

## بهینه‌سازی تولید کلروفیلین مس از چمن و بررسی پایداری آن در نوشیدنی نعناع طی زمان نگهداری

حامد صابریان<sup>۱\*</sup>، حامد حسینی<sup>۲</sup>، شادی بلوریان<sup>۱</sup>، فرشته حسینی<sup>۱</sup>

۱- استادیار گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی  
۲- عضو گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی  
(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۱۶)

### چکیده

کلروفیلین مس، رنگدانه ای محلول در آب است و کاربرد گسترده ای در نوشیدنی‌ها دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه استخراج تک و دو مرحله ای کلروفیل جهت دستیابی به بیشترین بازدهی، بهینه‌سازی تولید کمپلکس کلروفیل مس و در نهایت، بررسی پایداری کلروفیلین مس در نوشیدنی نعناع در دماهای محیط و تسریع شده طی زمان بود. ابتدا کلروفیل از چمن طی یک و دو مرحله استخراج شد و شرایط بهینه تعیین گردید. برای دستیابی به شرایط بهینه تولید کلروفیل مس، تاثیر مستقل متغیرهای غلظت مس (۰-۲۰۰٪ وزنی/وزنی مس نسبت به کلروفیل)، pH (۳-۹)، دما (۴۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد) و زمان (۱۵-۱۸۰ دقیقه) بر شاخص سبزی ( $a^*$ ) بهینه‌سازی شدند. پس از صابونی کردن کلروفیل مس تولیدی در شرایط بهینه، کلروفیلین مس محلول در آب تولید شد. در نهایت، نوشیدنی نعناع حاوی کلروفیلین مس تولید شد و پایداری رنگ آن در هر دو شرایط نور/تاریکی و دماهای محیط و تسریع شده (۴۲ درجه سانتیگراد) طی زمان بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که بیشترین بازده استخراج طی دو مرحله با نسبت حلال به ماده جامد ۱:۱۰ (میلی لیتر بر گرم ماده خشک) حاصل شد (۵۹۰ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک). بیشترین شاخص سبزی در غلظت ۱۰۰٪ مس، در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و طی زمان ۶۰ دقیقه حاصل شد. نوشیدنی نعناع حاوی کلروفیلین مس تولیدی طی زمان و در هر دو شرایط نور/تاریکی و دماهای محیط و تسریع شده، پایداری خوبی را نشان داد اگرچه در نمونه حاوی رنگدانه تجاری، رسوب رنگ مشاهده شد.

کلید واژگان: استخراج کلروفیل، چمن، کلروفیلین مس، نوشیدنی

\* مسئول مکاتبات: [saberian@acecr.ac.ir](mailto:saberian@acecr.ac.ir)

## ۱- مقدمه

کلروفیل به‌عنوان یک رنگدانه طبیعی، فراوانترین و در دسترس‌ترین رنگدانه‌ای است که در ساقه و برگ‌های گیاهان سبز وجود دارد [۱]. این رنگدانه طبیعی از برخی از گیاهان سبز خوراکی مانند علف، یونجه، گزنه و برگ برخی از گیاهان وبا استفاده از حلال جهت مصارف صنفی و صنعتی استخراج می‌شود [۲ و ۳]. بنابراین ماده اولیه لازم جهت استخراج این محصول ارزشمند، بسیار ارزان است.

کلروفیل یک رنگدانه پایدار در طبیعت است اما وقتی از بافت گیاهی استخراج می‌شود، در اثر نور، حرارت، اکسیژن، اسید و آنزیم‌ها تخریب می‌شود. علت اصلی این تغییرات این است که پروتئین‌هایی که اثر محافظتی روی آن دارند تجزیه شده و منیزیم کلروفیل با هیدروژن اسید جایگزین می‌شود و در نتیجه کلروفیل به فتوفیتین تبدیل می‌شود که یک فرآیند غیرقابل بازگشت است. با عمل فتوفیتین‌اسیون، تغییر رنگ از سبز کلروفیل به سبز قهوه ای یا خاکستری صورت می‌پذیرد [۴، ۵ و ۶].

برای پایداری کلروفیل، مشتقاتی از آن‌ها تهیه شده است؛ اگرچه کمپلکس کلروفیلین - مس بیشترین تولید صنعتی را در میان مشتقات کلروفیل، داراست و در واقع کمپلکس محلول در آب کلروفیل می‌باشد. کلروفیلین - مس یک مشتق نیمه سنتتیک از رنگدانه کلروفیل طبیعی است که تولید آن با هیدرولیز گروه فیتول (دم چربی دوست و آب گریز) و متیل استرهای عصاره کلروفیل طبیعی خام آغاز می‌شود و سپس با جایگزین شدن اتم مس با منیزیم، تکمیل می‌گردد. رنگ محلول آن‌ها سبز تیره و یا پودر سبز تیره تا آبی - سیاه می‌باشد. بیشینه قابل قبول مصرف آن بر اساس استاندارد ملی ایران، ۱۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن است [۷]. بنابراین مزیت اصلی کلروفیلین مس نسبت به کلروفیل، پایداری مناسب آن در شرایط محیطی و انحلال‌پذیری آن در آب می‌باشد. استفاده از کلروفیلین - مس به عنوان یک رنگدانه مواد غذایی در اروپا، برزیل، ژاپن و برخی کشورهای دیگر جهت استفاده در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها مجاز شناخته شده است در صورتی که استفاده قانونی آن در ایالات متحده آمریکا محدود می‌باشد و عمدتاً در بهداشت دهان و دندان و به عنوان مکمل رژیم غذایی استفاده می‌شود و فقط در یک نوع

