جمهوری اسلامی ایران

معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی

گزارش طرح:

بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ آناتو در مقیاس نیمه صنعتی و ارزیابی پایداری آن

(کد: ۲۳۳۶-۲۰)

جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی
گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی

مسئول طرح:
فرشته حسینی

دی ماه ۱۳۹۶

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	فرشته حسینی	مجری	صنایع غذایی	استادیار	**۸۹۶**
۲	علی شیری	مشاور	شیمی	دانشیار	**۹۰**
۳	شادی بلوریان	همکار بخش آزمایشگاهی	صنایع غذایی	استادیار	**۲۵۰**
۴	حامد صابریان	همکار بخش آماری طرح	صنایع غذایی	استادیار	**۱۰۰**
۵	مجید افشاری	همکار بخش تولید نیمه صنعتی	صنایع غذایی	دکتری علوم و صنایع غذایی	**۵۰۰**

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده طرح:

در این پژوهش، تاثیر متغیرهای نوع حلال، نسبت دانه به حلال، دما و زمان استخراج بر بازده رنگی، خلوص رنگ و بازده بیکسین/ نوربیکسین دانه آناتو بود. طرح مرکب مرکزی با چهار فاکتور نوع حلال (استون، سود، سود–استون)، نسبت حلال به ماده جامد (۱:۱ تا ۱:۵ میلی لیتر بر گرم) و زمان (۲–۶ ساعت) و دمای استخراج (۲۵–۶۵ درجه سانتیگراد) در سه سطح (۱– ، ۰ و ۱) بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دوم برای بازده رنگ آناتو معنی دار می باشد و ضریب تبیین (R_2) محاسبه شده برای آن ۰/۹۱۵ بود که بیانگر آن است که ۹۱/۵٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. همچنین دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نشان نداد. بازده بیشینه تحت شرایط حلال هیدروکسید سدیم، دمای C^o ۴۶/۴۱، زمان ۲/۰۵ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵ به ۱، معادل ۱۳/۳۱٪ پیش بینی گردید. مدل درجه دوم برای خلوص رنگ آناتو معنی دار بود و ضریب تبیین (R_2) محاسبه شده برای آن ۰/۸۴۸ بود. با تغییر نوع حلال از استون به سود و افزایش نسبت حلال به ماده جامد، خلوص افزایش یافت. شاخص بازده بیکسین/ نوربیکسین نیز که در واقع وزن بیکسین/ نوربیکسین نسبت به دانه آناتو می باشد، به عنوان یک شاخص جامع تر تعیین و محاسبه شد. همچنین موثرترین عامل در تغییرات رنگ پودر آناتو، عامل نور تشخیص داده شد که درصورت حذف آن با استفاده از بسته بندی های مناسب می توان کیفیت پودر رنگ های استخراجی را تا حدود زیادی حفظ نمود. نتایج مشابهی در خصوص پایداری پودر رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی پودر آب پنیر مشاهده شد.

واژگان کلیدی: بیکسین، نوربیکسین، اسپکتروفوتومتری، خلوص رنگ، L^*

Archive of SID
www.SID.ir

پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی

فهرست

۱- فصل اول (کلیات) ۱

۱-۱-مقدمه ۲

۲- فصل دوم (مرور منابع مطالعاتی) : ۵

۲-۱-افزودنی های غذایی ٦

۲-۲-رنگ های خوراکی ٦

۲-۳-طبقه بندی رنگهای خوراکی ٦

۲-۴-اهمیت تولید رنگ‌های طبیعی خوراکی از منابع طبیعی در ایران ۸

۲-۴-۱-اهمیت رنگ در افزایش بازارپسندی محصولات غذایی ۸

۲-۴-۲-کاربرد گسترده رنگ‌ها در صنایع غذایی ۹

۲-۴-۳- اهمیت رنگ‌های طبیعی و مضرات رنگ‌های سنتزی از دیدگاه سلامت عمومی ۱۰

۲-۴-۴-آمار بالای واردات و خروج ارز از کشور ۱۱

۲-۴-۵-تاکید استاندارد ملی ایران به لزوم استفاده از رنگ‌های طبیعی در محصولات غذایی ۱۳

۲-۴-۶-محدود بودن پژوهش‌های انجام‌شده پیرامون تولید رنگ‌های طبیعی در ایران ۱۴

۲-۴-۷-منابع طبیعی بالقوه موجود در ایران جهت استخراج رنگ‌های خوراکی ۱۴

۲-۵- رنگ های طبیعی مجاز خوراکی قابل استفاده در انواع محصولات غذایی مطابق با استاندارد ملی ایران ۱۵

۲-٦-آناتو ۱۷

۲-۶-۱-ویژگیهای گیاه شناسی آناتو ۱۸

۲-۶-۲-ترکیبات پریکارپ دانه آناتو ۱۹

۲-۶-۳-ویژگیهای شیمیایی و فیزیکی رنگدانه های آناتو ۲۰

۲-۶-۴-روشهای متداول استخراج رنگدانه آناتو ۲۳

۲-۶-۵-پایداری عصاره های آناتو ۲۴

۲-۶-۶-اسامی بین المللی رنگ آناتو ۲۶

۲-۶-۷-خواص درمانی و اثرات بیولوژیکی رنگ آناتو ۲۸

۲-۶-۸-ایمنی و توکسیکولوژی رنگ آناتو ۲۹

۲-۶-۹-کاربردهای غذایی رنگ آناتو ۳۱

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۶-۱۰-بازار جهانی (تولید و صادرات) دانه آناتو ۳۳

۲-۷-ویژگی‌های آب پنیر ۳٤

۲-۷-۱-ترکیبات آب پنیر ۳۴

۲-۷-۲-ویژگی‌های عملیاتی و کاربردی آب پنیر (WPC) ۳۶

۲-۸-خط تولید نیمه صنعتی مرکز تحقیقاتی و تولید نیمه صنعتی افزودنی های غذایی ۳۸

۲-۹-پیشینه پژوهش در ایران و سایر کشورها ٤۰

۲-۹-۱-تحقیقات پیرامون رنگ های سنتزی و تاثیرات آنها ۴۰

۲-۹-۲-تحقیقات انجام شده پیرامون استخراج رنگ های طبیعی ۴۱

۲-۹-۳-تحقیقات انجام شده در خصوص استخراج رنگ از دانه آناتو و ویژگی های آن ۴۶

۳- فصل سوم (مواد وتجهیزات و روشهای پژوهش) ٤۹

۳-۱-مواداولیه ۵۰

۳-۲-تجهیزات و دستگاههای مورد استفاده ۵۰

۳-۳-روشها ۵۰

۳-۳-۱-بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ آناتو با استفاده از روش RSM ۵۰

۳-۳-۲-استخراج رنگ در مقیاس نیمه صنعتی ۵۲

۳-۳-۳-تعیین بازده وزنی استخراج رنگ ۵۳

۳-۳-۴-تعیین خلوص ۵۳

۳-۳-۵-بازده بیکسین/نوربیکسین ۵۴

۳-۳-۶-آزمونهای شناسایی و تایید ساختار رنگ استخراج شده ۵۵

۳-۳-۷-مطالعه پایداری رنگ آناتو به صورت *Invitro* تحت شرایط نگهداری ۵۶

۳-۳-۸-ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی ۵۸

۴- فصل چهارم (نتایج حاصل از پژوهش) ۵۹

۴-۱-طرح آزمایش بهینه سازی استخراج رنگ از دانه های آناتو به روش ماسراسیون ٦۰

۴-۱-۱-بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده وزنی ۶۲

۴-۱-۲-بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس خلوص رنگ ۶۴

۴-۱-۳-بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده بیکسین/نوربیکسین ۶۶

٤-۲-نتایج آزمونهای تایید ساختار رنگ استخراج شده ٦۷

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۲-۱- آزمون رزونانس مغناطیسی هسته(NMR) ۶۷

۴-۲-۲-آزمون طیف سنجی مادون قرمز (IR) ۶۹

٤-۳- نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو به صورت *invitro*..... ۷۱

٤-٤-نتایج آزمون های حسی پودر آب پنیر حاوی رنگ..... ۷۳

۵- فصل پنجم (بحث و نتیجه گیری) ۷٦

۵-۱-بهینه سازی استخراج رنگ از دانه های آناتو به روش ماسراسیون..... ۷۷

۵-۱-۱-بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده وزنی..... ۷۸

۵-۱-۲-بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس خلوص رنگ..... ۸۰

۵-۱-۳-بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده بیکسین/نوربیکسین..... ۸۱

۵-۱-۴-شرایط بهینه استخراج جهت بیشینه سازی بازده وزنی رنگ آناتو..... ۸۲

۵-۲-نتایج آزمونهای تایید ساختار رنگ استخراج شده..... ۸۲

۵-۳-نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو به صورت invitro..... ۸۲

۵-٤-نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی پودر آب پنیر..... ۸۳

۵-۵- نتیجه گیری..... ۹۲

۵-٦- پیشنهاد پژوهش های آینده..... ۹۲

۶- فهرست منابع..... ۸٦

Archive of SID

www.SID.ir

پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی

Archive of SID

فصل اول

کلیات

www.SID.ir

۱-۱-مقدمه

رنگ، عطر، طعم و بافت جزء مهم‌ترین ویژگی‌هایی هستند که مصرف کنندگان مواد غذایی توجه فراوانی نسبت به آنها نشان می‌دهند. در بین این ویژگی‌ها، رنگ مهم‌ترین خصوصیت ماده غذایی می‌باشد. کیفیت و سلامت مواد غذایی در درجه اول توسط رنگ آنها ارزیابی می شود. امروزه اغلب مواد غذایی در جائی غیر از محل تولید مصرف می‌شوند. بر اساس آمارهای موجود مشخص شده است که در حدود ۷۵ درصد از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته پس از نوعی فرآیند بدست مصرف کنندگان می‌رسند. در نتیجه به دلیل جابجایی و همچنین فرآیندهای صورت گرفته بر روی مواد غذایی افت و کاهش رنگ پدیده ای متداول است، لذا افزودن رنگ به مواد غذایی ضروری است.

امروزه افزودنی‌های رنگی برای ایجاد ظاهر مطلوب و موردپسند مصرف کنندگان، به‌طور گسترده در محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در پژوهش‌های محققان مختلف، اثرات منفی رنگ‌های سنتزی بر سلامتی انسان به اثبات رسیده و نقش آنها در بروز اختلالاتی نظیر کم‌هوشی، بیش‌فعالی در کودکان، بی‌قراری و .... مورد تاکید قرار گرفته است (نیگ و همکاران، ۲۰۱۲؛ لی و همکاران، ۲۰۱۳).

برخلاف رنگ‌های سنتزی، رنگ‌های با منشا طبیعی اثرات سمی، آلرژی‌زایی و سرطان‌زایی نداشته و برای برخی از آنها خصوصیات مفیدی همچون ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی نیز گزارش شده است (سینها و همکاران، ۲۰۱۳)، لذا در سراسر دنیا تمایل زیادی به جایگزینی رنگ‌های طبیعی با افزودنی‌های رنگی سنتزی ایجاد شده و در برخی کشورهای پیشرفته، استفاده از رنگ های سنتزی در محصولات غذایی ممنوع گردیده است. در کشور ما، با توجه به تعداد زیاد واحدهای صنایع غذایی مصرف کننده رنگ، عدم وجود واحدهای تولید کننده رنگ های طبیعی در کشور و بالا بودن قیمت رنگ های طبیعی وارداتی، دستیابی به دانش فنی استخراج رنگ های طبیعی امری ضروری و اجتناب ناپذیر است.

Archive of SID
www.SID.ir

رنگ آناتو (E_{160b}) یکی از قدیمی‌ترین کاروتنوئیدهای طبیعی شناخته شده است که از پریکارپ دانه‌های درخت گرمسیری *بیکسا اورلانا*[1] به دست می‌آید. هرچند در دانه‌های آناتو کاروتنوئیدهای مختلفی شناسایی شده‌اند، اما رنگدانه‌های اصلی آناتو بیکسین و نوربیکسین می‌باشند که بیش از ۸۰ درصد کل محتوی کاروتنوئیدهای آناتو را تشکیل می‌دهند. این رنگدانه‌ها به طرق مختلف استخراج می‌شوند تا عصاره‌های محلول در روغن، سوسپانسیون-های روغنی یا عصاره‌های محلول در آب حاصل شود که هر کدام کاربردهای ویژه خود را دارند (پرستون و ریکارد،۱۹۸۰؛ ساتیانارایانا و همکاران، ۲۰۱۰).

رنگ آناتو دارای طیف رنگ نارنجی تا قرمز می باشد. امروزه رنگ آناتو به‌عنوان یک رنگ طبیعی و سالم، در فرآورده‌های غذایی مختلف مثل مارگارین، کره، فرآورده‌های قنادی، نانوایی، پنیر، بستنی، فراورده های گوشتی داروسازی، تولید مواد آرایشی و ... کاربرد گسترده ای دارد (هنری، ۱۹۹۶). از نقطه نظر اقتصادی، رنگ آناتو دومین افزودنی رنگی طبیعی مورد استفاده در صنعت در دنیاست که پیش بینی می شود روند تقاضا برای آن روز به روز افزایش یابد (لائورو، ۱۹۹۱).

به علت استفاده زیاد از رنگ آناتو در صنعت غذا، بررسی‌های زیادی جهت ایمن بودن رنگ آناتو انجام شده است که نتایج این تحقیقات هیچ گونه اثر منفی ناشی از مصرف رنگ آناتو نشان ندادند (ساتیارایانا و همکاران، ۲۰۰۳؛ آلوز و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین در مقالات مختلف ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی نیز برای آن ذکر شده است (رامامورتی و همکاران، ۲۰۱۱؛ تیبودیو و همکاران، ۲۰۱۰).

دانه آناتو با هزینه ای کم از طریق کشورهایی نظیر هند در دسترس بوده و می تواند برای استخراج رنگ مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به قیمت بسیار بالای رنگ های طبیعی وارداتی، در صورتی که دانش فنی استخراج این رنگ ها با راندمان بالا در دسترس باشد، علاوه بر رفع نیاز صنایع غذایی و دارویی کشور به رنگ های طبیعی، ارزش افزوده بالایی را به همراه خواهد داشت.

در این پژوهش با توجه به عدم وجود اطلاعات و مستندات کافی در خصوص فرایند استخراج رنگ از دانه آناتو در شرایط نیمه صنعتی، در مرحله نخست، تاثیر تیمارهای متفاوت شامل متغیرهای نوع حلال، نسبت دانه به حلال،

[1] *Bixa orellana*.L

Archive of SID
www.SID.ir

دمای استخراج و زمان استخراج بر میزان استخراج رنگ از دانه آناتو مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه‌ی فاکتورهای مورد بررسی استفاده شد، زیرا در این روش به منظور حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کوتاهتری موردنیاز است. لازم به ذکر است که هدف از بهینه‌سازی در این طرح، به حداکثر رساندن مقدار بازده استخراج هم از لحاظ کمی و هم کیفی (میزان خلوص رنگ استحصالی) بوده است. در مرحله بعد پایداری رنگ در شرایط نگهداری مختلف مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت کارایی آن برای سیستم مدل غذایی (پودر آب پنیر) ارزیابی شده است. ارتقاء سطح سلامت عمومی جامعه به ویژه کودکان و نوجوانان و کمک به تولید غذاهای سالم و پیشگیری از شیوع بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان از جمله اهداف انجام پژوهش بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم:

مرور منابع مطالعاتی

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۱-افزودنی های غذایی

افزودنی های غذایی ترکیبات مورد استفاده در صنعت غذا هستند که با هدف بهبود کیفیت، ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و رفع مشکلات تکنولوژیکی تولید مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و شامل طعم‌دهنده‌ها، ترکیبات نگهدارنده، شیرین‌کننده‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، تثبیت‌کننده ها، رنگ‌ها و ... می باشند.

۳-۲- رنگ های خوراکی

رنگ یکی از شاخص‌های بسیار قوی در مبحث زیبایی شناختی است، به طوری که امروزه از آن به عنوان یکی از مشخصات بارز محصولات مختلف یاد می‌شود. در طبیعت بسیاری از موجودات زنده فاقد رنگ می‌باشند و فقط نسبت کوچکی از مواد زنده، مسئول رنگ‌های زیبایی هستند که معمولاً در اطراف ما مشاهده می‌شوند. با این حال عملکرد رنگ‌ها فراتر از زیبایی شناختی است و برخی رنگ‌ها در فرایندهای حیاتی زمین مانند فتوسنتز، محافظت و تکثیر نقش دارند.

در صنعت غذا نیز رنگ‌ها از جمله متداولترین افزودنی‌های هستند که مورد استفاده قرار می‌گیرند. دلایل کاربرد این افزودنی‌ها در محصولات مختلف غذایی را می توان در موارد زیر خلاصه نمود:

۱. جبران رنگ از دست رفته طی فراوری محصولات
۲. ایجاد یکنواختی در رنگ
۳. تشدید رنگ در محصولاتی که بطور طبیعی دارای رنگ می‌باشند.
۴. افزودن رنگ به ماده غذایی فاقد رنگ
۵. بهبود ظاهر مواد غذایی و جلب مشتری (حسینی و همکاران، ۱۳۸۷)

۳-۳-طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی

به طور کلی در طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی دو روش به کار برده می‌شود:

- طبقه بندی برپایه منشاء رنگ خوراکی
- طبقه بندی بر اساس ساختمان شیمیایی رنگ

Archive of SID
www.SID.ir

منشا رنگ خوراکی می‌تواند طبیعی، شبه طبیعی یا مصنوعی باشد. بر اساس این تعریف، رنگ طبیعی رنگی است که از یک سلول زنده تهیه، جمع‌آوری یا ترشح شده باشد. رنگ‌های شبه طبیعی آن دسته از رنگ‌هایی هستند که از طریق واکنش‌های شیمیایی سنتز می‌شوند به گونه‌ای که ساختمان شیمیایی آن‌ها با ساختمان رنگ طبیعی مطابقت دارد. رنگ‌های مصنوعی آن دسته از رنگ‌هایی هستند که به طریق شیمیایی سنتز شده و در طبیعت به صورت طبیعی وجود ندارند.

