاروتن آزولا از حیث ارزش غذایی شامل پروتئین (استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۴ ۱۳۷۲)، چربی (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۲ ۱۳۸۲)، رطوبت (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۵ ۱۳۵۰)، خاکستر (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴ ۱۳۸۱)، پی‌اچ (استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۲۸ ۱۳۸۶) و پر اکسید (استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳ ۱۳۸۳) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین آزولا ازنظر تعیین وزن خشک بیوماس نیز ارزیابی شد.

[1] Octadecyl-silica

www.SID.ir

Archive of SID

داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش‌های رنگ‌سنجی و شیمیایی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون T. test جهت مقایسه نمونه‌های آزمایشی و شاهد مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. همچنین تغییرات فاکتورهای موردبررسی طی زمان نگهداری با استفاده از همین نرم‌افزار و آزمون آماری آنالیز واریانس دوطرفه موردبررسی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج شیمیایی

جدول ۱ - آنالیز بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا به روش هیدرولیز قلیایی در زمان‌های صفر، شش ماه و یک سال بعد از تولید طی مدت‌زمان نگهداری در دمای ۵ درجه سلسیوس(Mean±SD)

Table 1 - Analysis of β-carotene extracted from *Azolla* by alkaline hydrolysis at 0, 6 and 12 months after production during storage at 5 °C (Mean±SD)

Index	β-carotene (µg/100g)		Purity		Solubility	
Treatment	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
Sampling time						
Zero time	11862 ± 24.51aA	11245 ± 16.83aA	99 ± 1.41aA	98.46±1.23aA	Soluble	Soluble
Six months	11862 ± 33.42a	11245 ± 18.49a	99 ± 2.54a	98.46 ± 1.89a	Soluble	Soluble
One year	11862 ± 26.86a	11245 ±19.32a	99 ± 2.76a	98.46 ± 2.34a	Soluble	Soluble

The same letters in the same column and row show no significant difference (P> 0.05)

بتاکاروتن طبیعی و سنتتیک در آب کاملاً محلول بودند. فاکتورهای حلالیت، درصد خلوص و مدت‌زمان ماندگاری در بتا کاروتن طبیعی در مقایسه با سنتتیک تفاوت معنی‌دار نشان ندادند(P>۰/۰۵). این فاکتورها طی مدت‌زمان نگهداری به مدت یک سال در دمای ۵ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌دار نشان ندادند(P>۰/۰۵).

بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا ازنظر رنگی روشن (محدوده L) بود. بتاکاروتن سنتتیک ازنظر رنگی روشن (محدوده L) بود.

نتایج حسی

جدول ۲ - نتایج آزمایش رنگ‌سنجی بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا به روش هیدرولیز قلیایی در زمان‌های صفر، شش و دوازده ماه بعد از تولید (Mean±SD)

Table 2 - Results of color measurement of β-carotene extracted from *Azolla* using alkaline hydrolysis in zero, six and twelve months after production (Mean±SD)

Sample	Control			β-carotene extracted from *Azolla*		
Color spectrum	B (Blue - Yellow)	A (Red-yellow)	L (Clarity)	B (Blue - Yellow)	A (Red-yellow)	L (Clarity)
Zero time	1.11 ± 0.18aA	1.05±0.59aA	95.75± 3.26aA	1.13± 2.65aA	1.12± 1.42aA	95.74 ± 3.69aA
Six monthes	1.12 ±0.35a	1.12±0.37a	95.74± 4.11a	1.16± 3.14a	1.14±2.76a	95.74 ± 1.45a
One year	1.16 ± 0.46a	1.15±0.45a	95.71± 2.98a	1.17± 4.28a	1.17±1.24a	95.74 ± 2.47a

The same letters in the same column and row show no significant difference (P> 0.05)

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج ارزش غذایی

جدول ۳ - نتایج ویتامین A در بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا به روش هیدرولیز قلیایی در فصل زمستان(Mean±SD)

Table 3 - Results vitamin A in β-carotene extracted from *Azolla* by alkaline hydrolysis method in winter (Mean± SD)