نوشیدنی مرکبات مجاز است. با این حال، تاکنون نه تنها هیچ اثر منفی از مصرف کلروفیلین - مس گزارش نشده است [۸ و ۹] بلکه برخی از محققین اثرات سلامتی بخشی و پیشگیری از بیماری (به عنوان ترکیب ضد سرطان و پیشگیری از بیماری‌های مزمن) را از این رنگدانه خوراکی گزارش کرده‌اند [۸ و ۹]. این ترکیب نه تنها به طور گسترده‌ای در محصولات غذایی، آرایشی و دارویی کاربرد دارد بلکه به عنوان یک نوع جدید از افزودنی‌های غذایی سلامتی بخش مطرح می‌باشد [۱]. با توجه به اثرات جانبی رنگ‌های سنتزی از یک طرف و اثرات دارویی و سلامتی بخشی رنگ‌های با منشأ طبیعی از طرف دیگر (ضمن ایجاد جذابیت و حفظ خواص کیفی محصول)، تمایل فزاینده‌ای از طرف مصرف‌کننده به سمت این ترکیبات طبیعی به وجود آمده است. بنابراین، تولید این رنگدانه نیز از اهمیت فراوانی برخوردار است. تاکنون تحقیقات مختلفی در زمینه استخراج کلروفیل از گیاهان مختلف صورت گرفته است. میازک و لداکوچ (۲۰۱۳) استخراج کلروفیل از برگ‌ها (اقاقیا)، سوزن برگ‌ها (کاج) و ریزجلبک‌ها را مورد بررسی قرار دادند [۱۰]. صابریان و همکاران (۲۰۱۷ا) گزارش کردند که از میان منابع گیاهی مختلف (شامل یونجه، توت، شاتوت و چمن)، بیشترین بازده کلروفیل کل از برگ درخت شاتوت (۶۹۲ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) به دست آمد و سپس چمن حاوی بیشترین میزان کلروفیل بود (۴۳۵ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) [۱۱]. آن‌ها در تحقیق دیگری (۲۰۱۷ب) بیان کردند که راندمان بیشینه کلروفیل طی استخراج از یونجه در شرایط دمای ۵۳/۲ °C، زمان ۳۴/۸۳ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد ۹/۹۹ (ml/g) حاصل می‌شود [۱۲].

از آنجایی که چمن نسبت به برگ شاتوت فراوانتر، در دسترس‌تر و جمع‌آوری آن ارزان‌تر و قابل برنامه‌ریزی‌تر می‌باشد، این منبع به عنوان یک منبع مناسب‌تری برای استخراج کلروفیل به نظر می‌رسد. براین اساس، هدف از این مطالعه در ابتدا، مقایسه استخراج تک و دو مرحله‌ای کلروفیل از چمن جهت دستیابی به بیشترین بازده بود. سپس شرایط بهینه از نظر pH، غلظت مس، دما و زمان فرآیند جهت تولید کمپلکس کلروفیل مس بر اساس شاخص سبزی تعیین شد. در نهایت، پایداری کلروفیلین مس تولیدی در نوشیدنی نعنای طی زمان و در شرایط نور و تاریکی

استخراجی) در شرایط ثابت pH بهینه شده در مرحله قبلی، دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و زمان ۶۰ دقیقه بررسی شد. از سولفات مس به عنوان منبع مس استفاده شد اما غلظت‌های ذکر شده براساس وزن معادل عنصر مس محاسبه شد. در مرحله بعدی تاثیر زمان‌های مختلف (۱۵-۱۸۰ دقیقه) در شرایط ثابت pH و غلظت مس بهینه شده در مراحل قبلی و دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد بررسی شد. در نهایت، تاثیر دماهای مختلف (۶۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد) در شرایط ثابت pH، غلظت مس و زمان بهینه شده در مراحل قبل بر شاخص سبزی ( $a^*$ ) بررسی شد.

#### ۲-۳-۱- صابونی کردن کلروفیل مس و تولید کلروفیلین

##### مس

کمپلکس کلروفیلین مس (II) مطابق با روش اسماعیل و همکاران (۱۹۹۴) تهیه شد [۱۴]. محلول کلروفیل مس انتخابی در مرحله قبل با استفاده از دستگاه روتاری تحت خلا (Laborota 4003 control, Germany) در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شد و سپس به ازای هر کیلوگرم پودر خشک چمن، ۵۰ گرم سدیم هیدروکسید (۵٪ وزن چمن) به مایع تغلیظ شده، افزوده شد. واکنش صابونی شدن کلروفیل و جدا شدن زنجیره فیتولی طی ۳۰ دقیقه حرارت‌دهی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در حضور سدیم هیدروکسید صورت پذیرفت. سپس با استفاده از اسید کلریدریک ۱۰٪، pH محلول به حدود ۸-۹ رسانده شد. در نهایت، کلروفیلین مس محلول در آب با بریکس ۲۰ تولید شد.

#### ۲-۴- تولید نوشیدنی و بررسی شرایط نگهداری

##### بر شاخص سبزی

فرمولاسیون نوشیدنی شامل ۰/۱۵٪ اسید سیتریک، ۱۱٪ شکر، ۰/۱٪ اسانس نعناع و ۰/۱٪ پکتین بود. نمونه نوشیدنی نعناع با pH اسیدی (۳/۸) تهیه شد و بعد از افزودن محلول کلروفیلین مس با بریکس ۲۰ (به میزان ۰/۲٪ وزنی/حجمی)، در معرض پاستوریزاسیون (۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه) قرار گرفت و شاخص‌های رنگی آن ( $a^*$  و  $b^*$ ) طی زمان (۳۰ روز) و در دماهای محیط و تسریع شده (۴۲ درجه سانتیگراد) در معرض نور و تاریکی بررسی شد.