در طبقه‌بندی رنگ‌های خوراکی بر اساس فرمول شیمیایی، سه مجموعه از ترکیبات شیمیایی برای رنگ‌های خوراکی طبیعی در نظر گرفته شده‌اند که شامل مشتقات ایزوپرنوئیدها، مشتقات تتراپیرول‌ها و مشتقات بنزوپیران‌ها می‌باشند. دسته چهارمی نیز تحت عنوان محصولات مصنوعی به آن افزوده شده که شامل ملانوئیدین‌ها و کارامل‌ها می‌باشد. جدول ۲-۱ تقسیم‌بندی رنگ‌های خوراکی را بر اساس ساختمان شیمیایی نشان می‌دهد.

جدول ۳-۱-طبقه بندی رنگ‌های خوراکی طبیعی بر اساس ساختار شیمیایی

گروه اصلی	زیر گروه
مشتقات ایزوپرنوئیدها	کاروتنوئیدها گزانتوفیل‌ها
مشتقات تتراپیرول	کلروفیل‌ها پورفیرین‌ها
مشتقات بنزوپیران	آنتوسیانین‌ها فلاون‌ها فلاونوئیدها تانن‌ها
ترکیبات شبه طبیعی	ملانوئیدین‌ها کارامل‌ها
ترکیبات دیگر	فلانون‌ها بتالائین‌ها آنتراکینون‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

سازمان غذا و داروی امریکا (FDA) نیز تقسیم بندی دیگری برای رنگ های مورد استفاده در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی ارائه نموده است. بر طبق قوانین FDA رنگ های مجاز به سه دسته تقسیم می‌شوند:

الف-رنگ‌های FD & C[1] : این دسته در غذاها، داروها و مواد آرایشی قابلیت کاربرد دارند.

ب-رنگ‌های D & C[2] : پیگمان‌هایی که در داروها و فرآورده‌های بهداشتی وقتی که در تماس با غشاء مخاطی باشند یا امکان بلعیده شدن آنها وجود داشته باشد، قابلیت استفاده دارند.

ج-رنگ‌های Ext. D & C[3] : به خاطر سمیت این رنگ‌ها در مصرف خوراکی، در فرآورده‌هایی که امکان بلعیده شدن آنها وجود دارد، نمی توانند استفاده شوند ولی در فرآورده‌های با استعمال خارجی می‌توان از آنها استفاده نمود (FDA، ۲۰۱۷).

۳-٤-اهمیت تولید رنگ‌های طبیعی خوراکی از منابع طبیعی در ایران

۳-٤-۱- اهمیت رنگ در افزایش بازارپسندی محصولات غذایی

اولین ویژگی کیفی که توسط یک مصرف کننده مواد غذایی مورد توجه قرار می‌گیرد، خصوصیت ظاهری محصول می‌باشد. در حقیقت مصرف‌کننده قبل از داشتن هرگونه اطلاعی از سایر خصوصیات ماده غذایی از قبیل طعم و یا بوی آن، در درجه اول ظاهر محصول را مورد توجه قرار می‌دهد. بنابراین ظاهر مواد غذایی عامل مهم و تعیین کننده‌ای است که به خصوص در اولین بار خرید یک محصول یا عدم خرید آن، نقش اساسی را ایفا می‌کند. یکی از مهمترین عوامل ظاهری رنگ محصولات می باشد که عامل موثر در جلب نظر و انتخاب ماده غذایی است. در واقع رنگ باعث جذابیت ماده غذایی بوده و نشانگر کیفیت می‌باشد (مشرف بروجنی، ۱۳۸۶). اگر چه ممکن است از نظر خصوصیات فیزیکوشیمیایی بین ترکیبات موثر در رنگ و عطر و طعم مواد غذایی رابطه علمی وجود نداشته باشد، ولی نتایج آزمایش‌های چشائی نشان می‌دهد که در اکثر موارد رنگ مطلوب، بر احساس عطر و طعم ماده غذایی اثر مثبت و قابل ملاحظه‌ای دارد (دلگادو و اکتاویو، ۲۰۰۳).

[1] Food, Drug and cosmetic
[2] Drug and cosmetic
[3] Externally applied Drug and cosmetic

Archive of SID
www.SID.ir

۳-٤-۲- کاربرد گسترده رنگ‌ها در صنایع غذایی

رنگ‌ها کاربرد وسیعی در صنایع غذایی مختلف اعم از صنایع تولید کیک و شیرینی، بستنی‌ها و دسرهای منجمد، اسنک‌ها، نوشیدنی‌ها، صنایع شکلات‌سازی و... دارند. انتخاب رنگ مناسب در مواد غذایی بهترین تبلیغ برای مصرف است. جدول ۲-۲ اهمیت و گستره وسیع کاربرد برخی از رنگ‌های مجاز را در صنایع غذایی نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود از انواع رنگ‌ها در گستره وسیعی از محصولات غذایی که رژیم غذایی عموم مردم را تشکیل می‌دهد استفاده می‌شود.

جدول ۳-۲ دامنه کاربرد برخی از رنگ‌های مجاز خوراکی در فرآورده‌های غذایی مختلف

نام رنگ	فرآورده‌های غذایی مختلف
بتا کاروتن	انواع نوشیدنی‌ها، غلات صبحانه، کره، آب نبات، کنسرو میوه جات، فرآورده‌های لبنی، آدامس، فرآورده‌های قنادی، سس‌ها، غذاهای رژیمی، فرآورده‌های گوشتی، تخم مرغ، دسرها، روغن‌های نباتی، مربا، مارمالاد، انواع سوپ‌های آماده و فرآورده‌های تخمیری سبزیجات.
سان ست یلو	انواع نوشیدنی‌ها، غلات صبحانه، آدامس، فرآورده‌های لبنی، شکلات، فرآورده‌های قنادی، فرآورده‌های گوشتی، نوشیدنی بر پایه لبنی، فرآورده‌های غلات، کیک‌ها، دسرها، فرآورده‌های تخمیری سبزیجات، تخم مرغ، پاستیل‌ها، مربا، مارمالاد، ژله، ماکارونی، سس‌ها و محصولات مشابه، انواع مختلف اسنک و انواع سوپ‌های آماده.
بیت رد	نوشابه‌های لبنی(شیر کاکائو، دوغ و ...)، فرآورده‌های یخی، آب میوه‌ها، ماءالشعیر، غذاهای رژیمی، سس‌ها و ماکارونی.
برلیانت بلو	نوشیدنی‌های لبنی، دسرها، ابمیوه‌ها، اسنک‌ها، نوشابه‌ها، آدامس و فرآورده‌های یخی.
کارامل	پودر شیر و خامه، دسر برپایه لبنی، میوه‌های فرآوری شده، فرآورده‌های قنادی، ماکارونی، خمیرمایه و مأ الشعیر.
ریبوفلاوین‌ها	آب نبات، کمپوت میوه، آدامس، نوشابه‌های انرژی زا، غذاهای نیمه آماده، اسنک‌ها، فرآورده‌های گوشتی، سس‌ها و محصولات مشابه، مربا، ژله، مارمالاد و دسرهای میوه‌ای.
دی اکسید تیتانیوم	پودر شیر و خامه، نوشیدنی‌های لبنی، آب پنیر، فرآورده‌های یخی، فرآورده‌های غلات، مأ الشعیر، خمیرترش، غذاهای نیمه آماده و فرآورده‌های قنادی.

منبع: فائو،۲۰۱۴

Archive of SID

www.SID.ir

۳-٤-۳- اهمیت رنگ‌های طبیعی و مضرات رنگ‌های سنتزی از دیدگاه سلامت عمومی

صنعت غذا، طی سالیان متمادی به منظور بهبود ویژگی‌های مورد نظر مصرف‌کننده از انواع مختلف مواد افزودنی نظیر رنگ‌های مصنوعی، شیرین‌کننده‌های مصنوعی، طعم‌دهنده‌ها، مواد معطر، مواد سفیدکننده، مواد نگهدارنده و بافت‌دهنده در محصولات صنعتی استفاده می‌کند که متاسفانه برخی از این مواد به‌شدت برای سلامتی انسان مضر است. لازم به ذکر است اثرات برخی از این مواد خفیف بوده و اختلالات و عوارض ناشی از آنها با مصرف مستمر و طولانی‌مدت و به‌تدریج بروز نموده و سلامت افراد به ویژه گروه‌های آسیب پذیر جامعه (کودکان و نوجوانان) را با خطرات جدی روبه‌رو می‌سازند. رنگ‌های مصنوعی که در نوشیدنی‌های گازدار، آب‌نبات‌ها، غلات صبحانه، ژله‌ها و بسیاری از محصولات دیگر به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، جزو این دسته از افزودنی‌ها هستند که بیشتر به منظور جذب مشتری، پوشش دادن رنگ واقعی محصول و تشدید رنگ در ماده غذایی کاربرد دارند (هنری، ۱۹۹۶).

طبق تحقیقات انجام شده توسط محققان انگلیسی، رنگ‌های مصنوعی باعث تشدید ناآرامی و بی‌قراری در کودکان ۳ تا ۹ ساله می‌شوند. نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی ۳۰۰ کودک توسط آنها نشان می‌دهد که وقتی کودکان از آب میوه‌های حاوی رنگ دهنده‌های سنتزی موجود در بازار استفاده می‌کنند تغییرات جدی و مهمی در رفتار آنها شامل بیش فعالی غیرطبیعی و بی‌قراری بروز می‌کند (مک کان و همکاران، ۲۰۰۷).

تیم تحقیقات استیونسون که تاثیرات افزودنی‌های خوراکی را بر روی کودکان به مدت چند سال مطالعه کرده‌اند، آزمایشات خود را بر روی دو گروه کودکان ۳ ساله و کودکان ۸ تا ۹ ساله انجام دادند. نتایج آنها نشان داد با حذف کردن افزودنی‌های مصنوعی از مواد خوراکی، از انواع رفتارهای ناآرام و بی‌قرار کودکان جلوگیری می‌شود (مک کان و همکاران، ۲۰۰۷).

محققان دانشگاه سوت همپتون بیان کردند هفت افزودنی رنگ‌دهنده سنتزی از قبیل تارترازین، زرد کوینولین، زرد سانست‌یلو، کارمویسین، پونسائو و قرمز آلورا باعث آسیب رشدی و کاهش قدرت تمرکز شده و

Archive of SID
www.SID.ir

ضریب هوشی کودکان را تا پنج نمره کاهش می‌دهد. همچنین این مواد رنگی غذایی باعث ایجاد مشکلات رفتاری در کودکان مثل تغییر خلق و خوی، بیش فعالی و واکنش‌های آلرژیک می‌شوند.

اخیرا محدودیت‌های بسیاری از جانب سازمان‌های بین المللی و انستیتوهای تحقیقاتی مانند انستیتو ملی سرطان در مورد استفاده از رنگ‌های مصنوعی خوراکی بیان شده است (نیچنامتلا و همکاران، ۲۰۰۶). لذا درسطح جهانی مطالعه و جستجو برای یافتن پیگمان‌های طبیعی مناسب به‌عنوان رنگ افزودنی آغاز شده است. پیگمان‌های طبیعی اثرات سوء ذکر شده برای رنگ‌های مصنوعی را نداشته و در تحقیقات مختلف تاثیرات مثبت آنها بر سلامت عمومی به دفعات مورد تائید قرار گرفته است (زند، ۱۳۸۱).

آنتوسیانین‌ها که از مهمترین رنگدانه‌های طبیعی گیاهی در صنعت غذا می‌باشند در کنار خاصیت رنگ‌دهی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و نقش حیاتی در جلوگیری از بروز بیماری‌های قلبی- عروقی، عصبی، سرطان و دیابت ایفا می‌کنند. همچنین برای آنتوسیانین‌ها خصوصیات ضد التهابی، پایداری جدار مویرگ‌ها و کاهش نفوذ پذیری عروق در منابع علمی ذکرشده‌است (هنری، ۱۹۹۶).

کاروتنوئیدها نیز به عنوان عوامل ضدسرطان، افزایش‌دهنده طول عمر و بازدارنده زخم معده و بیماری‌های قلبی- عروقی معرفی شده‌اند. بطوری‌که انستیتو ملی سرطان ایالات متحده امریکا مصرف غذاهای حاوی مقادیر زیاد کاروتنوئید را در رژیم غذایی روزانه توصیه نموده‌است (هنری، ۱۹۹۶).

۳-٤-٤- آمار بالای واردات و خروج ارز از کشور

برابر آمار تهیه شده از شرکت‌های واردکننده مواد افزودنی، قیمت رنگ‌های طبیعی وارداتی بالا بوده و از این طریق ارز فراوانی از کشور خارج می شود. طبق گزارش اداره گمرک جمهوری اسلامی ایران در سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ جمعا در حدود ۱۳۴,۷۹۹,۱۲۷,۴ هزار ریال به صورت ارز بابت رنگ های خوراکی و غیرخوراکی وارداتی از کشور خارج شده‌است. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان واردات این مواد سیر صعودی دارد. در سال ۹۱ ارزش دلاری رنگ های خوراکی طبیعی وارد شده به کشور حدود ۳/۵ میلیون دلار بوده است که با احتساب قیمت دلار برابر ۳۵۰۰۰ ریال، ارزش ریالی آن بیش از ۱۲۰ میلیارد ریال برآورد می گردد. لازم به ذکر است که برخی رنگ

Archive of SID
www.SID.ir

های طبیعی با تعرفه های نسبتا پایینی ازکشورهای چین و هند وارد می شوند که متاسفانه در بخشی از این مواد فلزات سنگین وجود دارد که برای سلامتی زیان آور می باشند. بالا بودن قیمت رنگ‌های طبیعی وارداتی و به موازات آن خروج ارز فراوان از این طریق، اهمیت تولید این افزودنی ها با بهره گیری از دانش فنی و تولید داخلی در کشور را نشان می دهد.

جدول۲-۳) تعرفه شماره ۳۲۰۳۰۰۰۰ : رنگ کننده با منشا گیاهی یا حیوانی

واردات ۱۳۹۲ (ماخذ: آمارنامه اتاق بازرگانی)

ردیف	نام کشور	وزن - کیلو گرم	ارزش - ریال	ارزش - دلار
۱	دانمارک	۱۴۰,۶۷۶	۸۷,۰۴۸,۲۲۳,۶۸۰	۳,۴۷۶,۲۸۲
۲	چین	۳۲,۴۰۰	۴۰,۴۲۲,۳۰۹,۳۹۳	۱,۶۲۷,۵۶۱
۳	امارات متحده عربی	۴,۱۲۰	۹,۹۱۶,۹۹۶,۳۴۵	۳۹۹,۴۴۸
۴	فرانسه	۸,۸۷۵	۹,۲۶۸,۶۲۰,۶۸۸	۳۶۲,۱۷۰
۵	لوگزامبورگ	۱,۵۲۰	۵,۵۳۰,۳۷۴,۳۹۷	۲۲۳,۰۶۶
۶	آلمان	۱۲,۱۴۹	۵,۲۲۱,۳۴۷,۵۸۳	۲۱۰,۳۰۶
۷	اسپانیا	۴,۰۲۸	۳,۹۱۸,۵۹۶,۲۹۱	۱۵۷,۹۰۶
۸	ایتالیا	۳,۰۰۰	۱,۸۸۷,۵۵۷,۳۸۰	۷۵,۸۶۳
۹	پرو	۲,۷۰۰	۱,۳۷۱,۷۸۰,۵۰۷	۵۵,۵۱۲
۱۰	هند	۲۱,۰۰۰	۱,۱۰۱,۱۷۹,۸۶۰	۴۴,۳۲۵
۱۱	سوئیس	۵,۰۰۰	۶۷۴,۰۸۰,۰۰۰	۲۷,۱۹۲
۱۲	بلژیک	۵,۰۷۰	۴۳۷,۹۵۲,۰۴۸	۱۷,۶۶۷
۱۳	ترکیه	۲,۰۰۰	۴۳۳,۴۲۱,۴۲۵	۱۷,۴۸۳
۱۴	افغانستان	۵,۸۵۹	۹۴,۸۰۷,۲۶۲	۳,۸۲۷
			مجموع کل: ۱۶۷,۳۲۷,۲۴۶,۸۶۰ ریال	**مجموع کل: ۶,۶۹۸,۶۰۷ دلار**

واردات ۱۳۹۳ (ماخذ: آمارنامه اتاق بازرگانی)

Archive of SID

www.SID.ir

ردیف	نام کشور	وزن - کیلو گرم	ارزش - ریال	ارزش - دلار
۱	دانمارک	۷۴,۷۶۷	۵۲,۷۹۰,۵۴۵,۰۸۲	۲,۰۱۸,۴۴۲
۲	هند	۲۸,۳۹۰	۲۳,۳۸۲,۸۲۲,۲۷۷	۸۸۵,۶۴۸
۳	لوگزامبورگ	۵,۹۷۵	۱۹,۹۰۶,۹۷۶,۴۵۷	۷۵۲,۴۴۵
۴	اسپانیا	۶,۷۷۵	۵,۰۶۲,۵۹۷,۰۲۱	۱۹۱,۶۷۴
۵	چین	۱۰,۰۰۰	۴,۷۷۲,۱۹۷,۰۶۹	۱۸۷,۰۱۳
۶	فرانسه	۵,۳۰۵	۴,۶۳۶,۴۰۷,۸۱۹	۱۷۷,۵۴۴
۷	آلمان	۱۹,۹۹۰	۳,۵۰۶,۷۷۵,۷۹۷	۱۳۳,۸۴۸
۸	امارات متحده عربی	۲,۴۶۵	۲,۹۹۱,۶۴۹,۳۲۳	۱۱۳,۶۷۷
۹	اتریش	۷۰۰	۹۴۵,۶۸۶,۵۶۵	۳۶,۳۷۱
۱۰	سوئیس	۵,۰۰۰	۷۹۶,۰۸۸,۰۰۰	۳۰,۴۲۳
۱۱	ایتالیا	۶۰۰	۱۴۸,۷۱۴,۲۷۲	۵,۸۳۲
			مجموع کل: **۱۱۸,۹۴۰,۴۵۹,۶۸۲ ریال**	**مجموع کل:** **۴,۵۳۲,۹۱۶ دلار**

۳-٤-۵- تاکید استاندارد ملی ایران به لزوم استفاده از رنگ‌های طبیعی در محصولات غذایی

همگام با موج جهانی ایجاد شده در جایگزینی رنگ‌های سنتزی با طبیعی، دستگاههای نظارتی کشور ما نیز با وضع قوانینی کاربرد رنگ های طبیعی را در انواع فراورده های غذایی مورد تشویق قرار می‌دهند. به عنوان مثال، در استاندارد ملی شماره ۲۸۸۰ افزودن هرگونه رنگ و اسانس مصنوعی به فراورده‌های حجیم‌شده بر پایه بلغور و آرد ذرت ۱۳۸۹ غیرمجاز اعلام گردیده است و بر استفاده از رنگ های طبیعی تاکید شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲-۴) ویژگی های فراورده‌های حجیم‌شده بر پایه بلغور و آرد ذرت، استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۸۰

ردیف	ویژگی	مقدار قابل قبول / عملیات
۱	رطوبت (درصد وزنی)	بیشینه ۳
۲	پروتئین (درصد وزنی بر مبنای ماده خشک)[1]	کمینه۶/۷(ضریب پروتئین۶/۲۵)
۳	چربی (درصد وزنی بر مبنای ماده خشک)	کمینه ۲۰
۴	نمک (درصد وزنی بر مبنای ماده خشک)	بیشینه۱/۵
۵	خاکستر غیر محلول در اسید (درصد وزنی بر مبنای ماده خشک)	بیشینه۰/۰۷
۶	اندیس پراکسید چربی استخراجی (بر حسب میلی اکی والان در کیلوگرم)	بیشینه ۲
۷	اسیدیته چربی استخراجی (درصد وزنی بر حسب اسید اولئیک)	بیشینه۰/۲
۸	رنگ های طبیعی مجاز خوراکی	بر اساس عملیات خوب ساخت[2]
۹	ازت کل فرار (TVN)[3]	بیشینه ۱۲

۳-٤-٦- محدود بودن پژوهش‌های انجام‌شده پیرامون تولید رنگ‌های طبیعی در ایران

بررسی منابع علمی نشان می‌دهد که درباره تولید رنگ‌ها برای استفاده در فرآورده‌های غذایی در کشور مطالعات چندانی صورت نگرفته است. برخی محققان در دانشگاه‌ها و یا مراکز تحقیقاتی کشور مطالعات محدودی را در ارتباط با تولید رنگ ها انجام داده‌اند که هیچکدام از آنها تاکنون به فناوری تولید منجر نشده است. بنابراین لزوم تحقیقات مربوط به تولید رنگ ها در کشور بیشتر احساس می شود.