Factor	Vitamin A (µg/100g)	
Treatment	Control	Experimental
Sampling time		
Zero time	11862± 35.16aA	11855± 25.6aA
Six monthes	11862± 32.11a	11855± 31.17a
One year	11862± 29.18a	11855±28.19a

The same letters in the same column and row show no significant difference (P> 0.05)

ترکیبات ویتامینه (ویتامین A) در بتا کاروتن طبیعی در مقایسه با سنتتیک تفاوت معنی‌دار نشان نداد(P>۰/۰۵). این فاکتور طی مدت‌زمان نگهداری به مدت یک سال در دمای ۵ درجه سلسیوس تفاوت معنی‌دار نشان ندادند(P>۰/۰۵).

جدول ۴- نتایج ارزش غذایی آزولای تالاب انزلی در فصل زمستان (درصد بر حسب وزن تر) (Mean±SD)

Table 4 - Results of nutritional Value of *Azolla* from Anzali wetland in winter (%) (Mean±SD)

Index	Dry weight	Ash	Fat	Moisture	Protein
Fresh *Azolla*	68.13 ± 1.76	24.46 ± 1.43	18.60± 2.98	33.95± 2.51	22.99 ± 2.76

بحث و نتیجه‌گیری

همانطوری که جدول ۱ نشان می‌دهد مقدار بتاکاروتن در تیمار آزمایشی ۹۹۳۵ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم بود. مقدار بتا کاروتن تهیه‌شده از آزولا در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده توسط لژون و همکاران در سال ۲۰۰۰ کاهش نشان داد که تحت تأثیر استفاده از تیمار حرارتی برای خشک‌کردن آزولا در مقایسه با آزولای تر و همچنین شرایط مختلف پرورش آزولا می‌باشد. مقدار بتاکاروتن در تحقیق حاضر در مقایسه با تحقیق انجام‌شده توسط رضوی و همکاران در سال ۱۳۸۴ مطابقت داشت. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده توسط زارع و کیانی‌راد در سال ۱۳۸۳ مطابقت دارد که به دلیل شرایط هوادهی یکسان و نقش هوا برای تولید بتاکاروتن در آزولای وحشی و رشد یافته در شرایط هوای آزاد و کپک *Blakeslea trispora* رشد کرده در شرایط هوادهی زیاد بود. نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری بتاکاروتن در این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده توسط ونوگوپال و همکاران در سال ۲۰۰۶ از *Azolla anabaena* مطابقت نداشت که به دلیل استفاده از ترکیبات قندی برای پرورش آزولا بود. نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری بتاکاروتن در این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده توسط بایگان و همکاران در سال ۱۳۸۸ از جلبک دونالیلا سالینا نیز مطابقت ندارد که تحت تأثیر استفاده از ترکیبات تنش‌زا برای افزایش تولید بتاکاروتن توسط جلبک می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده توسط مقدسی در سال ۱۳۹۰ مطابقت ندارد که تحت تأثیر کاربرد استرس شوری بر تولید بتاکاروتن می‌باشد.

کاربرد تیمار حرارتی ملایم استفاده‌شده برای خشک‌کردن آزولا سبب تخریب آنزیم‌های ماده غذایی، تسهیل در آزاد شدن و حلالیت کاروتنوئیدها شده و درنهایت منجر به افزایش دسترسی به این ترکیب می‌شود. هموژناسیون استفاده‌شده برای استخراج بتاکاروتن نیز سبب افزایش دسترسی به بتا کاروتن می‌شود (یمینی و همکاران ۲۰۰۱، نگی و روی ۲۰۰۰). علاوه بر این، استفاده از مواد قلیایی سبب هیدرولیز و