#### ۲-۵- اندازه گیری کلروفیل با استفاده از روش

دو دمای محیط و تسریع شده بررسی شد و با نمونه تجاری مقایسه شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- آماده سازی نمونه‌ها

نمونه‌های ضایعات چمن از بلوارهای چمن کاری شده دانشگاه فردوسی مشهد جمع آوری شدند و پس از جداسازی ذرات خارجی و برگ درختان، در دمای محیط و فضای سایه (حدود ۳ روز) کاملاً خشک شدند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب سایشی پودر شدند و از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند و تا زمان انجام آزمون، در نایلون در دمای اتاق نگهداری شدند. سولفات مس ۵ آبه از شرکت شارلو (اسپانیا)، استون و اتانول با درجه آزمایشگاهی از شرکت دکتر مجللی (صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) خریداری شدند.

### ۲-۲- بهینه‌سازی استخراج کلروفیل

در این قسمت ابتدا نسبت حلال به ماده جامد (۱:۱۰، ۱:۱۵ و ۱:۲۰ میلی لیتر به ازای ماده خشک) مورد بررسی قرار گرفت و سپس بهینه آن‌ها با استخراج دو مرحله‌ای مقایسه شد. باتوجه به تحقیقات پیشین [۱۱] از اتانول ۹۰٪ (حجمی/حجمی) و دمای ۵۳/۲°C، زمان ۳۴/۸۳ دقیقه جهت استخراج کلروفیل استفاده شد. فرآیند استخراج در داخل بطری شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ در بسته (جهت جلوگیری از تخریب کلروفیل) و بر روی دستگاه هیتر استیرر با دور حدود ۳۰۰ rpm و با کنترل دما انجام شد. آزمون‌ها حداقل در دو تکرار انجام شدند.

### ۲-۳- بهینه‌سازی تولید کلروفیل مس

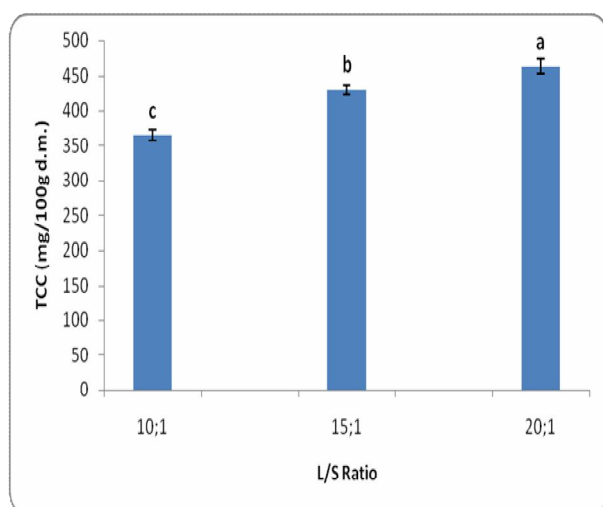
واکنش جایگزینی منیزیم مرکزی در مولکول کلروفیل توسط مس با حرارت دادن مخلوط واکنش در حضور سولفات مس انجام شد [۱۳]. متغیرهای آزمون در چند مرحله به صورت مستقل بهینه‌سازی شدند و شاخص سبزی ( $a^*$ ) نمونه‌ها ارزیابی شد. ابتدا تاثیر pH‌های مختلف (۳-۹) بر شاخص سبزی رنگدانه در شرایط ثابت دما، زمان و غلظت مس به ترتیب ۱۰۰ درجه سانتیگراد، ۶۰ دقیقه و ۱۰۰٪ بررسی شد. سپس غلظت مس (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰٪ (وزنی/وزنی)) مستقیماً به کلروفیل

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تاثیر نسبت حلال به ماده جامد بر بازده

##### استخراج کلروفیل

باتوجه به تحقیقات پیشین، مهمترین عامل موثر بر بازده استخراج کلروفیل، نسبت حلال به ماده جامد می‌باشد [۱۱، ۱۲ و ۱۶]. استخراج در سه نسبت حلال به ماده جامد ۱:۱۰، ۱:۱۵ و ۱:۲۰ (میلی لیتر بر گرم) انجام شد. باتوجه به شکل ۱، با افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بازده کلروفیل افزایش قابل توجهی پیدا کرد؛ به نحوی که با افزایش نسبت حلال به ماده جامد از ۱:۱۰ به ۱:۱۵ و ۱:۲۰ (میلی لیتر بر گرم)، میزان بازده کلروفیل به ترتیب ۱۸ و ۷٪ افزایش پیدا کرد. از آنجایی که افزایش بیش از حد حلال (به علت افت حلال طی استخراج و بازیابی) مقرون به صرفه نمی‌باشد، به نسبت حلال به ماده جامد ۱:۲۰ (میلی لیتر بر گرم) اکتفا شد.