۳-٤-۷- منابع طبیعی بالقوه موجود در ایران جهت استخراج رنگ‌های خوراکی

کشور ایران به اقتضای برخورداری از شرایط اقلیمی متنوع و امکان رشد انواع گونه‌های گیاهی و پوشش نباتی مختلف، تولیدات کشاورزی متنوع و وفور ضایعات صنایع تبدیلی، دارای پتانسیل‌های فراوانی برای صنعت استخراج رنگ می‌باشدکه متاسفانه این توان ملی تاکنون مورد توجه جدی قرار نگرفته است.

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۵-رنگ های طبیعی مجاز خوراکی قابل استفاده در انواع محصولات غذایی مطابق با استاندارد ملی ایران

در کشور ما استاندارد رنگ‌های مجاز خوراکی نخستین بار در سال ۱۳۵۵ با شماره ۷۴۰ تهیه شد. براساس پیشنهادهای رسیده و بررسی و تائید کمیسیون فنی صنایع غذایی، چهار بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در یکصد و چهل و یکمین جلسه کمیته ملی استاندارد فراورده‌های کشاورزی و غذایی مورخ ۷۳/۹/۳۰ تصویب شد و هم اکنون به عنوان استاندارد رسمی ایران مورد استناد می‌باشد. در جدول۲-۵ اطلاعات مربوط به رنگ‌های طبیعی خوراکی مجاز در مواد غذایی و حدود استفاده آن‌ها بر اساس استاندارد رسمی ایران ارائه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲-۵) رنگ‌های طبیعی خوراکی مجاز در استاندارد ملی ایران، ISIRI 740

نوع رنگ	نام مترادف	میزان دریافتی روزانه قابل قبول (ADI)	شماره بین المللی رنگ (INS)
آنتوسیانین	آنتوسیانس	مشخص نشده است.	۱۶۳۰
رنگ قرمز چغندر[1]	کنسانتره آب چغندر قرمز خوراکی ـ بتانین	محدود نشده است.	۱۶۲
زعفران	کروکوس[2] ـ رنگ زرد طبیعی شماره۶	زعفران به عنوان ماده غذائی محسوب می‌گردد.	---
رنگ قرمز کارمین‌ها	کارمین، کوچینال، کارمینیک اسید و رنگ قرمز طبیعی شماره ۴	صفر تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن*	۱۲۰
زردچوبه	زعفران هندی، پودر زردچوبه و تمولاماژ	---	۱۰۰۱۱
کورکومین	دی فرویل متان	---	---
رنگ الکانت والکانین	رنگ قرمز طبیعی شماره۲۰ – الکانا	مشخص نشده است.	۱۰۳
کلروفیل	رنگ طبیعی سبز به شماره ۳	محدود نشده است.	۱۴۰
کمپلکس مس کلروفیل	---	از صفر تا ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۴۱i
کمپلکس مس کلروفیلین (نمک‌های سدیم و پتاسیم آن)	کلروفیلین مس ـ سدیم و کلروفیلین مس پتاسیم	صفر تا ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۴۱ii
ریبوفلاوین	لاکتوفلاوین ـ ویتامین B2	صفر تا ۰/۵میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن	۱۰۱i
بتاکاروتن	---	از صفر تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۶۰ai
رنگ آناتو	---	صفر تا ۰/۰۶۵ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۶۰b
رنگ بتاآپوکاروتنال	---	از صفر تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۶۰e
رنگ بتاآپو ـ '۸ ـ کاروتنوئیک اسید (استرهای اتیل یامتیل آن)	L-Orange 9	از صفر تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۶۰f

[1] - beet red
[2] - crocus

Archive of SID

www.SID.ir

نوع رنگ	نام مترادف	میزان دریافتی روزانه قابل قبول (ADI)	شماره بین المللی رنگ (INS)
کربن گیاهی[1]	کربن سیاه،کربن داروئی، Benzol ,Gas Black 6 and 7, Black C.I. Pigment Black	مشخص نشده است.	۱۵۳
کارامل نوع اول (Caramel I – Plain)	کارامل اسپیریت[2]،کارامل کاستیک[3] و کارامل ساده	مشخص نشده است.	۱۵۰a
کارامل نوع دوم (Caustic Sulfite Process)	---	مشخص نشده است.	۱۵۰b
کارامل نوع سوم (Ammonia Process)	کارامل نوشیدنی‌ها، کارامل ماءالشعیر و آمونیاکارامل[4]	صفر تا ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم صفر تا ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بر اساس ماده جامد.	۱۵۰c
کارامل نوع چهارم (Sulfite Ammonia – Process)	کارامل نوشابه، کارامل مقاوم به اسید[5]	صفر تا ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم صفر تا ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بر اساس ماده جامد.	۱۵۰d
دی اکسید تیتانیوم	---	محدود نشده است.	۱۷۱
کارتاموس زرد[6]	گلرنگ زرد (کارتامین)	مشخص نشده است.	---

۳-۶-آناتو

واژه‌ی «آناتو» به مجموعه‌ای از رنگ‌های ساخته شده از رنگدانه‌هایی از نوع کاروتنوئید که از دانه‌های بوته-ی *Bixa orellana L* استخراج شده، اطلاق می شود. آزتک‌ها گیاه آناتو را آچیوت[7] نامیدند ولی این نام بعدها به

[1]- vegetable carbon
[2]- spirit caramel
[3]-caustic caramel
[4]- ammonia caramel
[5]- poorf caramel-acid
[6]- carthamus yellow
[7]-Achiote

Archive of SID
www.SID.ir

Bixa orellana تغییر کرد که به افتخار فرانسیسکو دی اورلانا که در قرن ۱۶ رودخانه آمازون را کشف کرده بود، نام‌گذاری شده بود. آناتو همچنین با نام‌های اُرلین[1] و روکو[2] نیز شناخته می‌شود.

در میان رنگ‌های طبیعی، آناتو از نظر اقتصادی در رتبه دوم مصرف در دنیا قرار دارد (لائورو، ۱۹۹۱) و حدود ۷۰ ٪ تمام رنگ دهنده‌های طبیعی مورد استفاده را به خود اختصاص می‌دهد. حدود ۸۰ ٪ تولید آناتو دنیا به آمریکا و اروپای شرقی فرستاده می‌شود که بین ۱۰۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ تن در سال تخمین زده شده است (فائو، ۱۹۹۵). استفاده از دانه آناتو در پخت به استفاده از آن به عنوان چاشنی برای غذاهای سنتی و دادن رنگ قرمز به نوشیدنی‌ها برمی‌گردد (واسکواز، ۱۹۸۸). عمده مصرف آناتو جهت ایجاد رنگ زرد- نارنجی به کره، مارگارین، بستنی و بعضی از پنیرها مثل چدار، کلبی[3] و ... به کار می‌رود (بوید، ۲۰۰۰). کاربردهای رنگ طبیعی آناتو برای محصولاتی مانند آرد، فراورده‌های قنادی، ماهی، فرآورده‌های گوشتی، نوشیدنی‌ها و فرآورده‌های پخت و اسنک‌ها نیز گزارش شده است.

از ویژگی‌های دیگر آناتو (علاوه بر رنگ‌دهی) می‌توان به کاربرد آن در معالجه بیماری‌های مختلف، ویژگی ضدمیکروبی و خواص آنتی اکسیدانی اشاره کرد (هنری، ۱۹۹۶).

۳-۶-۱- ویژگی‌های گیاه‌شناسی آناتو

گیاه آناتو یک بوته همیشه سبز است که تا ارتفاع ۳ تا ۶ متر و قطر تنه ۱۰ سانتی‌متر رشد می‌کند. میوه‌ها غلاف‌های خاردار نرم هستند که در انتهای خوشه بوجود می‌آیند و هنگام رسیدن، غلاف‌ها ترک برمی‌دارد و ۲۰ الی ۵۰ دانه رسیده در مرکز غلاف که اندازه‌ای حدود اندازه دانه انگور دارند و با یک لایه‌ی قرمز خمیر مانند ضخیم پوشیده شده است یافت می‌شود. این گیاه عمدتا بومی مناطق گرمسیری و مرکزی آمریکای جنوبی است (راجندران، ۱۹۹۰) (شکل ۲-۱).

[1] Orlean
[2] Rocou
[3] Colby

Archive of SID
www.SID.ir

شکل۲-۱) دانه‌های آناتو

گیاه آناتو دو نوع واریته مختلف دارد : *Bixa orellana var. leiocarpa* و *Bixa orellana var. urucurana* . این دو واریته در ساختار میوه متفاوتند، که اولی سطح نرمی دارد در حالی که دومی خارهای انعطاف پذیر در سطح خود دارد (اُچوآ، ۱۹۹۹).

گیاه آناتو در مناطق گرم، هوای مرطوب که بارش ۲۰۰۰-۱۵۰۰ میلی‌متر در سال و محدوده‌ی دما بین ۲۴ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است کاشته می‌شود. آناتو یک گیاه کم توقع است و در هر مکان مرطوب و گرم با مراقبت پائین رشد می‌کند. درخت آناتو دارای سرعت رشد بالا است که می‌تواند بعد از یک سال گل دهد، اما سه تا چهار سال طول می‌کشد تا به بیشترین میزان تولیدش برسد و این میزان تولید می‌تواند تا ۲۰ سال ادامه یابد. هر درخت بالغ می‌تواند ۰/۵ تا ۴ کیلوگرم دانه بدهد. هر هکتار زمین کاشته شده با آناتو می‌تواند ۱۵۰۰- ۹۰۰ کیلوگرم دانه آناتو در سال تولید کند.

۳-۶-۲- ترکیبات پریکارپ دانه آناتو

پریکارپ دانه آناتو، شامل ۵ درصد از وزن دانه است و منشا اصلی رنگدانه ها می باشد. آناتو دارای باندهای دوگانه کونژوگه که نقش کروموفور دارند، می باشد که رنگ خاص قرمز- نارنجی بیکسین و رنگ نارنجی- زرد نوربیکسین را ایجاد می‌کنند. کاروتنوئید سیس بیکسین که بصورت ۹′ سیس بیکسین یا α- بیکسین نیز شناخته می‌شود، عمده ترکیب استخراجی پریکارپ است که حدود ۸۰ درصد کاروتنوئیدها را تشکیل می‌دهد و ۲۰ درصد

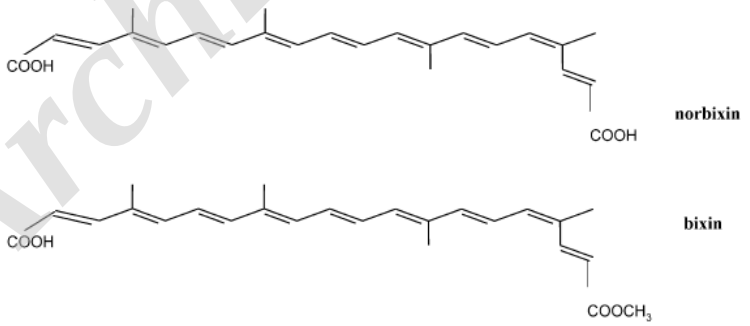
Archive of SID
www.SID.ir

باقیمانده شامل نوربیکسین، چندین آپوکاروتنوئید، ترکیبات فرار و دیگر مواد نامشخص است. اگر چه کل رنگدانه‌ی تولیدی می‌تواند از درختی به درخت دیگر متفاوت باشد (فائو، ۱۹۹۵).

دانه آناتو دارای عطری شبیه به جوز هندی و مزه تند و کمی شیرین است که عطر آن به حضور هیدروکربن‌های سس کوئی ترپن تری سیکلیک مرتبط می باشد.

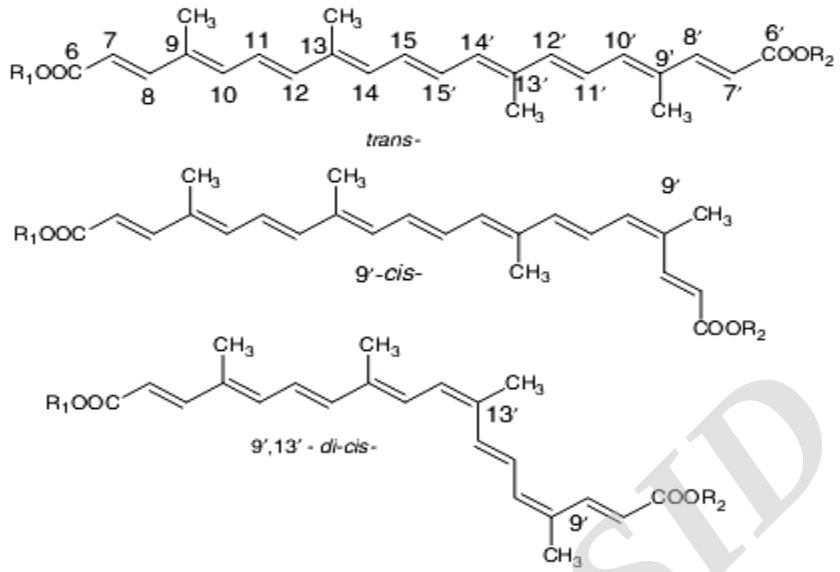
۳-۶-۳- ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی رنگدانه‌های آناتو

بر خلاف کاروتنوئیدهای معمولی که C_{40} هستند، بیکسین یک دی آپوکاروتنوئید منحصر به فرد C_{25} است که در حالت طبیعی به فرم ایزومر سیس بوده و یکی از گروههای کربوکسیلیک اسید آن متیله شده است . سیستم طویل باندهای دوگانه کونژوگه موجود در ساختار بیکسین مسئول رنگ قرمز و نیز مقاومت ضعیف مولکولی آن در شرایط فرایند و نگهداری مثل دمای بالا، نور و اکسیژن است (باربوزا و همکاران، ۲۰۰۵). با این حال بیکسین و نوربیکسین نسبت به سایر کاروتنوئیدها مقاومت حرارتی خوبی طی فراوری نشان می دهند که به دلیل ساختمان آپوکاروتنوئیدی آنها است (فریرا و همکاران، ۲۰۱۳).



شکل۲-۲) ساختار شیمیایی بیکسین و نوربیکسین

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲-۳) ساختارهای شیمیایی برخی از ایزومرهای بیکسین/نوربیکسین؛ R_1=H و R_2=H = نوربیکسین ؛ R_1=H و R_2=CH3 = بیکسین

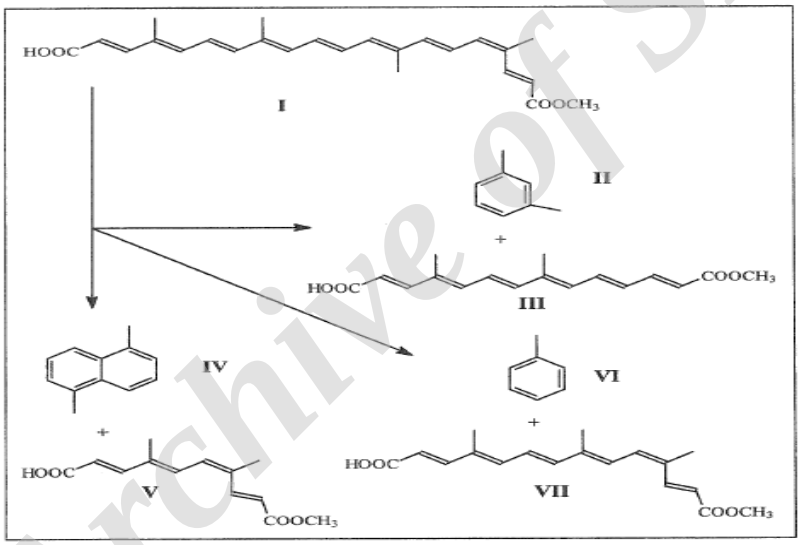
وزن مولکولی بیکسین ($C_{25}H_{30}O_4$) ۳۹۴/۵ گرم بر مول است و اولین کاروتنوئید یافت شده است که از لحاظ هندسی دارای ایزومر می باشد (کارر، ۱۹۲۹). بیکسین دارای رنگ نارنجی و آماده تبدیل به فرم ایزومری ترانس بیکسین در حرارت‌های بالا است که پایداری بیشتری نسبت به حرارت دارد و دارای رنگ قرمز می‌باشد. عصاره‌های روغنی بیکسین در حرارت‌های بالا به رنگ زرد تبدیل می‌شود که در اغلب موارد نامطلوب است.