www.SID.ir

Archive of SID

تخریب ماتریکس بافت‌های گیاهی، حذف دیواره و غشای سلولی و درنتیجه آزاد شدن بتاکاروتن می‌شود (کاسما و همکاران ۲۰۰۸، کروماتوگر ۲۰۰۳، آگته ۲۰۰۰). اعمال استفاده‌شده برای عمل‌آوری سبب ناپایداری میکرونوترینت‌های ماده غذایی نشده و نمی‌توانند در مقدار بتاکاروتن طی مدت‌زمان ماندگاری در دمای ۵ درجه سلسیوس تغییر ایجاد کنند. علاوه بر این نگهداری در شیشه‌های تیره‌رنگ، عدم وجود اکسیژن و استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان برای عمل‌آوری نیز از عوامل مؤثر در پایداری بتاکاروتن طی مدت‌زمان نگهداری می‌باشند (آمایا ۲۰۰۱). مقدار رطوبت متوسط موجود در پودر آزولا علیرغم این‌که برای واکنش‌های غیر آنزیماتیک قهوه‌ای شدن مناسب بوده می‌تواند سبب حفاظت کاروتنوئیدها از اکسیداسیون لیپیدها شود. در دمای پائین استفاده‌شده برای خشک‌کردن مانند۵۰ درجه سلسیوس اکثر کاروتنوئیدها پایدار بوده و ایزومریزاسیون بتاکاروتن طی پروسه خشک‌کردن اتفاق نمی‌افتد (آنجوم و همکاران ۲۰۰۸، سینار ۲۰۰۴).

با توجه به جدول ۱ مقدار بتاکاروتن در آزولا فیلیکوئیدس در مقایسه با گونه‌های دیگر آزولای پرورش‌یافته در سایر نقاط دنیا تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$) که تحت تأثیر ژنوتیپ، تغییرات آب و هوایی، شرایط رشد و مراحل بلوغ برگ‌های گیاه آزولا می‌باشد (آنگولووا و وارهسن ۲۰۰۰).

با توجه به جداول ۱ و ۲ درصد خلوص، غلظت رنگ و حلالیت در تیمار عمل‌آوری شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). طی مدت‌زمان ماندگاری یک‌ساله در دمای ۵ درجه سلسیوس این فاکتورها در تیمارهای آزمایشی و شاهد تفاوت معنی‌دار نشان ندادند($P<۰/۰۵$). که تحت تأثیر حالت فیزیکی، حذف لیپیدها و رنگ‌دانه‌های جانبی مانند کلروفیل در بتا کاروتن استخراج‌شده از آزولا به دلیل استفاده از ترکیبات قلیایی بود (آلکاینو و همکاران ۲۰۰۸، دنتوتو و همکاران ۲۰۰۷، بندیچ ۲۰۰۴، چاولا ۲۰۰۲). حذف کامل دیواره سلولی و تخریب بافت‌های گیاهی نیز بر آزاد شدن کامل بتاکاروتن از بافت‌های گیاهی مؤثر می‌باشد. آزاد شدن کامل بتاکاروتن از بافت‌های گیاهی سبب افزایش غلظت بتاکاروتن شده که درنهایت منجر به افزایش درصد رنگ‌سنجی توسط هانترلب شد. عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در نمونه آزمایشی طی مدت‌زمان ماندگاری را می‌توان به کاربرد آنتی‌اکسیدان در ترکیب بتاکاروتن و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی بتاکاروتن ارتباط داد. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده توسط ونوگوپال و همکاران در سال ۲۰۰۶ از *Azolla anabaena* مطابقت ندارد که به دلیل تأثیر سیکل‌های ذوب و انجماد و استفاده از استن ۸۵٪ برای استخراج بتاکاروتن در مقایسه با هیدرولیز قلیایی برای شکستن دیواره سلولی و آزاد شدن رنگ‌دانه و استفاده از حلال‌های آلی مانند پترولیوم‌اتر و ان‌هگزان می‌باشد.