**Fig 1** The yield of total chlorophyll content (TCC) at different Liquid/Solid ratio

میزان ایده‌آل حلال مورد استفاده بایستی به گونه‌ای تعیین شود که برای انحلال ترکیبات هدف کافی باشد [۱۷]. افزایش نسبت حلال به ماده جامد موجب افزایش توانایی استخراج حلال می‌شود [۱۸] اگرچه پس از رسیدن به مقدار بهینه، میزان استخراج ثابت می‌ماند یا حتی کاهش پیدا می‌کند [۱۹]. ساختار ماتریس ماده اولیه (در اینجا پودر چمن) نیز توانایی حلال برای نفوذ و استخراج ترکیبات مدنظر را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۰]. علت افزایش بازده استخراج با افزایش نسبت حلال به ماده جامد را

### اسپکتروسکوپی

برای اندازه گیری میزان کلروفیل، مایع رویی به دست آمده بعد از عمل سانتریفوژ در مراحل قبل، با استفاده از استون ۸۰٪ رقیق شد و جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفومتر (مدل BC47358، شرکت Biochrom، ساخت انگلستان) خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر میزان کلروفیل کل محاسبه گردید [۱۵]:

$$*100/1000 (20.2 A_{645} + 8.02 A_{663})$$

فاکتور رقیق‌سازی = کلروفیل کل (میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن تازه نمونه)

#### ۲-۶- اندازه گیری کلروفیلین مس

یک گرم از نمونه خشک شده را در ۲۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات (pH=۷/۵) حل نموده و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر از این محلول با محلول بافر فسفات به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و جذب آن در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. درصد خلوص نمک سدیم کلروفیلین مس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۷]:

$$\text{ضریب} (A_{405} * \text{درصد خلوص نمک سدیم کلروفیلین مس} (۵۶۵ * \text{وزن نمونه}) / \text{زقت})$$

که در این فرمول،  $A_{405}$  میزان جذب نمونه در طول موج ۴۰۵ نانومتر و عدد ۵۶۵ حداکثر شدت جذب نمونه خالص یک درصد در طول موج ۴۰۵ نانومتر می‌باشد.

#### ۲-۷- اندازه گیری شاخص رنگی

شاخص سبزی ( $a^*$ ) عصاره‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه‌های رنگ (ColorFlexHunterLab، مدل C04-1005-631، ساخت تایوان) صورت پذیرفت [۱۶].

#### ۲-۸- طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

جهت انتخاب بهترین نسبت حلال به ماده جامد و همچنین تیمارهای استخراج دو مرحله‌ای کلروفیل، انتخاب بهترین pH، بهترین غلظت مس و همچنین بهترین دما و زمان فرآیند تولید کلروفیل مس از آنالیز واریانس و طرح یک فاکتور در یک زمان و با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

آبرویی و سوگی (۲۰۱۷) مشاهده کردند که افزایش تعداد دفعات استخراج تا ۴ بار می‌تواند موجب افزایش بازده رنگدانه لیکوپین شود اگرچه پس از آن تاثیری بر بازده نداشت [۱۹]. پروا-اوزونالیک و همکاران (۲۰۰۶) استخراج کانتین و کافئین از برگ‌های چای سبز را طی چهار مرحله انجام دادند و مشاهده کردند که بازده استخراج در هر مرحله از استخراج‌های بعدی (به صورت جداگانه) کاهش یافت؛ اگرچه میزان کل این ترکیبات به ازای وزن کل عصاره افزایش یافت. در مرحله دوم بازده کافئین و کانتین حدود ۲۷٪ افزایش یافت اگرچه در مرحله سوم این افزایش به کمتر از ۹٪ و در مرحله چهارم به کمتر از ۳٪ رسید [۲۴].

کولکاری و نیکولو (۲۰۱۸) گزارش کردند که در نسبت زیست توده جلبک *Chlorella vulgaris* به حلال ۳:۱ (گرم وزن زیست‌توده مرطوب به میلی‌لیتر حلال) در مرحله اول استخراج، ۷ میلی‌گرم کلروفیل به ازای گرم ماده خشک زیست‌توده بدست آمد و طی استخراج در مرحله دوم به ۳/۹ میلی‌گرم به ازای گرم ماده خشک و در مرحله سوم به ۱/۹ میلی‌گرم به ازای گرم ماده خشک رسید [۲۲].

### ۳-۳- تاثیر متغیرهای موثر بر شاخص سبزی محلول کلروفیل مس

کلروفیل یک ترکیب زیست‌فعال بسیار ناپایدار مخصوصا در شرایط نور، حرارت، اسید و قلیا است که با افزودن یون روی یا مس پایدار می‌شود و به طور گسترده در صنعت غذا کاربرد دارد [۲۵]. با افزودن این یونها و ایجاد کمپلکس روی یا مس، رنگ سبز شدیدتری (شاخص  $a^*$  کوچکتر) حاصل می‌شود.

اثر غلظت مس بر شاخص سبزی محلول کلروفیل مس در شکل ۳ نشان داده شده است. سایر پارامترهای فرآیند تولید کلروفیل مس از قبیل pH، دما و زمان فرایند به ترتیب در مقادیر ثابت ۷، ۱۰۰ درجه سانتیگراد و ۶۰ دقیقه نگه‌داشته شدند. مطابق شکل ۳، کمترین میزان شاخص سبزی مربوط به نمونه شاهد بود که فاقد مس بود و با افزایش غلظت مس، میزان شاخص سبزی افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان سبزی رنگ (کوچکترین  $a^*$ ) مربوط به غلظت مس ۱۰۰٪ (وزن مس به وزن کلروفیل) بود و پس از آن ثابت ماند. لذا غلظت ۱۰۰٪ مس انتخاب شد.