نوربیکسین ($C_{24}H_{28}O_4$) فرم محلول در آب رنگدانه است. این رنگدانه وزن مولکولی ۳۸۰/۵ گرم بر مول دارد و می‌تواند بوسیله‌ی صابونی شدن گروه استر بیکسین با یک قلیا تهیه شود. نوربیکسین به مقدار کمی در پریکارپ یافت می‌شود و آن‌هم عمدتا به فرم سیس اما می‌تواند چندین فرم ایزومری ایجاد کند نوربیکسین جزء عمده محلول در آب، عصاره‌های آناتو است و وقتی رقیق شود مجموعه‌ای از رنگ‌های در محدوده‌ی نارنجی تا زرد را ایجاد می‌کند و نامحلول در روغن‌های گیاهی بوده و اتصال آن به کازئین پنیر شناخته شده است (بارنیکوت، ۱۹۳۷). بیکسین و نوربیکسین از واحدهای ایزوپرن ساخته شده‌اند و هر دو در مجموعه آپوکاروتنوئیدها قرار می-گیرند.

Archive of SID
www.SID.ir

فرآورده حاصل از فرایند حرارتی آناتو، رنگدانه زرد رنگ ۱۷ کربنه ۸،۴، دی متیل تترا دکا هگزان اِن دیویک اسید مونو متیل استر می باشد که در شکل ۲-۴ نشان داده شده است. ایورسن و لام (۱۹۵۳) اولین بار این ترکیبات را در عصاره آناتو توصیف کردند اما تا سال ۱۹۶۵ ساختار آنها مشخص نشده بود (مک کوئن، ۱۹۶۶).

دمای استخراج رنگ آناتو در تعیین تعادل قرمز- زرد عصاره‌ی نهایی نقش کلیدی دارد. گزارش شده گونه-های ۱۷ کربنه و دیگر ترکیبات زرد رنگ نامشخص تا ۴۰ درصد محصولات تجاری محلول در روغن آناتو را تشکیل می‌دهند (ریث و گیلن، ۱۹۷۱). تشکیل ترکیبات ۱۷ کربنه عمدتا بواسطه تجزیه سیس بیکسین و با رها-سازی Toluene و m-xylene تشکیل می‌شوند.



9'*cis*-bixin (I); m-xylene (II) and C17 yellow degradation compound, MW 288 g/mol (III); dimethyldihydronaphtalene (IV) and C_{13} tetraene (V); toluene (VI) and C_{18} polyene (VII) (Scotter 1995).

شکل۲-۴) محصولات حاصل از تجزیه حرارتی ′۹ سیس بیکسین

سایر کاروتنوئیدهای شناسایی شده در دانه آناتو شامل بتاکاروتن، لوتئین، زئاگزانتین، کریپتوگزانتین و متیل بیکسین هستند. کاروتنهای معروف C_{40} فیتوئن، فیتوفلوئن، اکسی کاروتن و نروسپورن نیز شناسایی شده‌اند. همچنین دانه دارای گرانیل گرانیول (یک الکل ترپنیC_{20})، الکل ها، کتون ها، استرها، آلکان‌ها، آلکنها، اسیدهای هتروسیکلیک، منوترپن‌ها (لینالول، گرانیول)، سس کوئی ترپن ها است. از نظر تغذیه ای دانه آناتو حاوی مقادیر

Archive of SID
www.SID.ir

نسبتا بالای پروتئین ۱۷-۱۳٪، فیبر خام بالا ۱۶٪، فسفر زیاد و کلسیم کمی است. پروتئین آناتو حاوی سطوح کافی تریپتوفان و لیزین است اما از نظر متیونین، ایزولوسین، لوسین و ترئونین ضعیف می باشد.

۳-٦-٤- روش‌های متداول استخراج رنگدانه آناتو

استفاده عمده از آناتو در کشورهای توسعه یافته، استفاده از رنگ حاصل از پریکارپ آن است که به سه شکل قابل استخراج می باشد:

۱- Water extracs : نوربیکسین، رنگدانه محلول در آب است که حاصل صابونی شدن کامل عصاره حاوی بیکسین می باشد. عصاره‌های محلول در آب اغلب «رنگ پنیر» نامیده می‌شوند و محلول پتاسیم هیدروکسید به عنوان رقیق‌کننده استفاده می‌شود. محلول‌های قلیایی شامل ۴ – ۰/۵ درصد نوربیکسین به شکل تجاری متداول می باشند که در نتیجه هیدرولیز قلیایی بیکسین حاصل می‌شوند. در ایالات متحده، رنگ ۱/۴ درصد نوربیکسین قدرت واحد[1] و ۲/۸ درصد نوربیکسین قدرت مضاعف[2] نامیده می‌شود. در انگلستان محلول شامل ۰/۵درصد نوربیکسین قدرت واحد و محلول ۱ درصد نوربیکسین قدرت مضاعف در نظر گرفته می‌شود (هنری، ۱۹۹۶).

دو روش برای ایجاد عصاره محلول در آب توصیف شده است. روش اول شامل استخراج پریکارپ دانه آناتو با ۲ درصد سدیم یا پتاسیم هیدروکسید در دمای پائین‌تر از ۷۰ درجه سانتیگراد است. در روش دوم، بیکسین حاصله از استخراج با حلال، هیدرولیز قلیایی شده و نمک نوربیکسین حاصل می‌شود. بهالکار و بوباش (۱۹۸۳) گزارش کردند که نسبت مناسب برای استخراج با حلال کلروفرم : اتانول (۷۵:۲۵) است که تا ۷۶ درصد کل رنگدانه استخراج می‌کند و برای روش اول این محققان، محلول ۰/۴ سدیم کربنات و ۵ ساعت همزدن را برای بدست آوردن بیشترین میزان رنگدانه (حدود ۷۳/۹ درصد از کل رنگدانه)، توصیه نموده‌اند.

۲ – Oil extracts : عصاره دانه آناتو که بوسیله‌ی روغن گیاهی داغ استخراج می شود، عمدتا شامل رنگدانه ترانس – بیکسین می باشد. این استخراج همراه با عمل خراشیدن است. در عصاره‌ی تولیدی در این روش

[1]- Single strength
[2]- Double strength

Archive of SID
www.SID.ir

به علت حرارت بالای فرایند، ترکیبات ۱۷ کربنه زرد رنگ که حاصل تجزیه حرارتی هستند، بوجود می‌آیند. کل رنگدانه استخراجی در این روش ۱/۶ – ۰/۲ درصد است.

۳ – Suspension : این روش جهت استحصال غلظت بالای رنگدانه بکار می‌رود و محصولاتی حاوی تا ۴ درصد بیکسین تشکیل می‌شوند. پریستون و ریچارد (۱۹۸۰) سه روش برای ایجاد سوسپانسیون آناتو گزارش کردند. در اولین روش، عصاره‌ی پریکارپ در روغن خوراکی سانتریفیوژ شده و ذرات مناسب برای تولید سوسپانسیون با روغن مخلوط می‌شوند. در این روش ترکیبات ۱۷ کربنه تولید نمی‌شوند. در روش دوم رنگدانه‌ی آناتو توسط حلال مناسب استخراج می‌شود. عصاره‌ها با هگزان و یا حلال دیگری که رنگدانه در آن نامحلول است جهت جداسازی ترکیبات نامطلوب و ناخالصی‌ها شستشو می‌شوند. کارتنوئیدهای عمده موجود در این نوع سوسپانسیون سیس و ترانس بیکسین هستند. سومین روش استخراج، استفاده از موادی مثل مونو و دی گلیسرید، اسیدهای چرب آزاد و پروپیلن گلیکول که Food Grade هستند انجام می‌شود. در بعضی موارد بیکسین و نوربیکسین به شکل مخلوط در پروپیلن گلیکول وجود دارند که جهت تولید رنگی که بتوان هم به آب و هم روغن اضافه نمود، قابل استفاده می باشند.

رنگی که شدت قرمزی آن زیاد باشد نشان دهنده بیکسین تغلیظ شده است، در حالیکه رنگ زرد غالب بودن نوربیکسین را نشان می دهد. pH و حلالیت بر طیف رنگ حاصل موثرند و حلالیت بیشتر در روغن سبب ایجاد رنگ روشنتر می شود. رنگ بیکسین در انواع محلول در آب، محلول در روغن و دیسپرسیونهای آب/روغن موجود است (ریبیرو و سالوادوری، ۲۰۰۳).

۳-۶-۵- پایداری عصاره‌های آناتو

بارنیکوت در سال ۱۹۳۷ یک تحقیق گسترده روی ویژگی‌های عصاره‌ی آناتو انجام داد و گزارش کرد که آنزیم‌هایی مثل کاتالاز، پراکسیداز و اکسیدازها اثری بر عصاره‌ها ندارند. سولفور دی اکسید (SO_2) و هیدروژن سولفید (H_2S) اثر کمی روی رنگ آناتو دارد و در صورتی که از تماس با هوا محافظت شود هیچ اثر منفی ندارد. بارنیکوت گزارش کرد محلول‌های آناتو بوسیله حل شدن در هیدروژن پراکسید و بصورت آهسته در تماس با هوا،

Archive of SID
www.SID.ir

بی رنگ می‌شوند. و پیشنهاد کرد که آناتو هنگامی که با شناساگر احیاکننده متیلن بلو تست می‌شود می‌تواند به عنوان یک گیرنده اکسیژن عمل کند. رنگ سیس–بیکسین حساس به حرارت است و در pH پائین از رنگ زرد–نارنجی به رنگ صورتی تبدیل می‌شود.

pH حداقل اثر را روی حلالیت و پایداری بیکسین دارد (لایورو، ۱۹۹۱). نوربیکسین پایداری کمتری دارد و با کاهش pH رسوب می‌کند.

حرارت و نور می‌تواند به شکل قابل ملاحظه‌ای روی رنگ عصاره‌های آناتو اثر داشته باشند. نوربیکسین هنگام اتصال به پروتئین و نشاسته، هم در برابر نور و هم حرارت پایدار است ولی در محیط آبی پایداری به شکل ویژه‌ای کاهش می‌یابد. بیکسین در دماهای بالای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تجزیه و رنگ مایل به زرد تشکیل می دهد که ناشی از تشکیل ترکیبات ۱۷ کربنه بوده و سبب کاهش رنگ می گردد. در معرض نور قرار گرفتن باعث کاهش تدریجی رنگ می‌شود. بطور کلی رنگدانه‌های آناتو، همانند بقیه کاروتنوئیدها مستعد اکسیداسیون هستند ولی نسبت به بقیه کاروتنوئیدها در مواد غذایی پایدارترند (هنری، ۱۹۹۶).

کاتیون‌های دو ظرفیتی بویژه کلسیم می‌توانند نمک‌هایی با نوربیکسین تشکیل دهند. کلسیم نوربیکسینات به سختی محلول است و آماده بیرون آمدن از محلول است. بنابراین بهتر است از نوربیکسین در آب‌های سنگین و نیز در مواد غذایی با میزان کلسیم بالا استفاده نشود.

مطابق اظهار نظر تولیدکنندگان، ماندگاری عصاره‌های آناتو تا ۶ ماه است. رنگ محلول‌های آناتو حتی در صورت نگهداری در تاریکی نیز کاهش می‌یابند. مس سرعت بی‌رنگ شدن را در pH برابر ۵/۵ افزایش می‌دهد در حالی که آهن سرعت بی‌رنگ شدن محلول‌های غیر بافری را افزایش می‌دهد (بارنیکوت، ۱۹۳۷). در پنیر ثابت شده که نوربیکسین با اتصال به پروتئین‌های شیر، رنگ پایداری ایجاد می‌کند. پنیرهای رنگ شده با آناتو، مستعد عیب معروف به صورتی شدن هستند. تحقیقات کمی در زمینه بحث شیمیایی این عیب انجام شده و به شکل واضح روش جلوگیری از آن مشخص نشده است. بی‌رنگ شدن صورتی با اکسیداسیون نوربیکسین توسط ترکیبات شبیه

Archive of SID
www.SID.ir

سولفیدریل وابسته است. در حالی که بعضی تحقیقات نشان می‌دهند که این عیب مستقیما ناشی از آناتو نیست، بلکه نتیجه شرایط یک‌سری واکنش نامطلوب است که در پنیر رخ می‌دهد (بوید، ۲۰۰۰).

۳-٦-٦- اسامی بین المللی رنگ آناتو

رنگ ها نظیر سایر افزودنی های خوراکی دارای کدهای بین المللی شناسایی بر اساس استانداردهای معتبر بین المللی هستند (جدول ۲-۶)

جدول۲-۶) کدهای شناسایی بین المللی رنگ ها و تعاریف آنها

عبارت	تعریف
CFR	کد قوانین FDA
CI	شناسه اسمی و عددی رنگ ها که از سال ۱۹۲۵ در امریکا برای هر رنگ از سوی انجمن متخصصین رنگ , (SDC) و انجمن شیمیدانان نساجی و رنگ (AATCC) ارائه می شود.
INS	سیستم شماره‌گذاری بین المللی کدکس مواد افزودنی برای یکسان سازی نام های بین المللی
CAS No.	شناسه عددی رنگ توسط سازمان خدمات شیمیایی (زیرگروه انجمن شیمی امریکا) که از سال ۱۹۵۷ برای رنگ ها اختصاص پیدا کرده است.
EC	شناسه عددی رنگ از طرف اتحادیه اروپا

رنگ آناتو در زمره رنگهای طبیعی و مشابه طبیعی مجاز با نامهای آناتو، بیکسین و نوربیکسین شناخته می شود.

شماره‌های زیر جهت طبقه‌بندی عصاره‌های آناتو به کار می‌رود.

Archive of SID
www.SID.ir

Color index C.I. (1956) 75120, C.I. Natural orange 4

European community: E160b

CAS registry Numbers:

Annatto 1393-63-1

Bixin (*cis*) 6983-79-5

Bixin (*trans*) 39937-23-0

Norbixin (*cis*) 626-76-6

Norbixin (*trans*) 542-40-5

FDA[1] مسئول تنظیم کردن همه‌ی افزودنی‌های رنگی که در آمریکا استفاده می‌شود است. یک افزودنی رنگی، به هر رنگ، رنگدانه یا ماده‌ای که با افزودن یا به کار بردن در یک غذا، دارو، لوازم آرایشی، یا بدن انسان ایجاد رنگ کند. در آمریکا افزودنی‌های رنگی مجاز در مواد غذایی به دو دسته نیاز به تاییدیه و بدون نیاز به تاییدیه تقسیم می‌شوند.

رنگ‌های نیاز به تاییدیه، رنگ‌هایی هستند که به شکل سنتزی تهیه شدند. تولیدکنندگان باید یک نمونه از هر بچ رنگ به FDA بدهند تا در آنجا آزمایشات جهت اطمینان از ایمنی، کیفیت، قدرت و سازگاری، قبل از افزودن به غذا انجام شود. این فرایند موافقت، گواهی افزودن رنگ نام دارد.

رنگ‌های بدون نیاز به تاییدیه : شامل رنگدانه‌هایی که از منابع طبیعی مثل سبزیجات، مواد معدنی و حیوانات و مشتق‌های طبیعی از همتاهای سنتزی منشا گرفته‌اند. هر دو نوع افزودنی رنگی هم مورد تایید و هم بدون نیاز به تایید، در معرض استانداردهای سخت ایمنی قبل اینکه برای استفاده در مواد غذایی تایید شوند، قرار می‌گیرند.

طبق مقررات ایالات متحده، آناتو به عنوان رنگ بدون نیاز به تایید طبقه‌بندی می‌شود. آناتو تولید شده از طریق GMP می‌تواند با اطمینان جهت رنگ کردن غذا در مقدار مناسب استفاده شود.

[1] The Food and Drug Administery

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۶-۷- خواص درمانی و اثرات بیولوژیکی رنگ آناتو

بومی‌های امریکای جنوبی دانه‌های آناتو را از مدت‌ها قبل به عنوان یک داروی سنتی جهت التیام زخم‌ها و جراحات، جوش‌های پوستی، رفع سوختگی و به صورت خوراکی برای درمان اسهال، تنگی نفس یا آسم و داروی ضد تب استفاده می‌کردند. عقیده بر آنست که آناتو دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی است زیرا مشخص شده است که می‌تواند از فعالیت لیپوکسیداز و پراکسیداسیون چربی‌ها ممانعت به عمل آورد. آناتو در بازارهای جهانی با استقبال خوبی روبروست و استفاده از آن می‌تواند ارزش افزوده مناسبی در محصولات ایجاد کند که این امر به خاطر ویژگی‌های تکنولوژیکی ممتاز آن می‌باشد. در صورتی که برخی ادعاهای موجود درباره اثرات سلامتی‌زایی آناتو اثبات شود، توجه بیشتری به آن معطوف خواهد شد (رنگ‌های طبیعی خوراکی، ۱۳۹۰).

کاروتنوئیدها از جمله بیکسین و نوربیکسین ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی و از بین برندگی رادیکالهای آزاد ، فرونشاننده اکسیژن یگانه، پاک کننده گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن و در نتیجه دارای پتانسیل بالای ضد جهش و ضد سرطان هستند . بررسی ها نشان داده اند که رنگ آناتو به طور موثری از تشکیل هیدروپراکسید جلوگیری می‌کند. در مطالعات دیگری بیکسین و نوربیکسین از صدمه DNA ناشی از تابشUV ، آب اکسیژنه، یونهای سوپراکسید و جیوه ارگانیک محافظت کرده اند (خان و همکاران، ۲۰۰۹).

در طب سنتی آناتو در قالب مصارف چای و جوشانده در درمان بسیاری از بیماریها استفاده میشود از جمله آفتاب سوختگی، تورم لوزه‌ها، جذام، تورم ریه، احتباس تنفس، مشکلات گوارشی، اسهال و اسهال خونی، عفونتهای پوستی، بیماریهای کبدی و کلیوی، گونوره (سوزاک)، سرخک،درمان کرم کودکان و یرقان.

در غرب هند پیگمان آناتو به عنوان رنگ بدن در مناسبات مختلف استفاده می شود. رنگ کردن بدن مانع از جذب اشعه UV و آفتاب سوختگی شده، دفع کننده حشرات است. متخصصان طب سنتی معتقدند آناتو در درمان بیماریهای عفونی موثرتر از آنتی بیوتیکهای سنتزی عمل می کند و می تواند یک جایگزین ایمن در موارد غیر جدی عفونتهای غیر مقاوم محسوب شده ، یک منبع احتمالی برای آنتی بیوتیکهای جدید باشد (گالیندوکاسپیرنا و همکاران، ۲۰۰۵؛ چاندل و همکاران، ۲۰۱۴).