رنگ‌دانه طبیعی بتاکاروتن صرفاً از حیث قابلیت تبدیل به ویتامین A دارای ارزش غذایی می‌باشد. بر اساس جدول ۳ نتایج حاصل از اندازه‌گیری ویتامین A در تیمار آزمایشی از غلظت بالایی برخوردار بود. این فاکتور در مقایسه با نمونه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان نداد($P>۰/۰۵$). در نتایج این آزمایش در تیمار آزمایشی در مقایسه با شاهد طی مدت‌زمان نگهداری تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد($P<۰/۰۵$). نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده توسط مرکاندیت و آمایا در سال ۱۹۹۰ مطابقت دارد. مقدار ویتامین A در بتاکاروتن استخراج‌شده از آزولا تحت تأثیر غلظت و افزایش مقدار کاروتنوئیدها و با توجه به این‌که در اثر شکستن بتاکاروتن دو مولکول ویتامین A تولید می‌شود و ۱۰۰ درصد بتا کاروتن قابلیت تبدیل به ویتامین A را دارد (میلر و همکاران ۲۰۱۳، آلکاینو و همکاران ۲۰۰۸، دنتوتو و همکاران ۲۰۰۷). افزایش مقادیر و غلظت بتاکاروتن در تیمار هیدرولیز قلیایی منجر به افزایش ترکیبات ویتامینه در این تیمار شد (انجمن متخصصان شیمی تجزیه شماره ۹۴۱/۱۵ ۱۹۶۰). عدم وجود تفاوت معنی‌دار در مقدار این ویتامین طی مدت‌زمان نگهداری تحت تأثیر شرایط نگهداری در دمای پائین و استفاده از ظروف تیره‌رنگ برای بسته‌بندی بتاکاروتن می‌باشد (چاولا ۲۰۰۲).

www.SID.ir

Archive of SID

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از جدول ۴ آزولا علاوه بر دارا بودن مقدار زیاد رطوبت، ترکیب غنی از پروتئین، چربی و خاکستر بوده، بنابراین دارای ارزش غذایی بالا و برای کاربرد به عنوان ماده اولیه برای تهیه ترکیبات باارزش افزوده مناسب به نظر می‌رسد.

زارع و کیانی‌راد در سال ۱۳۸۳ استخراج مقدار برابر بتاکاروتن را از کپک *Blakeslea trispora* در مقایسه با تحقیق حاضر گزارش کردند که تحت تأثیر کاربرد هوای زیاد برای رشد کپک در مقایسه با شرایط رشد آزولا در هوای محیط بود.

رضوی و همکاران در سال ۱۳۸۴ برای استخراج کاروتنوئیدها از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus H110* نتایج مشابهی را در مقایسه با تحقیق حاضر گزارش کردند که می‌توان آن را به دلیل تأثیر یکسان روش سایشی در مقایسه با ترکیبات قلیایی برای استخراج بتاکاروتن دانست.

بایگان و همکاران در سال ۱۳۸۸ مقدار بیشتری از بتاکاروتن را هنگام استخراج از جلبک دونالینا سالینا در مقایسه با تحقیق حاضر گزارش کردند که تحت تأثیر زمان کشت جلبک و استفاده از ترکیبات تنش‌زا بود.

مقدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ مقدار بیشتری از بتاکاروتن را از عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا گزارش کردند که به دلیل کاربرد استرس شوری برای پرورش جلبک، نوع ماده اولیه برای استخراج بتاکاروتن و نیز تأثیر روش استخراج می‌باشد.

لژون و همکاران در سال ۲۰۰۰ محدوده‌ای از ۲۰۶ تا ۶۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک بتاکاروتن را از آزولا در شرایط پرورشی (خواب و گلخانه‌ای) گزارش کردند. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد که به دلیل خشک‌کردن آزولا در مدت‌زمان طولانی‌تری در مقایسه با تحقیق حاضر می‌باشد.

ونوگوپال و همکاران در سال ۲۰۰۶ استخراج مقدار بیشتری بتا کاروتن از *Azolla anabaena* را در مقایسه با تحقیق حاضر گزارش کردند که تحت تأثیر نوع حلال، استفاده از سیکل‌های نوری و قند برای پرورش آزولا بود.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین مقدار بتا کاروتن استخراج‌شده از آزولا و بتا کاروتن سنتتیک از حیث آزمایش‌های شیمیایی، خلوص و مدت‌زمان ماندگاری و همچنین ارجحیت بتاکاروتن استخراج‌شده به روش هیدرولیز قلیایی از آزولا در مقایسه با بتا کاروتن سنتتیک از حیث ارزش اقتصادی می‌توان کاربرد بتاکاروتن طبیعی تهیه‌شده از آزولا را به‌جای بتاکاروتن سنتتیک در صنعت غذایی پیشنهاد کرد.