می‌توان به افزایش نفوذ حلال آلی به ماتریس سلول‌های گیاهی و در نتیجه افزایش انحلال‌پذیری و استخراج ترکیب رنگی نسبت داد [۲۱]. کولکاری و نیکولو (۲۰۱۸) طی استخراج کلروفیل از جلبک *Chlorella vulgaris* مشاهده کردند که میزان کلروفیل استخراجی کل متأثر از نسبت زیست توده به حلال بود به طوری که با افزایش این نسبت از ۳:۱ به ۵:۱ (گرم وزن زیست توده مرطوب به میلی‌لیتر حلال) میزان کلروفیل افزایش پیدا کرد اما در نسبت ۱۰:۱، این رنگدانه کاهش یافت [۲۲]. یلمه و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که با افزایش نسبت ماده جامد به حلال ابتدا میزان بازده استخراج رنگدانه افزایش یافت و سپس به علت اشباع شدن حلال، بازده کاهش یافت [۲۳].

### ۳-۲- تاثیر استخراج دو مرحله ای بر بازده کلروفیل

افزایش تعداد دفعات استخراج می‌تواند موجب افزایش بازده ترکیب مورد نظر شود [۱۹]. جهت افزایش کارایی استخراج، استخراج دو مرحله ای در شرایط ثابت دمای  $53/2^{\circ}\text{C}$ ، زمان  $34/83$  دقیقه و نسبت حلال کل به ماده جامد  $1:20$  (میلی‌لیتر بر گرم)، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، استخراج دو مرحله‌ای (با فرض ثابت نگه‌داشتن میزان مصرف حلال کل) به طور معنی‌داری بازده استخراج را نسبت به نوع تک مرحله‌ای افزایش داد؛ اگرچه تفاوتی در بازده استخراج دو مرحله‌ای  $1:5$  -  $1:10$  با  $1:10$  -  $1:10$  (میلی‌لیتر بر گرم) مشاهده نشد.

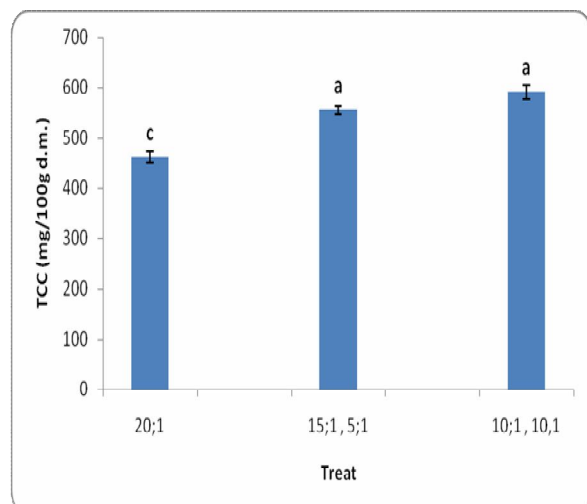


Fig 2 The comparison of the yield of total chlorophyll content (TCC) during single and double step extraction

آنجایی که pH اولیه محلول کلروفیل مس حدود ۷ بود و از طرفی، pH تأثیری بر شاخص سبزی نداشت، لذا pH برابر ۷ برای ادامه آزمون‌ها انتخاب شد. تأثیر دما بر شاخص سبزی محلول کلروفیل مس در شرایط ثابت pH برابر با ۷، غلظت مس ۱۰۰٪ و زمان حرارت دهی ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۴، نتایج حاکی از آن بود که با افزایش دمای فرآیند، میزان شاخص سبزی به طور معنی‌داری افزایش یافت اما تفاوت معنی‌داری در میزان شاخص سبزی بین دو دمای ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتیگراد وجود نداشت. لذا دمای ۸۰ درجه سانتیگراد انتخاب شد.

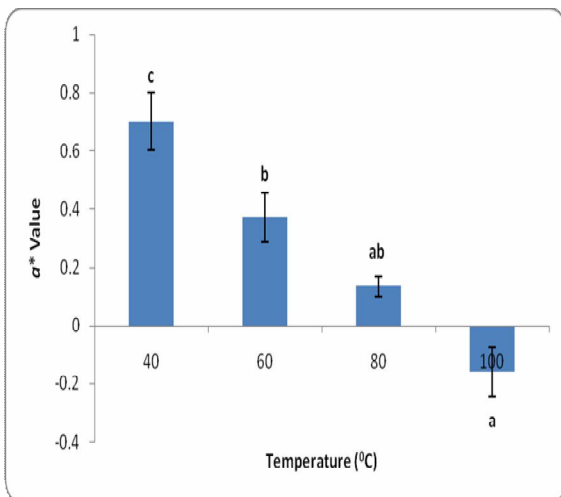


Fig 4 The effect of temperature on the greenness value ( $a^*$ ) of the chlorophyll solution

ازکان و بیلک (۲۰۱۵) مشاهده کردند که با افزایش دما از ۸۰ تا ۱۱۰ درجه سانتیگراد طی مدت ۱۵ دقیقه، شاخص سبزی رنگ افزایش یافت و پس از آن کاهش یافت [۱۶]. سنکلانگ و آنپرانگ (۲۰۰۹) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند [۲۷]. تأثیر زمان بر شاخص سبزی محلول کلروفیل مس در شرایط ثابت pH برابر با ۷، غلظت مس ۱۰۰٪ و دمای فرآیند ۸۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با افزایش زمان فرآیند تا ۶۰ دقیقه، شاخص سبزی افزایش یافت ( $a^*$  کوچکتر) اما پس از آن ثابت ماند. بنابراین در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ دقیقه، جایگزینی کامل یون مس با منیزیم موجود در کلروفیل صورت نگرفته است اما زمان ۶۰ دقیقه، زمانی کافی جهت جایگزینی یون مس با منیزیم می‌باشد.