Archive of SID
www.SID.ir

طبق مطالعات علمی انجام شده بیکسین و نوربیکسین اثرات درمانی موثری در موشهای دیابتی مبتلا به قند و چربی خون بالا داشته اند. کاروتنوئیدها و ترکیبات فنلی موجود در دانه آناتو ترکیبات بیواکتیوی هستند که در درمان بسیاری از بیماریهای التهابی، قلبی عروقی، آب مروارید و تخریب ماکولار مورد توجه زیادی قرار گرفته اند. همچنین دانه آناتو به دلیل داشتن ترکیبات توکوفرول، توکوتری انول و نیز گرانیل گرانیول (که ترکیب اصلی ترپنی دانه است) پتانسیل درمانی موثری در سل و تومورها نشان داده است (سوماکال و همکاران، ۲۰۱۵). بررسیهای دیگر اثرات ضد دیابتی، ضد تشنج، ضد تب، ضد اسهال، ضد گونوره و نیز اثرات درمانی در بیماریهای کبد، کلیه و ریه آناتو را تایید کرده اند (ائوزوریک و پرایتو، ۲۰۱۴).

سیس بیکسین مرگ سلولی سلول های سرطانی را تحریک می‌کند. بویژه به طور انتخابی سلول های سرطانی چندگانه بیمار و نیز سلول های سرطانی چندگانه مقاوم به دارو را از بین می برد (رامامورتی و همکاران، ۲۰۱۱).

افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، تقاضای روزافزون برای گسترش و توسعه نگهدارنده‌های طبیعی در تولید مواد غذایی و لزوم ایمن بودن ترکیبات نگهدارنده مورد استفاده در محصولات غذایی، توجه به کاربردهای احتمالی عصاره‌های گیاهی را به عنوان مخازن اکولوژیکی برای تولید مواد ضدمیکروبی افزایش داده است. (برت ،۲۰۰۴؛ بسریل و همکاران،۲۰۰۷). اخیرا اثرات ضدمیکروبی عصاره آناتو مورد بررسی قرار گرفته است.

بر اساس نتایج این تحقیق، آناتو اثر ضدمیکروبی قوی روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* دارد، اما بر روی اسید لاکتیک باکتری‌ها تاثیر ضعیفی نشان می‌دهد. همچنین روی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس بیفیدوم* و مخمرها اثر معنی داری ندارد. مسئول خواص ضدمیکروبی در عصاره آناتو، ۹–سیس نوربیکسین و ترانس نوربیکسین معرفی شده‌اند (گالیندوکاسپیرنا، ۲۰۰۳).

۳-۶-۸- ایمنی و توکسیکولوژی رنگ آناتو

آناتو، بر اساس سابقه‌ی طولانی استفاده میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا از آن، غیرسمی شناخته می‌شود. اگرچه آناتو می‌تواند در برخی افراد واکنش‌های آلرژیک ایجاد کند (میککلسن، ۱۹۷۸). سازمان جهانی بهداشت (WHO)، ۰/۰۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن را به عنوان حد مجاز روزانه بیکسین تعیین کرده است.

Archive of SID
www.SID.ir

سرنوشت متابولیکی بیکسین نسبتا به خوبی شناسایی شده است. مقدار ۱میلی‌لیتر از آناتو (۱۶ گرم سیس بیکسین در روغن سویا) مدت زمان رهاسازی کامل از پلاسما برای بیکسین حدود ۸ ساعت و نوربیکسین ۲۴ ساعت است. رنگدانه‌های آناتو در روده جذب خون می‌شوند. تحقیقات آزمایشگاهی، نشان می‌دهند که در کبد متابولیزه می‌شوند و از خون به سرعت حذف می‌شوند (لوی، ۱۹۹۷).

نتیجه تست جهش‌زایی آناتو بر *سالمونلا تایفی موریوم* نژاد TA_{96} و TA_{102} بوسیله‌ی تست آمس منفی بود (فوجیتا و همکاران، ۱۹۸۸). همچنین میزان LD_{50} برای مسمومیت حاد در موش‌ها بیشتر از ۵۰ گرم عصاره‌ی محلول در روغن برکیلوگرم و بیشتر از ۳۵ گرم بر کیلوگرم برای عصاره‌های محلول در آب است (هنری، ۱۹۹۶). تحقیقات مسمومیت‌زایی آناتو در موش صحرایی و موش نشان داد که با مصرف ۲۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز اثرات سمی تولید نمی‌کند. علاوه بر این، آناتو اثر مضری بر سیستم تولید مثلی موش‌های خرمایی تا ۳ نسل حتی هنگام مصرف تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز نداشت (هنری، ۱۹۹۶). در مطالعات دیگر ترانس بیکسین، باعث افزایش اندیس گلیسمی (گلوکز خون) در سگ‌های دو رگه شد ولی در مورد انسان مشاهده نشد، و پیش‌بینی شد برای افزایش اندیس گلیسمی نیاز به مصرف ۴/۲ گرم از ترانس بیکسین خالص است (موریسون، ۱۹۹۱).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که آناتو ژنوتوکسیک نیست، اما برخی دیگر ناهنجاری‌های‌میتوتیک و ژنوتوکسیسیتی را برای این ترکیب گزارش نموده‌اند. مسمویت حاد خوراکی آناتو بسیار پایین است به عنوان مثال در موش صحرایی LD_{50} خوراکی بیش از ۵۰g عصاره محلول در روغن در هرکیلوگرم وزن بدن و بیش از ۳۵ g عصاره محلول در آب به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد. LD_{50} عصاره آبی ریشه خرد شده *بیکسا اورلانا* در موش‌های نر هنگامی که به صورت تزریقی دریافت شود، ۷۰۰mg/kg وزن بدن می‌باشد. مطالعات مسمومیت‌شناسی در طول دوره زندگی در موش‌های صحرایی، در سطح ۲۶ mg/kg در روز و یک قطره ۱۰٪ آناتو در روغن سویا در هر روز برای موش‌ها هیچ اثرات سمی و نامطلوبی را نشان نداده است (رنگ‌های طبیعی خوراکی، ۱۳۹۰)

همچنین مطالعات انجام شده طی ۲ تا ۳ نسل از موش‌های صحرایی تغذیه شده با آناتو محلول در آب در میزان مصرف ۲۵۰ mg/kg تا ۵۰۰ در روز بر روی تولیدمثل این حیوانات هیچ گونه اثرات جانبی زیان‌آوری را ایجاد

Archive of SID
www.SID.ir

ننموده است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که آناتو سرطان زا نیست. JECFA برای این ترکیب LD_{50} معادل ۰/۰۶۵ mg/kg وزن بدن تعیین نموده است. در حال حاضر تحقیقات برای افزایش ADI در حال انجام است. برخی منابع واکنش‌های حساسیتی مانند کهیر و آسم ناشی از مصرف آناتو را در انسان گزارش نموده‌اند (رنگ‌های طبیعی خوراکی، ۱۳۹۰).

مطالعات سم شناسی نشان داده اند که مصرف مقادیر مجاز آناتو ایمن است. متوسط رژیم ۰.۱٪ (نوربیکسین) به میزان ۶۹ mg/kg وزن بدن در مردان و ۷۶ mg/kg وزن بدن در زنان اثر مغایری نشان نداده است. بیکسین نسبت به سایر کاروتنوئیدها سریعا جذب خون شده، بعد از ۸ ساعت در مورد بیکسین و ۲۴ ساعت در مورد نوربیکسین پلاسما شفاف می شود (اسمیت، ۲۰۰۶).

آناتو تولید شده از طریق GMP می‌تواند با اطمینان جهت رنگ کردن غذا در مقدار مناسب استفاده شود. تنها محدودیت که مربوط به فلزات سنگین مثل آرسنیک (نباید بیش از ۳ ppm باشد) و سرب (نباید بیش از ۱۰ppm باشد) است. کاربرد آناتو در مواد دارویی و آرایشی نیز مجاز است . در اتحادیه اروپا مقدار مجاز روزانه آناتو بر این اساس که ۶-۲ درصد کاروتنوئید (بیکسین) دارد، از صفر تا ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز طبقه‌بندی می-شود. این عدد بر این اساس بدست آمده است که مقدار مورد قبول روزانه (ADI) برای انسان ۰/۰۶۵ میلی‌گرم بر - کیلوگرم در روز است (گالیندو و همکاران، ۲۰۰۳).

۳-۶-۹- کاربردهای غذایی رنگ آناتو

آناتو یک رنگ طبیعی مطمئن و ایمن می‌باشد و بدین دلیل کاربردهای گسترده‌یی در صنایع غذایی دارد. برای قرن‌ها، از آناتو برای رنگ برخی انواع پنیرها استفاده می‌شد. استفاده‌های دیگر آناتو، از زمانی که به اتصال نوربیکسین به پروتئین پی برده شد، در گوشت، آرد و ماهی است. سطوح مقادیر پیشنهاد شده تقریبا ۴ تا ۲۵ میلی-گرم بر کیلوگرم وزن بدن است. به عنوان مثال جدول ذیل میزان توصیه شده رنگ آناتو را در محصولات مختلف در ایالات متحده امریکا نشان می دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲-۷- مقادیر کاربرد رنگ آناتو در محصولات مختلف

Product	Recommended level of annatto
Smoked fish	10 mg/kg
Sugar confectionery	20 mg/kg
Soft drinks	10 mg/kg
Sausages and ham	up to 95 mg/kg
Edible ices	20 mg/kg
Processed Cheese	15 mg/kg
Margarine and other fat emulsions	10 mg/kg
Cheddar cheese	0.75-1.25 mg/kg in milk
Red Leicester	50 mg/kg
Flavored processed cheese	15 mg/kg
Desserts	10 mg/kg
Decorations and coatings	20 mg/kg
Cereals	25 mg/kg
Flour confectionery	4-8 mg/kg

کاربرد عصاره‌های آناتو برای رنگ بخشیدن به مواد غذایی، پارچه و لوازم آرایشی به عهد باستان بر می‌گردد. در امریکا آناتو برای استفاده در مواد غذایی، دارویی و آرایشی به عنوان افزودنی رنگی در GMP [1] مجاز می‌باشد. همچنین آناتو برای ایجاد ظاهر مطلوب در طیف وسیعی از مواد غذایی از کره زرد تا هلو، داروها و لوازم آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پیگمان آناتو علاوه بر مصرف وسیع در صنایع غذایی در محصولات آرایشی و بهداشتی و دارویی، داروهای گیاهی، منسوجات، رنگ کردن چرم و چوب و نیز رنگ کردن بدن و مو به طور سنتی کاربردهای زیادی داشته؛ سرخپوستان آمازون قرنها است که این ماده را برای رنگ کردن بدن در مناسبات مختلف استفاده می کنند. همچنین غذای بیکسا که محصول فرعی پس از استخراج پیگمان از دانه است به عنوان مکمل خوراک طیور استفاده می شود. در اروپا و امریکای شمالی حدود دو قرن است که آناتو به عنوان رنگ خوراکی بخصوص در پنیر (ادام) و کره مصرف می شود. امروزه آناتو در محصولات مختلف غذایی مانند فراورده های لبنی، مارگارین، روغن سالاد، بستنی، فراورده های غلات، محصولات اکسترود شده، سوسیس، برنج، انواع سوپ، انواع سس ها، انواع نوشیدنی ها، فراورده های ماهی، محصولات گوشتی، شیرینها، کیک ها (۲۵۰ mg/kg-۱۰۰۰وزن خمیر) و تنقلات

[1] Good Manufacturing Practice

Archive of SID
www.SID.ir

کاربرد دارد. در اسپانیا، مکزیک و فیلیپین و سایر کشورهای امریکای مرکزی و جنوبی دانه آناتو به عنوان چاشنی مصرف می شود (اسکوتر، ۲۰۰۹؛ گریدهار و همکاران، ۲۰۱۴).

۳-۶-۱۰- بازار جهانی (تولید و صادرات) دانه آناتو

کشور پرو بیشترین تولید کننده‌ی دانه آناتو است و حدود ۳۲ ٪ محصول کل دنیا را تولید می‌کند و پس از آن کنیا و برزیل قرار دارند (ITC، ۹۳). بیشترین واردکننده دانه آناتو ایالات متحده است که حدود ۴۵ ٪ و اروپای شرقی ۲۵ ٪ کل تولید دنیا را وارد می‌کند و پس از آن‌ها ژاپن و ونزوئلا قرار دارند. رشد سالانه تقاضا برای آناتو ۱۰-۳ درصد است و متوسط تولید سالانه دانه‌های آناتو ۱۰۰۰۰ تا ۱۱۰۰۰ تن است که از این مقدار ۶۰/۲ درصد در آمریکا و ۲۷/۴ درصد در آفریقا و ۱۲/۴ درصد در آسیا تولید می‌شود (ITC، ۹۳). قیمت دانه‌ی آناتو، به طور متوسط در سال ۲۰۱۶ کیلویی حدود۲- ۱/۵ دلار بوده است. لازم به ذکر است که قیمت به میزان بیکسین موجود در دانه بستگی دارد.

جدول۲-۸) میزان فروش کاروتنوئیدهای مختلف (بر حسب میلیون دلار آمریکا) در سالهای ۲۰۰۴-۲۰۰۹

	Supplements		Food		Cosmetics		Feed		Total	
	2004	2009	2004	2009	2004	2009	2004	2009	2004	2009
β-Carotene (3)	125.0	128.0	98.0	103.0	6.0	7.0	13.0	15.0	242.0	253.0
Astaxanthin (404-6)	3.5	4.8	0	0	0	0	230.5	252.2	234.0	257.0
Canthaxanthin (380)	3.0	3.0	7.0	8.0	0	0	138.0	145.0	148.0	156.0
Lutein (133)	54.0	85.0	18.0	20.0	0	0	67.0	82.0	139.0	187.0
Lycopene (31)	50.5	68.7	3.5	9.3	0	3.0	0	0	54.0	81.0
Annatto[1]	0	0	33.6	39.0	0	0	0	0	33.6	39.0
Zeaxanthin (119)	22.0	35.0	0	0	0	0	0	0	22.0	35.0
Apo-carotenal[2]	0	0	0	0	0	0	8.7	9.1	8.7	9.1
Apo-carotenoate[3]	0	0	0.4	0.5	0	0	5.2	5.4	5.6	5.9
Total	258.0	324.5	160.5	179.8	6.0	10.0	462.4	508.7	886.9	1023.0

طبق تخمین ، تولید جهانی سالانه دانه آناتو ۱۴۵۰۰ تن است. پرو و برزیل کشورهای اصلی تولید کننده آن هستند و سالانه ۷۵۰۰ تن دانه کشت می دهند که فقط ۲ ٪ آن که معادل ۱۵۰ تن بیکسین است جهت استخراج رنگ به کار می رود و باقیمانده در بازار محلی به صورت ادویه به فروش می رسد. بازار اصلی مصرف آناتو امریکا، اروپای غربی و ژاپن است(حدود ۸۰٪ مصرف جهانی و بیشتر برای رنگ پنیر، کره و مارگارین) (ساتیانایارانا و همکاران، ۲۰۰۳).

Archive of SID
www.SID.ir

در ایران بر مبنای استعلام قیمت انجام شده از شرکت‌های واردکننده مواد افزودنی، قیمت رنگ‌های طبیعی وارداتی بالا بوده و از این طریق ارز فراوانی از کشور خارج می‌شود (جدول ۲-۹). بر اساس آمار اتاق بازرگانی، تنها در سال ۱۳۹۱رنگ کننده های طبیعی با ارزش ریالی حدود ۵۰/۰۰۰ میلیون ریال از کشورهای مختلف وارد شده اند که این امر نشان دهنده بازار مصرف مناسب این محصولات در داخل کشور است. همچنین بالابودن قیمت رنگ‌های طبیعی وارداتی نشان دهنده توجیه مناسب اقتصادی برای تولید آنها در داخل کشور می باشد. در کشور ما دانه آناتو با هزینه مناسب قابل تهیه است و با توجه به آن که راندمان استخراج رنگ از آن حدود ۱- ۵٪ تخمین زده می شود، ارزش افزوده ایجاد شده بسیار قابل توجه خواهد بود.

جدول ۲-۹) قیمت محصولات فرموله شده آناتو (وارداتی)، شرکت MAP، ۱۳۹۵

ردیف	شرح کالا	کشور فروشنده	قیمت واحد (ریال)
۱	آناتو ۱٪	انگلستان	۸۷۸/۰۰۰
۲	آناتو ۱۰٪	//	۲/۰۵۰/۰۰۰
۳	آناتو ۱۴٪	//	۲/۷۶۵/۰۰۰

۳-۷-ویژگی‌های آب پنیر

۳-۷-۱- ترکیبات آب پنیر

مشتقات پروتئین آب پنیر ،نظیر تغلیظ شده پروتئین آب پنیر [1]و پودر آب پنیر[2]غنی از اسیدهای آمینه گوگرددار هستند. این اسیدهای آمینه در جریان فرایند گرمایی آزاد شده و پتانسیل احیا را کاهش می دهند . در عین حال از آنجا که میزان اسیدهای آمینه ضروری در پروبیوتیک های دارای خاصیت پروتئین کافتی (مانند لاکتوباسیلوس ها) به طور مستقیم و پروبیوتیک های فاقد این خاصیت (بیفیدوباکتریوم ها) به واسطه سایر آغازگرهای دارای این توانایی از منابع مغذی ازته برخوردار می شوند. افزون وی پروتئین تغلیظ شده [3]سبب بهبود قابلیت زیستی بیفیدوباکتریوم ها می شود.آب پنیر محصول جانبی تولید پنیر یا کازئین می‌باشد. در حال حاضر

[1] - WPC(whey protein concentration)
[2] -WP(whey powder)
[3] - WPC(whey protein concentration)

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده مجدد از آب پنیر، به دو دلیل عمده مدنظر صنایع لبنی قرار گرفته است. دلیل اول وجود ترکیبات با ارزش در آن می‌باشد. آب پنیر حاوی ۸۰ تا ۹۰ درصد حجم شیر مصرفی اولیه و ۵۰ درصد مواد غذایی موجود در شیر می‌باشد، که این مواد هم به لحاظ کیفیت و هم به لحاظ کمیت قابل توجه هستند. پروتئین‌های موجود در آب پنیر قابل استحصال می‌باشد و کاربردهای فراوانی در صنعت غذا دارد.