منابع مورد استفاده

استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳، ۱۳۸۳، نمونه‌برداری و روش‌های آزمون روغن‌ها و چربی‌ها. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۰، ۱۳۹۲، افزودنی‌های خوراکی مجاز – رنگ‌های خوراکی – فهرست و ویژگی‌های عمومی. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۲، ۱۳۸۲، گوشت و فرآورده‌های آن – تعیین چربی تام – روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴، ۱۳۸۱، گوشت و فرآورده‌های آن – تعیین مقدار خاکستر کل – روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۵، ۱۳۵۰، گوشت و فرآورده‌های آن – اندازه‌گیری رطوبت. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۴، ۱۳۷۲، اندازه‌گیری پروتئین تام در گوشت و فرآورده‌های آن. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۲۸، ۱۳۸۶، گوشت و فرآورده‌های آن – اندازه‌گیری pH. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. تهران، ایران. تهران، ایران.

اصدق ا، خسروشاهی اصل ا و پیرسا س، ۱۳۹۹، بررسی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و مکانیکی فیلم زیست تخریب پذیر پکتین/زنیان/بتاکاروتن. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱، ۲۲۶ – ۲۱۱.

اکرمی م، قنبرزاده ب، دیناروند ر، دهقان‌نیا ج و یارحسینی م، ۱۳۹۵، نانوکمپلکس‌های صمغ عربی- کازئینات حامل بتا کاروتن (۱): بررسی تشکیل کمپلکس توسط FTIR ، DSC، کدورت و رئولوژی. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳، ۵۷۶ – ۵۶۳.

بایگان ع، راسخ ف، راسخی ن، ۱۳۸۸، فناوری تولید و استخراج کاروتنوئید از موجودات زنده. همایش ملی یافته‌های نوین شیمی در صنعت و پزشکی. شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرری.

رضوی ه، رضایی ک، مارک ا، ۱۳۸۴، مقایسه روش‌های استخراج پیگمان (کاروتنوئید) از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus H* ۱۱۰. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱، ۳۳-۴۲.

زارع د، کیانی‌راد م، ۱۳۸۳، مقایسه تولید بتاکاروتن توسط کپک در فرمانتورهای(*Blakeslea trispora*) پانزده لیتری همزن‌دار و هفتادوپنج لیتری ایرلیفت. پژوهش و سازندگی، ۶۴،۲- ۷.

مقدسی ز، امتیازجو م، ربانی م، لبیبی ف، آذرگشسب ا، مصفا ن، ۱۳۹۰، پتانسیل تولید بتاکاروتن از *دونالیلا سالینا* دریاچه شاهی تحت استرس‌های شوری. شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، ۵ ، ۹۳ – ۱۰۰.

Agostiano A, Catucci L, Cosma P and Fini P, 2003. Aggregation processes and photo physical properties of chlorophyl a in aqueous solutions modulated by the presence of cyclodextrins. Physical Chemistry Chemical Physics 5: 2122–813.

Agte VV, Tarwadi KV, Mengale S and Chiplonkar SA, 2000. Potential of traditionally green leafy vegetables as natural sources for supplementation of eight micronutrients in vegetarian diets. Journal Chromatography 13: 885-891.

Alcaíno A, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, iklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M and Cifuentes V, 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase *(crtR)* gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces Dendrorhous.* BMC Microbiology 8 : 1 – 13.

Amaya R, 2001. The effect of processing and storage on carotenoids content of vegetables. Journal Food Science 7: 2005-5802.

Anguelova T and Warthesen Y, 2000. Degradation of lycopene, α-carotene and β-carotene during lipid peroxidation. Journal of Food Science 65: 71-75.

Anjum F, Barkat AK, Noreen N, Tariq M and Faisal S, 2008. Effect of boiling and storage on beta-carotene content of different vegetables Pakistan. Journal Life Social Science 6:63-67.

Association of Official Analytical Chemists, 1960. Vitamin A in foods in which carotenes have been added as a source of vitamin A. spectrophotometric method. Maryland, USA.

Azhar M, Pervez S, Panda BP, Gupta SK, 2018. Cultivation, Processing and Analysis of *Azolla Microphylla* and *Azolla Caroliniana* as Potential Source for Nutraceutical Ingredients. International Journal of Agriculture Environmental Science 5: 10-16.