البته در این غلظت مس، همواره مقدار قابل توجهی از مس رسوب می‌کند که به معنی مازاد بودن یون مس نسبت به مولکول کلروفیل می‌باشد. به نظر می‌رسد علت نیاز به میزان مس بیشتر، به تعادل رسیدن واکنش در غلظت‌های کمتر و عدم ایجاد کمپلکس بین تمام مولکول‌های کلروفیل و مس باشد. ضمناً رسوب مس پس از واکنش حذف می‌گردد تا وارد محصول نهایی نشود.

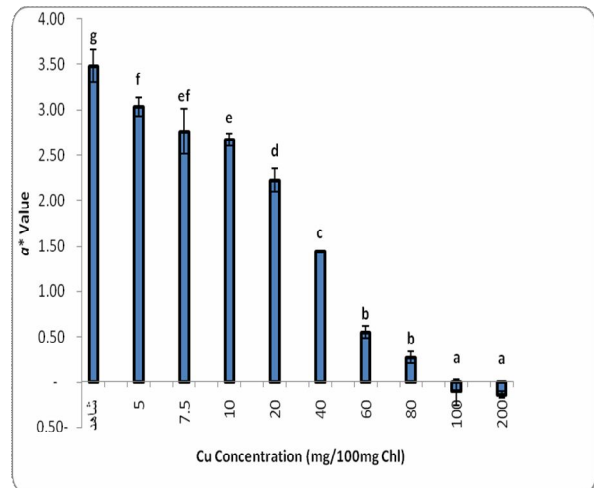


Fig 3 The effect of Cu concentration on the greenness value ( $a^*$ ) of the chlorophyll solution

تشکیل کمپلکس کلروفیل روی به غلظت یون روی و غلظت رنگدانه کلروفیل محلول وابسته می‌باشد [۲۶]. ازکان و بیلک (۲۰۱۵) مشاهده کردند که با افزایش غلظت کلرید روی تا ۳۰۰ ppm شاخص سبزی پالپ اسفناج افزایش یافت و پس از آن ثابت ماند [۱۶].

تغییر pH محلول استخراجی چمن از ۳ تا ۹، در شرایطی که دمای محلول ۱۰۰ درجه سانتیگراد، غلظت یون مس ۱۰۰٪ و زمان حرارت دهی ۶۰ دقیقه بود، تأثیری بر شاخص سبزی نداشت اگرچه ازکان و بیلک (۲۰۱۵) مشاهده کردند که بیشترین شاخص سبزی در pH ۷ تا ۹ وجود داشت و با کاهش pH، از میزان این شاخص کاسته شد. لاپورد و ون البه (۱۹۹۴) بیان کردند که تشکیل کمپلکس روی در پوره نخود در pH‌های ۴ تا ۶ افزایش یافت [۴]. سنکلانگ و آنپرانگ (۲۰۰۹) نتایج متضادی را در مورد اثر pH بر رنگ سبز عصاره برگ پاندا به دست آوردند به گونه‌ای که بیشترین رنگ سبز در pH برابر با ۵ وجود داشت و در pH‌های ۷ و ۸ شدت سبزی کاهش یافت [۲۷]. بنابراین pH، تأثیر متفاوتی بر مواد خام و عصاره‌های متفاوت داشته است. از

پارک و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که با افزایش دمای نگهداری گوجه سیاه، میزان کلروفیل و به تبعیت از آن، شاخص سبزی آن کاهش پیدا کرد و علت آن را به فعالیت آنزیم‌ها نسبت دادند [۲۸]. کانگ و همکاران (۲۰۱۹) نیز مشاهده کردند که با افزایش دمای نگهداری رنگدانه کلروفیل ریزپوشانی شده از ۴ تا ۴۰ درجه سانتیگراد، میزان تخریب کلروفیل افزایش یافت [۲۹]. البته باید به این نکته نیز توجه کرد که کارهای انجام شده بر روی کلروفیل (که حاوی یون منیزیم است) بوده است و از آنجایی که حساسیت کلروفیل نسبت به کلروفیلین مس خیلی بیشتر است، طبیعی است که تخریب و کاهش آن در دماهای بالاتر نیز بیشتر باشد.

از نمونه کلروفیلین مس تجاری نیز در نوشیدنی نعنای استفاده شد. همانطور که شکل ۷ مشاهده می‌شود رنگدانه کلروفیلین مس تجاری در همان ابتدای نگهداری در نوشیدنی رسوب کرد. علت رسوب کلروفیلین مس تجاری در نوشیدنی را می‌توان به خودتجمعی<sup>۱</sup> یون کلروفیلین در pHهای اسیدی نسبت داد [۳۰].



Fig 7 The comparison of the produced (a) and commercial (b) copper chlorophyllin applied in the mint drink

### ۴- نتیجه گیری کلی

کلروفیلین مس، رنگدانه‌ای نیمه سنتزی است که با جایگزین کردن یون مس به جای یون منیزیم و جداکردن گروه فیتول طی فرآیند صابونی کردن حاصل می‌شود. این رنگدانه، محلول در آب

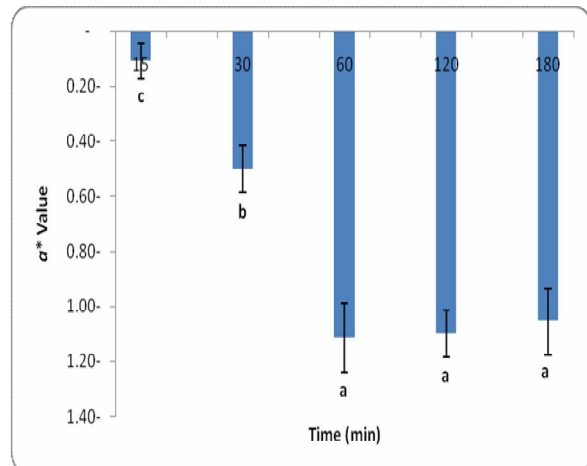


Fig 5 The effect of treatment time on the greenness value ( $a^*$ ) of the chlorophyll solution