دلیل عمده دیگری که بازیافت و استفاده مجدد از آب پنیر را ضروری می‌سازد، وجود مقادیر زیاد مواد آلی در آن می‌باشد،ونیز حاوی مواد جامد، لاکتوز، چربی، اسید لاکتیک،مواد معدنی، پروتئین شامل: بتالاکتوگلوبولین، آلفا لاکتالبومین، ایمونوگلوبولین‌ها، پروتئوز پپتون، آلبومین سرم، لاکتوفرین، اسیدهای آمینه، پروتئین‌های آب پنیر از حیث وجود اسیدهای آمینه ضروری و مقدار آنها در سطح بسیار مطلوبی قرار دارد. این پروتئین‌ها نسبت به کازیین دارای مقادیر بیشتر اسیدهای آمینه ضروری تریپتوفان، لوسین، ایزولوسین، ترئونین و لیزین است. اسیدهای آمینه ضروری فنیل آلانین و متیونین در کازیین بیشتر است. علاوه بر آن پروتئین آب پنیر دارای ۲/۴ گرم سیستین و ۲/۸ گرم سیستئین در هر ۱۰۰ گرم پروتئین است (رشیدی، ۱۳۸۵).

جدول۲-۱۰) ویژگی‌های پروتیین‌های آب پنیر (رشیدی، ۱۳۸۵)

پروتئین	درصد در پروتئین آب پنیر	مقدار (گرم در لیتر)	وزن مولکولی	نقطه ایزوالکتریک
بتالاکتوگلوبولین	۵۵-۶۵	۳/۳	۱۸۴۰۰۰	۵/۳۵-۵/۴۹
آلفالاکتالبومین	۱۵-۲۵	۱/۲	۱۴۲۰۰	۴/۲-۴/۵
ایمونوگلوبولین	۱۰-۱۵	۰/۵	۸۰۰۰۰-۹۰۰۰۰۰	۵/۵-۸/۳
آلبومین سرم	۵-۶	۰/۳	۶۶۳۰۰	۵/۱
پروتئوزپپتون	۱۰-۲۰	۰/۲	۴۰۰۰-۸۰۰۰۰	۵/۱-۶/۰
کازئین محلول	۱-۲	<۰/۱	۲۴۰۰۰	۴/۷
سایر پروتئین‌ها	<۰/۰۵	<۰/۰۵	۳۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰	-

Archive of SID

www.SID.ir

ویتامین‌های محلول در چربی بیشتر وارد دلمه یا کازئین می‌شوند، اما ویتامین‌های محلول در آب بیشتر وارد آب پنیر می‌شوند از سوی دیگر فرایند انعقاد آنزیمی یا اسیدی ممکن است اثرات متفاوتی بر میزان راه‌یابی ویتامین‌ها به آب پنیر داشته باشد. بطور معمول ۴۰ تا۷۰ درصد ویتامینB_{12} ، ۵۵تا۷۵ درصد B_6 و پانتوتنیک اسید، ۷۰ تا۸۰ درصد ریبوفلاوین و بیوتین و ۸۰ تا۹۰ درصد تیامین، نیکوتینیک اسید، فولیک اسید و آسکوربیک اسید شیر به آب پنیر راه می‌یابد.

۳-۷-۲- ویژگی‌های عملیاتی و کاربردی آب پنیر[1] (WPC)

در صنایع غذایی کنسانتره پروتئین آب پنیر به عنوان یک افزودنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزودن این ترکیب به جهت بهبود برخی ویژگی‌های عملیاتی و تغذیه‌ای صورت می‌گیرد. برای تحقق و نیل به این اهداف، لازم است که کنسانتره پروتئینی با ویژگی‌های عالی تولید گردد. مهمترین ویژگی‌های عملیاتی کنسانتره پروتئین آب پنیر ذکر شده است (رشیدی، ۱۳۸۵؛ مرتضویان و سهراب وند، ۱۳۸۵).

۳-۷-۲-۱- حل شوندگی

حلالیت کامل پروتئین‌ها برای دستیابی به حد مطلوب ویژگی‌های عملیاتی در کف‌ها، امولسیون‌ها، نوشابه‌ها و سایر کاربردها ضروری می‌باشد. میزان حلالیت کنسانتره پروتئین آب پنیر در pH حدود ۴/۵ تا ۵ (حدود نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها) نشانگر مقدار دناتوره شدن پروتئین‌ها در فرایند تولید می‌باشد. برای دستیابی به نقش مهمی که پروتئین‌ها در مواد و ترکیب‌های غذایی ایفا می‌کنند، لازم است از دناتوره شدن آنها جلوگیری شود. استفاده از فرایند حرارتی برای جداسازی پروتئین‌ها منجر به کاهش حلالیت فراورده حاصل می‌گردد، که به دلیل دناتوره شدن آنها می‌باشد.

پاستوریزاسیون آب پنیر بر حلالیت کنسانتره پروتئین اثر قابل توجهی ندارد، اما پاستوریزه کردن ماندگار فراپالایش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه باعث کاهش حلالیت می‌شود. فرایند حرارتی کنسانتره مزبور در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه اثر عمده بر حلالیت ندارد. حرارت دادن محلول‌های کنسانتره پروتئین آب پنیر در محدوده pH ایزوالکتریک (۴/۳-۵) منجر به کاهش حلالیت پروتئین‌ها می‌گردد.

[1] - whey protein concentration

Archive of SID
www.SID.ir

وجود خاکستر در کنسانتره پروتئین آب پنیر باعث کاهش حلالیت آن می‌گردد. در نتیجه استفاده از فرایند تعویض یونی باعث افزایش حلالیت می‌شود. حل شوندگی پروتئین‌ها بر اساس شاخص حل شوندگی نیتروژن (ان.اس. آی) بیان می‌گردد. در مجموع باید گفت که اگر پروتئین آب پنیر به خوبی تولید شده باشد، در pH های مختلف (۲ تا ۸) حلالیت بیشتری نسبت به کازئین و پروتئین سویا دارد (رشیدی، ۱۳۸۵؛ دوهرتی و همکاران، ۲۰۱۰)

۳-۷-۲-۲- امولسیون کنندگی

امولسیفایرهای غذایی در حقیقت مواد فعال سطحی هستند که دارای بخش‌های آبگریز و آبدوست می‌باشند. امولسیفایرها ممکن است به صورت یونی یا غیر یونی باشند. پروتئین‌ها ترکیباتی پلی یونی هستند که قابلیت واکنش دادن با یون‌های مختلف موجود در غذا را دارند. در میان پروتئین‌های غذایی، پروتئین سویا و کازیین ویژگی‌های امولسیون کنندگی بالاتری دارند و کنسانتره پروتئین آب پنیر ویژگی‌های امولسیون کنندگی ضعیف‌تری دارد، چرا که به دلیل توالی خاص اسیدهای آمینه پروتئین‌های آن، توازن نسبتا نامناسبی بین گروههای آب دوست و آبگریز آن برقرار است. بهترین امولسیون کننده، پروتئینی است که در کمترین مقدار با بیشترین مقدار روغن تشکیل امولسیون بدهد.

۳-۷-۲-۳- ویسکوزیته

محلولهای کنسانتره پروتئین آب پنیر تا غلظت ۴۵ درصد، ویسکوزیته کمی دارند. علت این امر جذب آب کم کنسانتره پروتئین آب پنیر می‌باشد.

۳-۷-۲-۴- تشکیل ژل

یکی از ویژگی‌های قابل توجه کنسانتره پروتئین آب پنیر، توانایی آن در نگهداری آب پس از دناتوره شدن می‌باشد. خاصیت تشکیل ژل کنسانتره پروتئین آب پنیر در بهبود قوام مواد غذایی بسیار موثر است که در نتیجه تشکیل ژل حین فرایند حرارتی غذا می‌باشد. این ویژگی مطلوب در تولید انواع فراورده‌های غذایی نظیر فراورده‌های نانوایی، لبنی گوشتی و دسرها دارای کاربرد است.

Archive of SID
www.SID.ir

شرط اصلی تشکیل ژل، انحلال پروتئین در آب و اعمال دمای مطلوب (۷۵ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. به طور معمول تشکیل ژل در غلظت بیش از ۱۰ درصد صورت می‌گیرد (با مصرف کنسانتره پروتئین دارای حداقل ۵۰ درصد ماده خشک). غلظت مطلوب برای تشکیل ژل ۱۵ درصد می‌باشد. ژل‌های سفت در pH قابل برگشت نمی‌باشد.

طبق بررسی‌های صورت گرفته در میان پروتئین‌های آب پنیر، بتالاکتوگلوبولین بیشترین اهمیت را در فرایند تشکیل ژل دارد، اما سایر پروتئین‌ها نیز در تشکیل ژل نقش دارند.

تشکیل ژل توسط کنسانتره پروتئین بستگی به ترکیب آن، درجه حرارت، pH و فرایند تولید دارد. هر چه درصد پروتئین کنسانتره بیشتر باشد، تشکیل ژل بهتر صورت می‌گیرد. وجود مقادیر بالای لاکتوز و چربی مانعی در برابر ژله‌ای شدن به شمار می‌آید. pH اسیدی باعث تشکیل ژل ضعیف می‌شود. علت این امر تجمع و رسوب پروتئین‌ها می‌باشد.

در نهایت باید به این نکته توجه داشت که انتخاب یک کنسانتره پروتئین در فرمولاسیون غذایی بستگی به ویژگی‌های مورد نظر در محصول نهایی دارد. در یک فراورده غذایی ممکن است به کنسانتره پروتئین با ویژگی تشکیل ژل قوی و در فراورده‌ای دیگر به کنسانتره پروتئین با ویژگی تشکیل ژل ضعیف‌تر نیاز باشد تا ویژگی‌های بافتی مورد پسند مصرف کننده نهایی حاصل گردد. همچنین، بیان شده است که خصوصیات کنسانتره پروتئین آب پنیر بسیار مشابه به ایزوله پروتئین آب پنیر[1] بوده و نسبت به آن،مقرون به صرفه تر است (رشیدی، ۱۳۸۵)

۳-۸-خط تولید نیمه صنعتی مرکز تحقیقاتی و تولید نیمه صنعتی افزودنی های غذایی

مرکز تحقیقاتی و تولید نیمه صنعتی افزودنی های غذایی با مساحتی در حدود ۳۰۰ متر مربع زیربنا شامل بخش های سالن تولید، کنترل کیفیت، تحقیق و توسعه، اتاق های آسیاب، کنترل، خشک کن پاششی، خشک کن قفسه ای و ... می‌باشد. در ساخت مجموعه کلیه استانداردها و الزامات واحدهای تولیدی صنایع غذایی لحاظ گردیده است. دستگاههای خط نیمه صنعتی این مرکز شامل:

- آسیاب چکشی (Hammer Mill) با ظرفیت ۱۰۰ کیلوگرم در ساعت

[1] Whey protein isolate

Archive of SID
www.SID.ir

- آسیاب چند منظوره (Multimill)
- اکستراکتور (Extractor) شامل پرکولاتور با ظرفیت ۳۰۰ لیتر، کندانسور و مخزن دریافت کننده
- اواپراتور (Evaporator) با ظرفیت ۲۵۰ لیتر
- سانتریفوژ (Centrifuge) با ظرفیت ۴۵ کیلوگرم
- خشک کن قفسه ای (TrayDryer)، دارای ۱۲ سینی استیل
- خشک کن پاششی (Spray Dryer) با ظرفیت ۱۰ کیلوگرم در ساعت
- دستگاه الک ویبره (Vibro Sifter) دارای دو مش بندی متفاوت
- دیگ بخار ، سختی گیر، مخازن نگهداری و تاسیسات جانبی

می باشد که تمامی دستگاهها و تجهیزات مذکور ساخت کشور هند بوده و از جنس استیل ۳۱۶ ویژه صنایع غذایی و دارویی است.

امکانات و قابلیت های ماشین آلات و تجهیزات مرکز به شرح ذیل است:

- توانایی استخراج رنگدانه با کاربرد غذایی، دارویی وصنعتی از منابع بیولوژیکی
- امکان سنتز و تولید سایر فراورده‌های شیمیایی علاوه بر رنگدانه‌های گیاهی
- توانایی استخراج انواع عصاره، اسانس و افزودنی‌های غذایی، دارویی وصنعتی
- امکان عصاره‌گیری در دماهای پایین و تولید محصول با کیفیت بسیار بالا
- امکان استفاده ازتجهیزات موجود درسیستم پایلوت به صورت جداگانه، درصورت نیاز به مرحله خاصی ازفرآیند
- استفاده از حلال‌های ایمن در استخراج رنگدانه‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۲-۵) خط نیمه صنعتی استخراج رنگ در مرکز تحقیقاتی و تولید نیمه صنعتی افزودنی های غذایی

۳-۹-پیشینه پژوهش در ایران و سایر کشورها

۳-۹-۱- تحقیقات پیرامون رنگ های سنتزی و تاثیرات آنها

سالیان متمادی است که توجهات زیادی به خطرات کوتاه و بلند مدت احتمالی ناشی از مصرف افزودنی‌های سنتزی معطوف شده است. کارشناسان سم شناسی، تغذیه و رفتارشناسان اثرات مستقیم و غیر مستقیم افزودنی‌ها را مورد توجه قرار داده اند. رنگ‌های مصنوعی که در نوشیدنی‌های گازدار، آب‌نبات‌ها، غلات صبحانه، ژله‌ها و بسیاری از محصولات دیگر به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، جزء این دسته از افزودنی‌ها هستند که بیشتر به منظور جذب مشتری، پوشش دادن رنگ واقعی محصول و تشدید رنگ در ماده غذایی کاربرد دارند.

- بر اساس تحقیقات انجام شده توسط محققان انگلیسی، رنگ‌های مصنوعی باعث تشدید نا آرامی و بی‌قراری در کودکان ۳ تا ۹ ساله می شوند. نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی ۳۰۰ کودک توسط آنها نشان داده است که وقتی کودکان از آب میوه‌های حاوی رنگ دهنده‌های سنتزی موجود در بازار استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

می‌کنند تغییرات جدی و مهمی در رفتار آنها شامل بیش فعالی غیرطبیعی و بی‌قراری بروز می‌کند (ملندز-مارتینز وهمکاران،۲۰۰۷).

- تیم تحقیقات استیونسون که تاثیر افزودنی‌های خوراکی را بر روی کودکان به مدت چند سال مطالعه کرده‌اند، آزمایش‌های خود را بر روی دو گروه کودکان ۳ ساله و کودکان ۸ تا ۹ ساله انجام دادند. نتایج نشان داد که با حذف کردن افزودنی‌های مصنوعی از مواد خوراکی، از انواع رفتارهای ناآرام و بی‌قرار کودکان جلوگیری می‌شود (مایرز و مونت گومری، ۲۰۰۲).
- محققان دانشگاه سوت همپتون اظهار داشتند که هفت رنگ‌دهنده سنتزی از قبیل تارترازین، زرد کوینولین، زرد سانست‌یلو، کارموئیزین، پونسئو وقرمز آلورا باعث آسیب رشدی و کاهش قدرت تمرکز شده و ضریب هوشی کودکان را تا پنج نمره کاهش می‌دهند. همچنین این مواد رنگی غذایی باعث ایجاد مشکلات رفتاری در کودکان مثل تغییر خلق و خوی، بیش فعالی و واکنش‌های آلرژیک می‌شوند (کالوو و همکاران، ۲۰۰۸).
- رامامورتی و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی چند رنگ طبیعی را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که رنگ‌های قرمز فعالیت ضدباکتریایی بیشتر و رنگ‌های زرد فعالیت ضدقارچی بیشتری نشان می‌دهند. این محققان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) رنگ‌های طبیعی را ۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم اعلام کردند و علاوه بر این با افزایش غلظت رنگ‌ها دیدند که ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری‌ها افزایش می‌یافت. در مورد دو رنگی که از Terminalia chebula و Acacia catechu به دست آمده روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمون اثر بازدارندگی مشاهده نکردند و اعلام کردند که رنگ‌های طبیعی به وسیله افزایش نفوذپذیری غشا پلاسمایی و نشت یون، از فعالیت‌های مختلف سلولی جلوگیری می‌کند.

۳-۹-۲- تحقیقات انجام شده پیرامون استخراج رنگ های طبیعی

- ماسون و همکاران (۱۹۹۶) اظهار داشتند که استخراج با حلال مرحله کلیدی در استخراج و خالص‌سازی ترکیبات فعال بیولوژیکی از مواد خام گیاهی می‌باشد. استخراج مواد بیولوژیکی از منابع طبیعی نیازمند

Archive of SID
www.SID.ir

انتخاب یک حلال مناسب به همراه استفاده از هم‌زدن و حرارت‌دادن برای افزایش حلالیت مواد و انتقال جرم می‌باشد .

- کیوروس (۲۰۰۶) اظهار داشت که به خاطر ساختمان پیچیده کاروتنوئیدها و به دلیل گونه‌های متنوع آنها در گیاهان و میوه‌ها روش مرجعی برای استخراج کاروتنوئیدها وجود ندارد. حلال‌های آلی فراوانی مانند استن، تتراهیدروفوران (THF) ، n– هگزان، پنتان، اتانول، متانول، کلروفرم و همچنین مخلوط‌های حلال‌ها مانند استن: اتر: متانولTHF، n– هگزان: تولوئن و ... به طور گسترده‌ای استفاده شده‌اند. با وجود اینکه THF و اتیل‌اتر به خاطر حلالیت بالای کاروتنوئیدها در آنها به طور گسترده‌ای استفاده می‌شدند، برخی از محققان اظهار داشته‌اند که این حلال‌ها ممکن است پراکسیدهایی تولید کنند و بتاکاروتن را به سرعت تجزیه نمایند. از این رو برخی محققان توصیه کرده‌اند که آنتی اکسیدان‌هایی مانند BHT به حلال اضافه شود.
- تانگبودهیتام و همکاران (۱۹۹۸) روش‌های استخراج مورد استفاده برای ارزیابی کاروتنوئیدهای موجود در میوه‌ها و گیاهان را بررسی کردند. در این مطالعه یک روش مناسب استخراج برای دامنه وسیعی از نمونه‌ها بررسی شد و این نتیجه حاصل گردید که مخلوطی از حلال‌های متانول و هگزان بهترین ترکیب استخراج کننده می‌باشد.
- اختر و بریان (۲۰۰۸) کاروتنوئیدهای عمده موجود در غذاهای فرآوری شده را استخراج و اندازه گیری کردند. در این روش نمونه در آب داغ پخش شده و BHT و اتانول به آن اضافه شد و سپس استخراج بوسیله کلروفرم صورت پذیرفت.
- ناویگلیو و همکاران (۲۰۰۸) لیکوپن را از ضایعات صنعتی گوجه فرنگی به کمک آب به عنوان حلال و نوعی دستگاه استخراج کننده جداسازی نمودند. در این بررسی استفاده از آب موجب کاهش هزینه استخراج شد و لیکوپن بدست آمده دارای درجه خلوص بسیار بالایی بود.
- کائور و همکاران (۲۰۰۸) شرایط استخراج لیکوپن از ضایعات کارخانه‌های فرآوری گوجه فرنگی را به روش سطح پاسخ بررسی کردند. در این بررسی تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلفی از ترکیب

Archive of SID
www.SID.ir

حلال‌ها با یکدیگر، تعداد دفعات استخراج، دما، اندازه ذرات و زمان استخراج بود. بیشترین لیکوپن زمانی استخراج شد که نسبت حلال به مواد، تعداد استخراج‌ها، دما، اندازه ذرات و زمان استخراج به ترتیب ۳۰:۱ ، ۴، ۵۰ درجه، ۰/۱۵ میلی متر و ۸ دقیقه بود.