Bendich A, 2004. What have we learned about the biological actions of beta-carotene. Journal Nutrition 134: 225-230.

Branen AL, Davidson M, Seppo Salminen P, Thorngate J, 2001. Food additives. Taylor and Francis, Abingdon, United Kingdom.

Caivano JL and Buera MDP, 2012. Color in food: technological and psychophysical aspects. CRC Press. Florida, United States.

Chawla HS, 2002. Introduction to plant biotechnology. Taylor and Francis. Abingdon, United Kingdom.

www.SID.ir

Archive of SID

Chromatogr BJ, 2003. Improved simultaneous determination method of beta-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver. Analytical Technology Biomedicine Life Science 1:305-13.

Çinar I, 2004. Carotenoid pigment losses of freeze dried plant samples under different storage conditions. Food Science. and Technology 37: 363 – 367.

Cosma P, Fini P, Rochira S, Catucci L, Castagnolo M and Agostiano A, 2008. Photo toxicity and cytotoxicity of chlorophyl l a/cyc lodextrins complexes on Jurkat cells. Bio electrochemistry 74: 58-64.

Dentuto PL, Catucci L, Cosma P, Fini P, Agostiano A and Hackbarth S, 2007. Cyclodextrin/chlorophyl l a complexes as supramolecular photosensitizers. Bioelectrochemistry 70:39-43.

Dias Ribeiro B, Weingart Barreto D and Coelho MAZ, 2011. Technological aspects of β-carotene production. Food and Bioprocess Technology 4:693-701.

Evrard C and Van Hove C, 2004. Taxonomy of the American *Azolla* Species (*Azollaceae*): A Critical Review. Systematics and Geography of Plants 74:301-318.

Hackett M, Lee J and Schwartz S, 2002. Thermal stability and isomerization of lycopene in tomato oleoresins from different varieties. Journal Food Science 69: 536-54132.

Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin S and Biesalski HK, 2010. *β*-Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. Journal Nutrition 40: 2268S–2285S.

Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L and Goycoolea FM, 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Critical Review Food Science Nutrition 46:185–196.

Hopkins WG, 2006. Plant biotechnology. Infobase Publishing. New York, United States.

Hosotani K, Kitagawa M, Granado F, Olmedilla B, Gilmantines E and Blando I, 2001. A fast reliable and low cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. Journal Food Composition and Analysis 14: 479 – 489.

Hui BD, Li J, Pei LP, Zhang LX, Zhang Y and Hu YX, 2006. Separation and identification of β-carotene geometrical isomers by C30-HPLC-PDA. Food Science (Chin) 27: 252–255.

Hutchings JB, 2003. Food color and appearance. Aspen Publishers. Gaithersburg, United States.

Khalil IA and Varananis FR, 1996. Carotiniod extraction and analysis by reversed phase HPLC system. Sarhad Journal Agriculture 105: 15-21.

Lejeune A, Peng J, LeBoulenge E, Larondelle Y and Hove CV, 2000. Carotene content of *Azolla* and its variations during drying and storage treatments. Animal Feed Science and Technology 84:293 – 301.

MacDougall DB, 2002. Color in food: improving quality. Woodhead Publishing. Cambridge, United Kingdom.

Mercandate AR and Amaya R, 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. Journal Food Science 25: 213-219.

Miller JK, Travis Harrison M, Andrea AD, Endsley AN, Yin F, Kodukula K and Watson DS, 2013. β-carotene biosynthesis in probiotic bacteria. Probiotics and Antimicrobial Protection 5:69–80.

Miranda AF, Biswas B, Ramkumar N, Singh R, Kumar J, James A, Roddick F, Lal B, Subudhi S, Bhaskar T and Mouradov A, 2016. Aquatic plant *Azolla* as the universal feedstock for biofuel production. BioMed Central 9: 221 – 238.

Muller H, 1997. The determination of the beta-carotene content in selected vegetables and fruits by HPLC and photodiode array detection. Journal Food Nutrition 2: 88-94.

Mostafa EM and Ibrahim MM, 2012. HPLC analysis of non – enzymatic antioxidants in *Azolla caroliniana* subjected to UV-B. Academic Journal Biology Science 3:19-30.