### ۳-۴- تاثیر شرایط نگهداری بر شاخص سبزی

#### نوشیدنی

میزان خلوص کلروفیلین مس تولیدی با بریکس ۲۰،  $0.1 \pm 0.3\%$  محاسبه شد. شاخص سبزی نوشیدنی، پس از افزودن محلول کلروفیلین مس به نوشیدنی نعنای و فرآیند پاستوریزاسیون و همچنین طی زمان نگهداری تا ۲۸ روز اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از آن بود که عوامل دما و نور/تاریکی تاثیر بسزایی بر شاخص سبزی نداشتند اما طی زمان نگهداری، این شاخص به صورت معنی‌داری کاهش یافت (افزایش  $a^*$ )؛ اگرچه این کاهش بسیار اندک بود (شکل ۶). بنابراین، رنگدانه کلروفیلین مس تولیدی طی نگهداری نوشیدنی نعنای، پایدار بوده است.

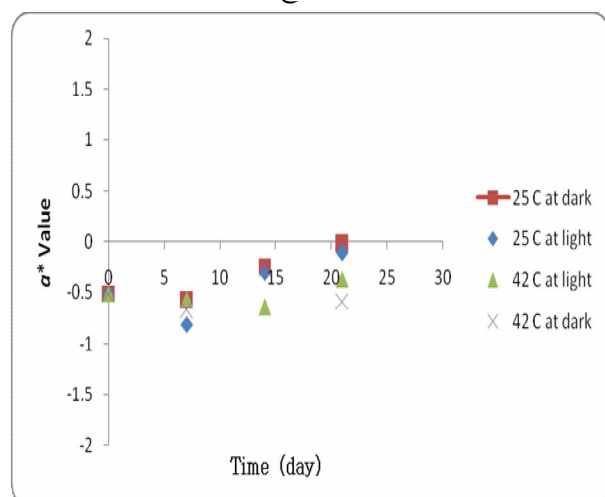


Fig 6 The effect of different condition of storage on the greenness value ( $a^*$ ) of the mint drink containing cu-chlorophyllin

1. Self-assembling



*Food Chemistry.*

- [6] Koca, N., Karadeniz, F., & Burdurlu, H. (2007). Effects of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry*, 100, 609–615.
- [7] Iranian National Standardization Organization (INSO) 14406, Food Additives- Permitted food colorants- Cu-chlorophyllin complexes (Na and K salts) – Experimental methods (2011)
- [8] Tumolo, T., & Lanfer-Marquez, U. M. (2012). Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? *Food Research International*, 46(2), 451-459.
- [9] FDA (2002). Listing of color additives exempt from certification: Sodium copper chlorophyllin. US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services Federal Register 67FR49567/67FR35429.
- [10] Miazek, K., & Ledakowicz, S. (2013). Chlorophyll extraction from leaves, needles and microalgae: A kinetic approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 6(2), 107-115.
- [11] Saberian, H., Hosseini, F., Bolourian, Sh. (2017a). Optimization of extraction condition of chlorophyll from Alfalfa and investigating its quality and quantity properties in comparison to different plant resources, *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 14 (71), 47-57.
- [12] Saberian, H., Hosseini, F., Bolourian, Sh. (2017b). The effect of ultrasound method on the extraction of chlorophyll from mulberry leaves, *Innovative Food Technology*, 4(16), 67-76.
- [13] Zvezdanović, J. B., Marković, D. Z., & Milenković, S. M. (2012). Zinc (II) and copper (II) complexes with pheophytin and mesoporphyrin and their stability to UV-B irradiation: Vis spectroscopy studies. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(2), 187-199.
- [14] Ismail, SI, Hussein, A. A., Hussiney, H. A., & Hammouda, F. M. (1994). Application Of Different Methods For The Preparation Of Chlorophyll Pigments For Food And Pharmaceutical Industries. *Qatar University Science Journal*, 14, 161-164.
- [15] Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, *Plant physiology*, 24: 1-

است و نسبت به کلروفیل بسیار پایدارتر و همچنین جذاب‌تر می‌باشد. نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که استخراج دومرحله‌ای موجب افزایش قابل توجهی در بازده کلروفیل می‌شود. همچنین، شرایط بهینه تولید کلروفیل مس شامل غلظت مس ۱۰۰٪، دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و زمان ۶۰ دقیقه بود. رنگ نوشیدنی نعنای حاوی کلروفیلین مس تولیدی نیز پایداری بسیار مناسبی را در دماهای محیط و تسریع شده و در شرایط نور/تاریکی طی مدت ۲۸ روز نشان داد. باتوجه به پدیده خودتجمعی کلروفیلین مس در نوشیدنی‌های اسیدی و رسوب آن، پیشنهاد می‌شود تحقیقات آینده در زمینه بررسی سازوکار جلوگیری از این پدیده با استفاده از افزودنی‌ها یا اصلاح فرآیند تولید، هدف‌گذاری شوند.

**۵- سپاسگزاری**

بدین‌وسیله از سازمان جهاد دانشگاهی برای حمایت‌های مالی و معنوی از این پژوهش که در قالب طرح پژوهشی به کد ۶۰۱۰-۲۰ به انجام رسیده است، تقدیر می‌گردد.