- گراس و همکاران(۱۹۷۱) به منظور استخراج کاروتنوئیدها از مخلوط اتر:ایزوپروپانول (۱:۳) استفاده کردند. در ادامه این روش قبل از صابونی کردن، پیگمان‌ها به دی اتیل اتر منتقل شد.
- استیووارت و همکاران(۱۹۷۷) کاروتنوئیدها را از آب پرتقال با استفاده از مخلوط دی کلرواتان: متانول (۱:۱) استخراج نموده و سپس به منظور افزایش درصد خلوص از حلال های هگزان و دی اتیل اتر استفاده شد.
- فیشر و روسف (۱۹۸۶) از متانول به عنوان حلال استفاده نموده و عصاره رنگی حاصل را به متیلن کلراید منتقل کردند. نقطه جوش پایین این حلال باعث تغلیظ بسیار سریع عصاره گردید. اگرچه گزارش شده که این مواد خاصیت سرطان زایی و جهش زایی داشته و باعث ایجاد صدمه به محیط زیست می شوند.
- طی بررسی در سال ۱۹۹۰ جهت استخراج لیکوپن از مخلوط سه حلال هگزان، اتانول و استون (۲۰/۲۰/۵۰ حجمی/حجمی/حجمی) استفاده شد. بعد از استخراج به محلول حاصل ۱۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. در نهایت لیکوپن از بخش بالایی فاز غیر قطبی جدا گردید. میانگین استخراج ۱۵/۸ mg بر g ۱۰۰برای گوجه فرنگی و ۳/۳۲ mg بر g ۱۰۰ برای پالپ گوجه فرنگی گزارش شد(سادلر و همکاران، ۱۹۹۰).
- مطالعات جدید استخراج لیکوپن را بر پایهٔ دی اکسید کربن فوق بحرانی توصیف می‌کنند که امکان استخراج بیش از ۶۰ درصد لیکوپن موجود در تفاله را فراهم می‌کند ولی امروزه استخراج لیکوپن باز هم با استفاده از مواد شیمیایی مانند اتانول، استون، پترولیم اتر، هگزان، بنزن و کلروفرم انجام می‌شود. معمولاً از مخلوطی از هگزان، استون و اتانول یا متانول برای استخراج استفاده می‌شود، زیرا سایر مواد مثل دی اتیل اتر و تتراهیدروفوران حاوی پراکسید هستند که با کاروتنوئیدها واکنش می‌دهند و پایداری لیکوپن استخراج شده با هگزان/اتانول و هگزان/استون بیشتر از لیکوپن استخراج شده با بقیهٔ مواد آلی است. لازم به ذکر

Archive of SID
www.SID.ir

است استخراج با دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی نیز دارای هزینه تجهیزات بالا و مصرف انرژی زیادی می باشد (کائور و همکاران، ۲۰۰۸).

- طی پژوهشی لیکوپن توسط دی اکسید کربن فوق بحرانی با استفاده از طرح آماری فاکتوریل در چهار دما (۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵) و سه فشار (۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ بار) و سه غلظت اتانول (۵، ۱۰و ۱۵درصد) در زمانهای ۱، ۲ و ۳ ساعت و سرعت جریان 2g/h، ۴ و ۸ دی اکسیدکربن استخراج شد و سپس توسط HPLC میزان کل ترکیب اندازه گیری شد. طی این بررسی بالاترین سطح استخراج مربوط به شرایط ۵۵ درجه سانتی گراد، فشار ۳۰۰بار، زمان ۲ ساعت، سرعت جریان 4 Kg/h دی اکسیدکربن و ۵ درصد اتانول گزارش شد (بایسال و همکاران، ۲۰۰۰).
- روش دیگر استخراج، استخراج لیکوپن با استفاده از آنزیم‌های پکتیناز و سلولاز از بافت گوجه‌فرنگی می-باشد. در میوه گوجه‌فرنگی لیکوپن بیشتر در قسمت پوست آن وجود دارد. میزان کلی لیکوپن در گوجه-فرنگی از ۱۹۰-۹۰ میکروگرم برگرم در وزن تازه متغیر می‌باشد. در گوجه‌فرنگی ساخت لیکوپن تا حد زیادی در پروسه‌ها و فرآیند رسیدن آن افزایش می‌یابد. آنزیم‌های پکتیناز وسلولاز برای بدست آوردن محصول لیکوپن از بافت‌های گوجه فرنگی استفاده می‌شوند. در این روش میزان آنزیم و زمان بر استخراج لیکوپن از گوجه‌فرنگی موثر است (رنجبر و همکاران، ۱۳۸۹).
- طی پژوهشی میزان استخراج لیکوپن از پوست گوجه فرنگی و گوجه فرنگی توسط آنزیم های پکتیناز و سلولاز با هم مقایسه شد. بر این اساس غلظت آنزیم و زمان گرمخانه گذاری به عنوان متغیر بهینه یابی شدند. نتایج به این صورت بود که میزان استخراج لیکوپن گوجه فرنگی با آنزیم های سلولاز و پکتیناز به ترتیب ۱۳۲ و ۱۰۸ میکروگرم بر گرم گزارش شد. این نتایج برای پوست گوجه فرنگی راندمان بالاتری داشته و با آنزیم سلولاز ۴۲۹ میکروگرم بر گرم و با آنزیم پکتیناز ۱۱۰۴ میکروگرم بر گرم نتایج بهتری را نشان داد (چودری و همکاران، ۲۰۰۷).

Archive of SID
www.SID.ir

- زو و همکاران (۲۰۱۰) اثر ۵ روش استخراج کلروفیل –شامل حلال های استون و اتانول به تنهایی و در نسبت های مختلف– را در کلم چینی مورد بررسی قرار دادند و پایداری کلروفیل استخراجی را مقایسه نمودند.
- میازک و لداکویچ (۲۰۱۳) استخراج کلروفیل از برگها (اقاقیا)، سوزن برگ ها (کاج) و ریزجلبک ها را مورد بررسی قرار دادند.
- هانگ و همکاران (۲۰۱۴) اثر سه نوع حلال استون، اتانول و دی متیل سولفوکسید بر استخراج کلروفیل از ترشک خزنده (creeping oxalis) را مورد بررسی قرار دادند.
- کنگ و همکاران (۲۰۱۴) تاثیر غلظت های مختلف (۸۰–۱۰۰٪) اتانول، استون و متانول را بر بازده کلروفیل کل مورد بررسی قرار دادند.
- میازک و لداکوویچ (۲۰۱۳) استخراج کلروفیل از برگها (اقاقیا)، سوزن برگ ها (کاج) و ریزجلبک ها را مورد بررسی قرار دادند.
- صابریان و همکاران (۱۳۹۶) اثر نسبت حلال به ماده جامد (۵–۱۰ ml/g)، دما (۳۰–۷۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۳۰–۹۰ دقیقه) را با روش متداول بر بازده کلروفیل کل بهینه سازی کردند.
- صابریان و همکاران (۱۳۹۶) استخراج کلروفیل از برگ درخت شاتوت را با روش فراصوت مورد بررسی قرار دادند و تاثیر شدت توان فراصوت (۱۰–۱۰۰٪) نسبت حلال به ماده جامد (۵–۱۰ میلی لیتر بر گرم)، دما (۳۰–۷۰ درجه سانتیگراد) و زمان (۲–۱۰ دقیقه) را بر بازده کلروفیل کل و شاخص سبزی با استفاده از طرح مرکب مرکزی بهینه سازی کردند.
- کهیلی و همکاران (۲۰۱۷) رنگ های طبیعی بتاکاروتن و لیکوپن را بصورت اولئورزین از پوست گوجه فرنگی حاصل از ضایعات صنایع فراوری به روش سیال فوق بحرانی استخراج کردند. آزمایشات در دمای (۸۰–۵۰ درجه سانتیگراد)، فشار ۵۰۰–۳۰۰ بار و جریان ۶–۳ گرم دی اکسید کربن در دقیقه به مدت ۱۰۵ دقیقه انجام شد. بازده نسبی استخراج از ۳۰/۰۲ ٪ تا ۶۰/۸۵٪ برای لیکوپن و ۲۸/۳۸٪ تا ۵۸/۸٪ برای بتاکاروتن گزارش گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

- اوبرویی و سوگی (۲۰۱۷) شرایط استخراج لیکوپن از هندوانه را به روش رویه سطح پاسخ بهینه سازی نمودند. متغیرها نسبت حلال به ماده خشک (۴-۱۲)، دما (۶۰-۲۰ درجه سانتیگراد) و زمان (۲۰-۴ دقیقه) و تعداد دفعات استخراج (۵-۱بار) بود. پالپ هندوانه دارای ۵۹/۹۵ میلی گرم لیکوپن بر اساس وزن تازه بود. R^2 واکنش معادل ۰/۹۸۶ و خطای آزمون ۰/۰۴ گزارش شد.
- خاضعی و همکاران (۲۰۱۶) شرایط استخراج آنتوسیانین از گلبرگ زعفران را به روش رویه سطح پاسخ بهینه سازی نمودند. حلال مورد استفاده، اتانول اسیدی شده، نسبت حلال به ماده جامد ۱:۲۰ تا ۱:۸۰، دما ۴۵-۲۵ و زمان ۲۴-۸ ساعت بود. شرایط بهینه استخراج دمای ۲۵/۸ درجه و زمان ۲۴ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد بود که تحت این شرایط ۱۶۰۹/۱۱ میلی گرم در لیتر آنتوسیانین استخراج شد.

۳-۹-۳- تحقیقات انجام شده در خصوص استخراج رنگ از دانه آناتو و ویژگی های آن

- چودری و همکاران (۲۰۰۸)، حلال‌های مختلفی را برای استخراج رنگ آناتو استفاده کردند و نتیجه گرفتند که استخراج توسط محلول سدیم هیدروکسید بهترین رنگ را حاصل می‌کند ولی به علت هزینه بر بودن از محلول ۰/۲۵ ٪ سدیم هیدروکسید استفاده کردند که تا ۴۱ ٪ بیکسین دانه را استخراج کرد. این محققان با کمک استیک اسید حالت قلیایی را خنثی کردند. این گروه اعلام کردند، علاوه بر اینکه استخراج از دانه‌های تازه راندمان بیشتری نسبت به استخراج از دانه‌های خشک دارد، زمان استخراج نیز با میزان رنگ استحصال شده رابطه مستقیم دارد.
- واسو و همکاران (۲۰۱۰)، بیکسین را به دو روش معمولی (کلاسیک) و تحت شرایط ماکروویو استخراج کردند. در روش معمولی از اتیل استات به عنوان حلال و در حضور امواج ماکروویو از مخلوط اتیل استات و آب استفاده کردند. این گروه میزان استخراج بیکسین را در روش معمولی و تحت حرارت به مدت ۹۰ دقیقه، ۸/۲۳ ٪ و به همراه ماکروویو در حرارت۲۱۰W به مدت ۱۸ دقیقه، ۱۶/۲۸ ٪ اعلام کردند و گزارش نمودند با افزایش مدت زمان استخراج، این راندمان نیز افزایش می‌یابد. این گروه اعلام کردند که بیکسین به کمک ماکروویو استخراج شده خواص بیولوژی خود را از دست نمی‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

- کلودیا کاردارللی و همکاران (۲۰۰۷)، رنگ دانه آناتو را با چند حلال مختلف استخراج کرد. رنگ استخراج شده با حلال‌های متانول– آب، اتانول– آب میزان بیکسین پائینی داشته و رنگ مایل به زرد دارد، در حالی که رنگ حاصله از حلال‌های متانول، اتانول و اتیل استات، رنگ قرمز و میزان بیکسین بیشتری دارد و رنگ استخراج شده با حلال هگزان مقدار بیکسین و ترکیبات فنولیک پائینی دارد. بهترین حلال برای استخراج بیکسین را اتیل استات گزارش کردند (۴/۹ میلی گرم بیکسین بر گرم دانه).
- تاهام و همکاران (۲۰۱۵) برای استخراج بیکسین از دانه آناتو روش های ترکیبی را مورد استفاده قرار دادند. حلال های مورد استفاده، اتانول، اتانول/آب و Co_2 فوق بحرانی بود. بر اساس نتایج این تحقیق، بهترین راندمان استخراج بیکسین با استفاده از اتانول و تحت فشار محیط گزارش شد.
- چایس و همکاران (۲۰۱۱) فرایند استخراج کاروتنوئید (بیکسین) و ترکیبات فنولیک موجود در دانه آناتو را به روش RSM بهینه سازی نمودند. در نتایج به دست آمده در این تحقیق، فرایند بهینه شامل ۱۵ بار استخراج با استفاده از حلال های استون/متانول/آب به نسبت حجمی ۱۰:۴۰:۵۰ و نسبت ماده جامد به حلال ۱ به ۹ و زمان استخراج ۵ دقیقه گزارش شد.
- رودریگوئز و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه خود بر روی استخراج بیکسین از دانه های چربی زدایی شده آناتو با استفاده دی اکسید کربن فوق بحرانی، در بین متغیرهای مختلف بیشترین اثرات معنی دار بر استخراج بیکسین را شامل حلال، دما و اثر متقابل دما/حلال و دما با نسبت ماده جامد/حلال گزارش کردند.
- کیوکیاس و همکاران (۲۰۰۳)، اثرات آنتی اکسیدانی بتاکاروتن، بیکسین و نوربیکسین را در روغن زیتون و امولسیون روغن در آب را در ۶۰ درجه سانتیگراد بررسی کردند و اعلام کردند که تنها نوربیکسین از تجزیه اکسیداتیو لیپیدها جلوگیری می کند. اگر چه بیکسین و بتاکاروتن از اتواکسیداسیون جلوگیری نمی‌کند اما این مخلوط در کنار ترکیبات قطبی روغن زیتون بکر، اثر آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. نوربیکسین (۲ میلی مولار) اثر آنتی اکسیدانی مشابه گاماتوکوفرول در روغن نشان داد و مخلوط نوربیکسین و آسکوربیک اسید یا آسکوربیل پالمیتات در روغن برخلاف اندیس پراکسید میزان ترکیبات فرار اکسیداسیون را در مقایسه با نمونه آنالوگ بدون نوربیکسین کاهش داد نوربیکسین قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به

Archive of SID
www.SID.ir

آلفاتوکوفرول در سیستم امولسیونی نشان داد و در امولسیون یک اثر سینرژیستی بین نوربیکسین و آسکوربیک اسید یا آسکوربیل پالمیتات وجود دارد.

- کورنیاواتی و همکاران (۲۰۰۷)، بیکسین را از دانه آناتو ایزوله و درصد بیکسین را مشخص کردند علاوه بر این میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی بیکسین را ارزیابی نمودند. ایزوله کردن و شناسایی بیکسین را توسط TLC، ستون کروماتوگرافی و UV-VIS اسپکتروسکوپی انجام دادند. TLC برای عصاره خام ۵ لکه داشت که لکه پنجم بیکسین بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیکسین را برابر ۲۰±۵/۵۴۸ = IC_{50} و فعالیت آنتی‌باکتریایی بیکسین را در برابر *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس ائوروس* ۵۰۰ µg–۷۵۰ اعلام کردند.
- طبق پژوهش انجام شده توسط آیروبی و همکاران (۱۹۹۶) عصاره ارگانیک برگ آناتو (محدوده غلظتی زیر ۱ درصد) بر باکتریهای گرم مثبت موثر ولی بر گرم منفی‌ها، *کاندیدا یوتیلیس* و *آسپرژیلوس نایجر* اثر کمی نشان داد. همچنین این محققان و نیز چاندل و همکاران (۲۰۱۴) برای عصاره ارگانیک برگ آناتو در غلظت(۵ mg/ml) ، فعالیت ضد قارچی را بر چند سویه قارچی از جمله *آسپرژیلوس نایجر* در محدوده غلظتی کم گزارش کردند.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

فصل سوم

مواد وتجهیزات و روشهای پژوهش

www.SID.ir

٤-١-مواداولیه

دانه آناتو از کشور هند خریداری شد.

حلال‌ها شامل اتانول، اتیل استات، استون با برند مرک برای انجام آزمایشات و با برند کیان شیمی برای تیمارهای مرحله تولید نیمه صنعتی تهیه شدند. سود از شرکت آراکس شیمی تهیه شد.

٤-٢-تجهیزات و دستگاههای مورد استفاده

تجهیزات مورد استفاده شامل اکستراکتور، اواپراتور، کندانسور، خشک کن قفسه ای و سیستم الک با مش بندی ساخت شرکت بست اینجیرینگ هند بودند. دستگاه UV-Vis اسپکتروفوتومتر مدل M_{550} CAMSPEC ساخت انگلستان، دستگاه طیف سنجی مادون قرمزDouble beam-Shimadzu-4300 (ساخت ژاپن)، طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) مارک Bruker، (ساخت امریکا) برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

٤-٣-روش‌ها

٤-٣-١- بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ آناتو با استفاده از روش RSM

در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج آناتو و بهینه‌سازی فرآیند مذکور از طراحی سطح پاسخ با چهار متغیر برای بررسی ارتباط بین پاسخ‌های به دست آمده و متغیرهای فرآیند و بهینه‌سازی این پاسخ‌ها استفاده می‌شود. اثر متغیرهای مستقل شامل x_1 نوع حلال، x_2 نسبت حلال به ماده جامد، x_3 زمان و x_4 دمای استخراج، در سه سطح در جدول (٣-١) نشان داده است.

سه تکرار نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. متغیرها مطابق جدول زیر کد گذاری شدند:

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳-۱) نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها

متغیرهای مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		+۱	۰	-۱
نوع حلال	X_1	استون	سود و استون به نسبت مساوی	سود
نسبت حلال به ماده جامد (حجمی/وزنی)	X_2	۵	۳	۱
زمان (دقیقه)	X_3	۲	۴	۶
دما (درجه سانتیگراد)	X_4	۲۵	۴۵	۶۵

به دلیل آن که مهمترین مسئله در این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای نسبت حلال به ماده جامد، نوع حلال‌ها، زمان و دمای استخراج بر درصد بازده استخراج می‌باشد، بنابراین طرح آماری RSM انتخاب گردید. روش رویه پاسخ، کمکی مضاعف برای یافتن حالت بهینه فاکتورها می‌باشد و نشان‌دهنده چگونگی تاثیر فاکتورها در دامنه مورد بررسی بر نتایج آزمون‌هاست.