Negi P and Roy S, 2000. Effect of drying condition on quality of green leaves during long term storage. Food Reseach International 34: 283-287.

Nacke C, Hüttmann S, Etschmann MMW, Schrader J, 2012. Enzymatic production and in situ separation of natural β-ionone from β-carotene. Journal Industrial Microbiology Biotechnology 39:1771-8.

Prasanna R, Pabby A and Singh PK, 2004**.** Effect of glucose and light/dark environment on pigmentation profiles in Calothrix elenkeni. Folia Microbialogica 49: 26 -30.

www.SID.ir

Archive of SID

Qiu YL and Yu J, 2003. *Azolla* a model organism for plant genomic studies. Genomics Proteomics Bioinformatics 1: 15–25.

Rymbai H, Sharma RR and Srivastav M, 2011. Biocolorants and its implications in health and food industry - a review. International Journal of Pharmaceutical Technology Research 3: 2228 – 2244.

Schieber A and Carle R, 2005. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: technological, analytical, and nutritional implications. Trends in Food Science & Technology 16: 416–422.

Stahl U, Donalies UEB and Nevoigt E, 2008. Food biotechnology. Springer. Berlin, Germany.

Venugopal V, Prasanna P, Sood A, Jaiswal P and Kaushik BD, 2006**.** Stimulation of pigment accumulation in *Anabaena azolla* strains: effect of light intensity and sugars. Folia Microbiologica 51. 50 – 56.

Vílchez C, Forján E, Cuaresma M, Bédmar F, Garbayo I and Vega JM, 2011. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. Marine Drugs 9: 319–333.

Yamini C, Ranjana N, Chaturvedi Y and Nagar R, 2001. Levels of beta-carotene and effects of processing on selected fruits and vegetables of the arid zone of India. Journal Food Science 56:27-132.

Zakynthinos G and Varzakas T, 2016. Carotenoids: from plants to food industry. Current Research in Nutrition and Food Research 4: 38-51.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Researches/vol.30 No.3/ 2020/pp 19-31
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

The evaluation of the quality of β-carotene derived from *Azolla filiculoides* in the Anzali Wetland using the alkaline hydrolysis method in winter

M Seifzadeh*[1]

Received: September 14, 2017 Accepted: June 8, 2019
[1]Scientific board, Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Anzali, Iran.
*Corresponding author: E mail: m_seifzadeh_ld@yahoo.com

Introduction: *Azolla* is certainly a valuable laboratory plant that will thrive with very little care. The use of *Azolla* may be an important factor in the world's future food needs. *Azolla* is unique because it is one of the fastest growing plants on the planet yet it does not need any soil to grow. *Azolla* is a genus of aquatic ferns and an pteridophyte Plantae belonging to the *Salvinacea* family (Qiu and Yu 2003). *Azolla* is an aquatic fern native of Asia and Africa and it has traditionally been used as a fodder throughout Asia and parts of Africa. Many varieties of food products have been manufactured from *Azolla* which accounts from flavoring agents, food additives and so on. These *Azolla* are also used for the production of bio products such as biogas, biofuel and partial treatment of waste water (Miranda et al., 2016). *Azolla* spp. are heterosporous free-floating freshwater ferns that live symbiotically with *Anabaena Azolla*, a nitrogen-fixing blue-green algae. There are six species of *Azolla* in the world. The genus *Azolla* belongs to the single genus family *Azollaceae*. *Azolla filiculoides* is a species of *Azolla*. *Azolla filiculoides* is under the sub-genus *Euazolla*. It is native to warm temperate and tropical regions as well as most of the old world including Asia, Australia (Evrard andVan Hove 2004) and Anzali wetland. This plant is dark green to reddish and float on the water surface, either individually or in mats, which can reach a thickness of up to 20 cm. When *A. filiculoides* plants are exposed to strong sunlight they obtain a red color. The same occurs in winter time. In shade they always remain green. *A. filiculoides* settles in ponds, ditches, water reservoirs, wetlands, channels and slow flowing rivers. The phytochemical investigation on the *Azolla* shows that tannins, phenols, sugar, anthroquinone glycosides and steroids are present. *Azolla* is also rich in protein, vitamin and minerals and is used as food supplements. In addition to, *A. filiculoides* is very rich in carotenoids. The chemical composition of *Azolla* species varies with ecotypes and with the ecological conditions and the phase of growth. The dry matter percentage of different *Azolla* species varies widely (Mostafa and Ibrahim 2012). Lysine and methionine contents in this species are moderate. But, essential amino acids in this species are poor (Azhar et al., 2018). β-carotene is an organic, strongly colored red-orange pigment. It can also be made in a laboratory. It is a member of the carotenes, which are terpenoids synthesized biochemically from eight isoprene units and thus having 40 carbons. Among the carotenes, β-carotene is distinguished by having beta-rings at both ends of the molecule. β-carotene is the most common form of carotene in plants. When used as a food coloring. β-carotene is biosynthesized from geranyl geranyl pyrophosphate. Carotenoids are the most common pigments in nature and are synthesized exclusively by photosynthetic organisms including crop plants, algae, few fungi and certain bacteria where they play a vital role in plant metabolism and bio-synthesis of other bio-molecules. Carotenoids are considered key molecules for life. Biological properties of carotenoids allow for a wide range of commercial applications (Zakynthinos and Varzakas 2016). Indeed, recent interest in the carotenoids has been mainly for their nutraceutical properties. Carotenoids as natural pigments, are used by the industry as pharmaceuticals, nutraceuticals, and animal feed additives, as well as colorants in cosmetics and special foods. Carotenoids have been studied for their ability to prevent