**۶- منابع**

- [1] Han, J., Wang, Y., Ma, J., Wu, Y., Hu, Y., Ni, L., & Li, Y. (2013). Simultaneous aqueous two-phase extraction and saponification reaction of chlorophyll from silkworm excrement. *Separation and Purification Technology*, 115, 51-56.
- [2] Iranian National Standardization Organization (INSO) 740, Permitted food additives- Food colors- List and general specifications (2012).
- [3] Bagheri, S. L., Radi, m., & Amiri, S. (2012). Investigation of chemical structure and stability of chlorophyll as a natural pigment, 21<sup>th</sup> national congress of Iranian Food Science and Technology.
- [4] Laborde, L., & Von Elbe, J. (1994). Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 1100–1103.
- [5] Von Elbe, J., & Schwartz, S. (1996). Colorants (Cilt 2). New York: Marcel Dekker:



- 16.
- [23] Yolmeh, M., Najafi, M. B. H., & Farhoosh, R. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319-324.
- [24] AmraPerva-Uzunalić; MojcaŠkerget; ŽeljkoKnez; Bernd Weinreich; Frank Otto; Sabine Grüner (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 69, 597-605.
- [25] Zhao, W., Duan, M., Zhang, X., & Tan, T. (2018). A mild extraction and separation procedure of polysaccharide, lipid, chlorophyll and protein from *Chlorella* spp. *Renewable Energy*, 118, 701-708.
- [26] Laborde, L., & Von Elbe, J. (1990). Zinc complex formation in heated vegetable purees. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42(5), 484-487.
- [27] Senklang, P., & Anprung, P. (2009). Optimizing enzymatic extraction of Zn-chlorophyll derivatives from pandan leaf using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 759-776.
- [28] Park, M. H., Sangwanangkul, P., & Baek, D. R. (2018). Changes in carotenoid and chlorophyll content of black tomatoes (*Lycopersicon esculentum* L.) during storage at various temperatures. *Saudi journal of biological sciences*, 25(1), 57-65.
- [29] Kang, Y. R., Lee, Y. K., Kim, Y. J., & Chang, Y. H. (2019). Characterization and storage stability of chlorophylls microencapsulated in different combination of gum Arabic and maltodextrin. *Food chemistry*, 272, 337-346.
- [30] Nikkonen, T. (2015). Structure-property relationships and self-assembly of chlorophyll derivatives in development of light-harvesting structures and materials.
- [16] Özkan, G., & Bilek, S. E. (2015). Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food chemistry*; 176:152-157.
- [17] Albuquerque, I. M. D., Cardoso, D. M., Masiero, P. R., Paiva, D. N., Resqueti, V. R., Fregonezi, G. A. D. F., & Menna-Barreto, S. S. (2016). Effects of positive expiratory pressure on pulmonary clearance of aerosolized technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetic acid in healthy individuals. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 42(6), 404-408.
- [18] López, C. J., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. Fruits. *Food chemistry*, 264, 81-91.
- [19] Oberoi, D. P. S., & Sogi, D. S. (2017). Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. *Food chemistry*, 232, 316-321.
- [20] Pinela, J., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Carvalho, A. M., Oliveira, M. B. P., Curran, T. P., & Ferreira, I. C. (2017). Valorisation of tomato wastes for development of nutrient-rich antioxidant ingredients: A sustainable approach towards the needs of the today's society. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 160-171.
- [21] 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.
- [22] Kulkarni, S., & Nikolov, Z. (2018). Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal research*, 35, 185-193.

## Optimization of copper chlorophyllin production from grass and evaluating its stability in the mint drink during storage

Saberian, H. <sup>1\*</sup>, Hosseini, H. <sup>2</sup>, Hosseini, F. <sup>1</sup>, Bolourian, Sh. <sup>1</sup>

1. Assistant Professor of Food Science and Technology, Department of Food Additives, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad, Iran
2. Researcher of Food Science and Technology, Department of Food Additives, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad, Iran

(Received: 2018/12/22 Accepted:2019/05/06)

Copper chlorophyllin is a water soluble pigment and has a wide application in the drink industry. The aims of the research were, first to compare single and double step extraction of chlorophyll to achieve the highest yield, second to optimize the producing of copper chlorophyll complex and finally, to study the stability of copper chlorophyllin in mint drink at room and accelerated temperatures during time. First, the chlorophyll was extracted from grass by single and double step extraction and the optimum condition was determined. The effect of Cu concentration (0-200 % w/w), pH (3-9), temperature (40-100 °C) and time (15-180 min) on the greenness value ( $a^*$ ) was optimized. After saponification of the produced copper chlorophyll, water soluble copper chlorophyllin was produced. Finally, mint drink containing copper chlorophyllin was produced and its color stability was investigated at light/dark and room and accelerated temperatures (25 and 42 °C) during time. The results indicated that the highest yield of chlorophyll (590 mg/100 g d.m.) was obtained by double step extraction with the solvent/solid ratio of 10:1 (ml/g). The highest  $a^*$  was obtained at cu concentration of 100 % at 80 °C during 60 min. Mint drink containing copper chlorophyllin was stable at different conditions of light/darkness and room and accelerated temperatures but in the drink containing commercial copper chlorophyllin, this pigment was precipitated.

**Keywords:** Chlorophyll extraction, Grass, Copper chlorophyllin, Drink

---

\*Corresponding Author E-Mail Address: [saberian@acecr.ac.ir](mailto:saberian@acecr.ac.ir)