www.SID.ir

Archive of SID

chronic disease due to the free radical theory of aging in chronic disease etiology. The effect of carotenoids on biotechnology and the food industry is significantly attributed. Finally, carotenoids as fortified substances in foods and special aspects about carotenoids as health promoters are well presented along with a glance of carotenoids economics. β-carotene is one of the carotenoids. β-carotene is the main source of pro-vitamin A and is widely used as a food colorant (Lejeune et al., 2000). The majority of the β-carotene commercialized in the world is obtained by chemical synthesis from β-ionone (Nacke et al., 2012). β-carotene is used for an inherited disorder marked by sensitivity to light. It is also used to prevent certain cancers, heart disease, cataracts, and many other conditions. There are many global health authorities that recommend getting β-carotene and other antioxidants from food instead of supplements. β-carotene and other carotenoids provide approximately 50% of the vitamin A needed in the diet of the some of countries (Grune et al., 2010). Therefore, research for the production of natural colors for use in food industry has particular importance. The present project was aimed at determining the content, quality, and purity of β-carotene extracted from *Azolla filiculoides* in the Anzali Wetland, comparing it with synthetic β-carotene, and measuring its economic value.

Material and methods: One treatment had β-carotene derived from *Azolla filiculoides* in the Anzali Wetland through the alkaline hydrolysis method in the winter of 2014. Treatments were kept at 4 °C for one year. Synthetic β-carotene was used as the control. The quality of the treatments was assessed by applying some chemical tests, including the measurement of the content and quality of β-carotene, calorimetry using the Hunter-LAB method, determination of the purity and vitamin A employing high-performance liquid chromatography (HPLC), estimation of the dwell-time duration at 5 °C, and measurement of the solubility of β-carotene in water.

Results and discussion: The results of the tests regarding the purity, concentration, calorimetry, vitamin compounds, dwell time, and solubility in the experimental β-carotene, compared with those in the control, revealed no significant difference ($p>0.05$). Moreover, the factors showed no significant difference between the control and experimental treatments during the dwell time ($p>0.05$). The natural β-carotene had a good quality during the storage period at 5 °C for one year.

Conclusion: Since there was no significant difference between the β-carotene derived from *Azolla filiculoides* and the synthetic one in terms of the chemical tests, purity, and dwell time, and since the natural β-carotene derived from *Azolla filiculoides* takes precedence over the synthetic one in terms of the food hygiene, it is recommended that natural β-carotene extracted from *Azolla filiculoides* be substituted for synthetic β-carotene in the food industry.

Keywords: *Azolla*, Natural pigment, β-carotene, Food additive, Anzali Wetland

www.SID.ir