در مرحله بعد، طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش بینی برازش شده و مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مدل مورد استفاده در RSM، عموما رابطه درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته می‌باشند. پاسخ های (بازده وزنی، خلوص و بازده بیکسین/نوربیکسین) به دست آمده به عنوان متغیر وابسته (Yi) در نظر گرفته می‌شوند. در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید. مدل چند متغیره به صورت رابطه (۳-۱) می‌باشد:

در این آزمایش (Yi) به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ و معادله درجه دوم زیر برای بررسی نتایج استفاده می‌شود:

Archive of SID

www.SID.ir

رابطه (۳-۱)

$$Yi = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{14} x^1 x^4 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4$$

در معادله ذکر شده Yi پاسخ پیش‌بینی شده β_0 ضریب ثابت، β_1, β_2, β_3 و β_4 اثـرات خطـی، β_{11}, β_{22}, β_{33}, β_{44} اثر مربعات و β_{12} β_{23} β_{13}, β_{14}, β_{24} وβ_{34} اثرات متقابل می‌باشند. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم افزارهای Design-Expert 6 استفاده می‌گردد.

٤-۳-۲- استخراج رنگ در مقیاس نیمه صنعتی

به منظور استخراج رنگ در مقیاس نیمه صنعتی، ابتدا دانه‌های آناتو با استفاده از سیستم الک بوجاری شدند و مواد زائد آنها حذف گردید. سپس دانه ها با آب شستشو شده و در مجاورت هوا خشک گردیدند. ۲۰ کیلوگرم دانه خشک شده در مخزن ریخته شده و ۸۰ لیتر هگزان به آن افزوده شد و به مدت یک شبانه روز تحت همزدن ملایم قرار گرفت تا چربی زدایی انجام شود. سپس دانه ها سانتریفوژ شده و حلال از دانه ها جدا شد (شکل ۳-۱).

شکل۳-۱) سانتریفیوژ Best Engineering مورد استفاده برای جداسازی حلال هگزان

Archive of SID
www.SID.ir

شکل۳-۲)خشک کن قفسه ای Best Engineering مورد استفاده برای خشک کردن عصاره

سپس دانه های چربی گیری شده به مخزن پرکولاتور منتقل شده و مطابق تیمارهای تعیین شده، حلال با نسبت مشخص به آن افزوده گردید. پس از طی زمان لازم در دماهای تعیین شده، عصاره رنگی حاصل با استفاده از بگ فیلترها، صاف شده و به اواپراتور منتقل گردید. با توجه به حجم عصاره، تغلیظ تا رسیدن به یک پنجم حجم اولیه عصاره انجام شد. سپس عصاره تغلیظ شده در سینی های خشک کن قفسه ای ریخته شده و در مجاورت هوا به مدت ۲ روز خشک گردید (شکل ۳-۲). پودر به دست آمده برای یکنواخت سازی اندازه ذرات، آسیاب شده والک گردید.

٤-۳-۳- تعیین بازده وزنی استخراج رنگ

بازده استخراج رنگ آناتو از تقسیم وزن رنگدانه پودری به‌دست آمده بر وزن دانه آناتو اولیه و برحسب درصد محاسبه شد.

٤-۳-٤- تعیین خلوص

میزان خلوص رنگ استخراج شده مطابق روش استاندارد FDA بر اساس قانون بیر-لامبرت و با استفاده از دستگاه UV-Vis اسپکتروفوتومتر مدل CAMSPEC M_{550} ساخت انگلستان تعیین شد. به این منظور ۸۰ میلی گرم از رنگ استخراج شده با دقت ۰/۰۰۱ توزین شده و داخل بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری(V_1) ریخته شد و با

Archive of SID
www.SID.ir

استون به حجم رسانده شد. سپس ۵ میلی لیتر(v_1) از این محلول در بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری (V_2) دیگری ریخته شده و مجددا با استون به حجم رسانده شد. از این محلول ۵ میلی لیتر(v_2) برداشته شده به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری (V3) دیگری منتقل شده و مجددا با استون به حجم رسانده شد. استون به عنوان بلانک دستگاه انتخاب شده و جذب نمونه ها در طول موج ۴۸۷ نانومتر اندازه گیری شد.

میزان خلوص رنگ از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{خلوص رنگ } \% = \frac{\boldsymbol{Ab \times V1 \times V2 \times v3}}{\boldsymbol{v1 \times v2 \times W \times 3090}}$$

در این رابطه:

Ab میزان جذب محلول رنگی، ۳۰۹۰ $E^{1\%}_{1cm}$ برابر حداکثر شدت جذب نمونه خالص یک درصد در یک سل یک سانتیمتری در طول موج ۴۸۷ نانومتر می باشد.

شکل۳-۳) دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل CAMSPEC M_{550} برای تعیین خلوص

٤-۳-۵- بازده بیکسین/نوربیکسین

در فرایند استخراج، هم بازده وزنی رنگ حائز اهمیت است و هم خلوص رنگ به دست آمده و لزوما نمونه ای که بالاترین بازده وزنی را داشته است بیشترین خلوص را به خود اختصاص نمی دهد. لذا برای رسیدن به مطلوبترین نمونه، شاخص به نام بازده بیکسین/نوربیکسین مطابق رابطه زیر تعریف گردید:

Archive of SID
www.SID.ir

خلوص× بازده رنگ = بازده بیکسین/نوربیکسین

$$\text{بازده بیکسین/نوربیکسین} = \left(\frac{\text{وزن رنگ}}{\text{وزن دانه آناتو}}\right) \times \left(\frac{\text{وزن بیکسین/نوربیکسین}}{\text{وزن رنگ}}\right) \times ۱۰۰$$

$$\text{بازده بیکسین/نوربیکسین} = \left(\frac{\text{وزن بیکسین/نوربیکسین}}{\text{وزن دانه آناتو}}\right) \times ۱۰۰$$

٤-٣-٦- آزمون‌های شناسایی و تایید ساختار رنگ استخراج شده

۴-۳-۶-۱- طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)

تعیین ساختار و خلوص نمونه بر مبنای بیکسین با استفاده از دستگاه NMR مارک Bruker، (ساخت امریکا) واقع در گروه شیمی دانشگاه کاشان انجام شد. بدین منظور چند میلی‌گرم از نمونه در حلال کلروفرم حل شده و در لوله مخصوص دستگاه NMR قرار گرفت.

شکل۳-۴) دستگاه طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته Bruker

۴-۳-۶-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز (IR)

نمونه رنگ استخراج شده به مدت h ۲۴ در آون تحت خلا قرار گرفت تا کاملا عاری از هرگونه رطوبت شود. سپس از مخلوط نمونه رنگ به همراه برمید پتاسیم (KBr) قرص تهیه شده و در داخل دستگاه طیف سنجی

Archive of SID
www.SID.ir

مادون قرمزShimadzu-4300–Double beam (ساخت ژاپن) قرار گرفت. به منظور اطمینان از خلوص ترکیب استخراج شده، طیف به‌دست آمده از نمونه با طیف استاندارد بیکسین مقایسه شد.

٤-٣-٧- مطالعه پایداری رنگ آناتو به صورت *Invitro* تحت شرایط نگهداری

بدین منظور پودر رنگ آناتو به دست آمده در پاکت های پلی اتیلنی بسته بندی شد. هوای بسته بندی تا حد امکان تخلیه شده و بسته به مدت معین تحت شرایط زیر نگهداری گردید:

- دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد)– تاریکی
- دمای محیط (۲۵ درجه سانتیگراد)– تاریکی
- دمای محیط (۲۵ درجه سانتیگراد)– نور

طی این مدت ویژگی های رنگی نمونه ها (L, a,b) اندازه گیری شد. از آنجا که رنگ یک ویژگی کیفی است، برای کمی کردن توصیف رنگ و در نتیجه قابلیت مقایسه کمی رنگ محصولات مختلف، سیستم های رنگ سنجی بین المللی مختلفی نظیر مانسل، هانتر لب، CIEو ... عرضه شده اند که در این تحقیق رنگ نمونه ها با استفاده از دستگاه هانترلب و به صورت ارزش‌های CIELAB شامل L (روشنی)، a(قرمزی–سبزی) و b (زردی–آبی) اندازه–گیری شد.

به این منظور دستگاه هانترلب مدل colorflex ساخت امریکا مورد استفاده قرار گرفت. رنگ‌سنج قبل از انجام آزمایش‌ها با استفاده از کاشی سیاه و سفید (x= ۷۷.۲۵، z= ۸۷/۲۷، y= ۸۲/۰۹) استاندارد شد. هر نمونه در ۴زاویه مختلف در دستگاه قرار گرفته و ارزش‌های فوق قرائت شد.

برای به‌دست آوردن همبستگی بهتر بین تفاوت‌های کالریمتریک و دیداری، تفاوت رنگ‌سنجی کل (ΔE)برای هر نمونه نسبت به نمونه شاهد از فرمول زیر محاسبه شد(نمونه روز صفر به عنوان شاهد انتخاب شد):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Archive of SID
www.SID.ir

پارامتر C یا کروما که تعیین کننده میزان خلوص و اشباعیت رنگ می باشد از طریق تبدیل مختصات کارتزین (a, b) به مختصات قطبی بر اساس فرمول زیر به دست آمد (زاردتو و روزا ۲۰۰۶):

$$C = \sqrt{(a)^2 + (b)^2}$$

شکل۳-۵) دستگاه هانترلب برای اندازه‌گیری ویژگی‌های رنگی

تغییرات این شاخص ها طی زمان نگهداری، با مقایسه میانگین ها در آزمون چند دامنه ای دانکن سنجیده شده و میزان پایداری رنگ طی شرایط فوق مشخص گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

٤-٣-٨- ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی

به منظور ارزیابی پایداری رنگ‌دانه استحصالی، پودر آب پنیر به عنوان یک سیستم مدل غذایی مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله، پودر آب پنیر بدون رنگ از شرکت صنایع غذایی گلشاد مشهد تهیه شد. ابتدا رنگ آناتو در سه سطح ۰/۱۴، ۰/۲۸ و ۰/۴۲ درصد به پودر آب پنیر افزوده شد. پودر آب پنیر تهیه شده در فرمولاسیون دراژه به میزان ٪۶۰ کل دراژه روغن نباتی و ٪۴۰ مواد پودری به کار گرفته شد و محصول نهایی به صورت اسنک شامل٪۵۰ دراژه و ٪۵۰ پایه (ذرت اکسترود شده) تهیه گردید. با بررسی ویژگی های حسی شامل (طعم و مزه، ظاهر، رنگ و پذیرش کلی) و مقایسه آن با نمونه شاهد بدون رنگ، بهترین غلظت رنگ مشخص گردید. نمونه مطلوب در پاکت‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شده و در دو محیط نور و تاریکی و طی دو دمای ۳۷ درجه و دمای محیط به مدت زمان مشخص نگهداری شد. کیفیت پایداری رنگ نمونه ها طی این مدت از طریق اندازه گیری تغییرات شاخص های رنگی(L, a,b) ارزیابی شد.

شکل۳-۶) پودر آب پنیر بدون رنگ شرکت صنایع غذایی گلشاد مشهد و تهیه دراژه از آن

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

فصل چهارم

نتایج حاصل از پژوهش

www.SID.ir

۵-۱- طرح آزمایش بهینه سازی استخراج رنگ از دانه های آناتو به روش ماسراسیون

طرح آماری برپایه RSM با چهار فاکتور نوع حلال (X_1)، نسبت حلال به ماده جامد (S/L) (X_2) و زمان (X_3) و دما (X_4) ی استخراج در سه سطح (۱- ، ۰ و ۱) جهت بهینه سازی و بررسی اثرات منفرد و متقابل متغیرهای فرآیند بر پاسخ ها (بازده وزنی، خلوص آناتو و بازده بیکسین/ نوربیکسین) بکار گرفته شد. نقطه مرکزی در ۳ تکرار انجام شد تا خطای خالص ممکن را تخمین بزند. برای هر فاکتور، یک دامنه آزمایشی براساس نتایج آزمون های اولیه انتخاب شد. آزمون ها به صورت تصادفی انجام شدند و داده ها با آنالیز رگرسیون چندگانه تجزیه و تحلیل شدند تا مدل آماری چندگانه رگرسیونی مرتبه دوم برای داده های تجربی را نشان دهد تا رابطه بین پاسخ ها متغیرهای مستقل را نشان دهد. آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار آماری Design Expert 6 انجام شد. بعد از بهینه سازی، آزمون های تاییدی[1] در شرایط بهینه انجام شدند و میانگین داده ها آزمون ها با مقادیر پیش بینی شده معادله مدل مقایسه شدند. نتایج این آزمون حاصل میانگین مقادیر آزمون ها در حداقل دو تکرار می باشد.

[1]- verification experiments

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴-۱) شرایط آزمون طرح مرکب مرکزی (CCD) برای استخراج رنگ از دانه آناتو و پاسخ ها (بازده وزنی، خلوص و بازده بیکسین/نوربیکسین)

No	*solvent*	*Solvent/Solid ratio*	*Time (h)*	*Tempeature (°C)*	*Yield (%)*	*Purity (%)*	*Bixin/norbixin Yeild*
1	-1	1	2	25	0.78	7.45	0.06
2	1	1	2	25	3.54	2.37	0.08
3	-1	5	2	25	1.93	18.66	0.36
4	1	5	2	25	9.49	2.36	0.19
5	-1	1	6	25	0.76	7.61	0.06
6	1	1	6	25	1.56	1.57	0.02
7	-1	5	6	25	1.79	17.57	0.31
8	1	5	6	25	12.12	2.88	0.34
9	-1	1	2	65	0.99	12.23	0.12
10	1	1	2	65	1.33	2.33	0.03
11	-1	5	2	65	1.92	12.22	0.23
12	1	5	2	65	17.88	2.04	0.36
13	-1	1	6	65	0.68	11.31	0.08
14	1	1	6	65	3.18	0.03	0.00
15	-1	5	6	65	2.34	26.5	0.62
16	1	5	6	65	11.84	0.28	0.03
17	-1	3	4	45	0.8	7.04	0.06
18	1	3	4	45	6.97	3.36	0.23
19	0	1	4	45	1.12	5.73	0.06
20	0	5	4	45	11.93	4.98	0.59
21	0	3	2	45	4.91	9.03	0.44
22	0	3	6	45	1.55	6.13	0.09
23	0	3	4	25	5.18	9.07	0.47
24	0	3	4	65	5.71	2.9	0.17
25	0	3	4	45	6.105	5.69	0.54
26	0	3	4	45	4.745	7.54	0.47
27	0	3	4	45	6.135	7.79	0.58

*در قسمت حلال های مصرفی، ۱ - : حلال استون و ۱ : حلال هیدروکسید سدیم و ۰ :۵۰٪ حلال استون و ۵۰٪ حلال هیدروکسید سدیم می باشد.

دامنه تغییرات نسبت حلال به ماده جامد از ۱به ۱ تا ۵ به ۱، برای زمان ۲-۶ ساعت و برای دما ۲۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

۵-۱-۱- بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده وزنی

شکل ۴-۱ نمونه ای از عصاره تغلیظ شده و رنگ پودری استخراج شده را نشان می‌دهد.

شکل ٤-۱. از راست به چپ به ترتیب دانه آناتو، عصاره استخراج شده، رنگ پودری به دست آمده

مقادیر پاسخ (بازده وزنی استخراج رنگ) تحت شرایط مختلف آزمون در جدول ۴-۱ مشاهده می گردد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای بازده وزنی استخراج رنگ در جدول شماره ۴-۲ نشان داده شده است.

جدول ۴-۲) آنالیز واریانس مدل های مختلف برای بازده وزنی رنگ آناتو

Source	*Std. Dev*	*R-Squared*	*Adjusted R-Squared*	*Predicted R-Squared*	*press*	
Linear	2.66	0.7001	0.6456	0.4905	264.17	
2FI	1.93	0.8852	0.8135	0.5134		
Quadratic	1.91	0.9154	0.8166	0.4190		Suggested
Cubic	1.84	0.9739	0.8302	-4.7358		

نتایج آنالیز واریانس و معنی داری ضرایب رگرسیون برای بازده وزنی رنگ آناتو در مدل رگرسیونی درجه دوم در جدول ۴-۳ نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

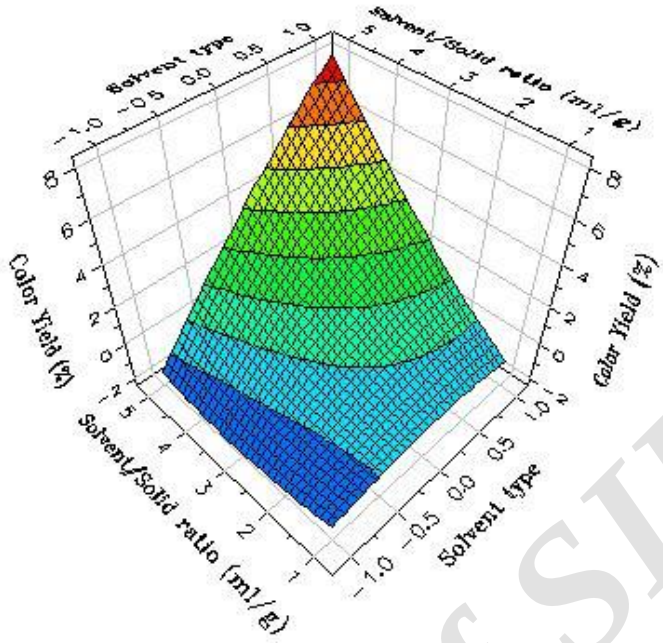
جدول ۴-۳- آنالیز واریانس و معنی داری ضرایب رگرسیون برای بازده وزنی رنگ آناتو در مدل درجه دوم

Source	*Sum of Squares*	*DF*	*Mean Square*	*F Value*	*Prob > F*
Model	474.63	14	33.90	9.27	0.0002
X_1-solvent	*173.72*	*1*	*173.72*	*47.51*	*< 0.0001*
X_2-solvent/solid ratio	*182.40*	*1*	*182.40*	*49.88*	*< 0.0001*
X_3-Time	*2.68*	*1*	*2.68*	*0.73*	*0.4084*
X_4-Temperature	*4.22*	*1*	*4.22*	*1.16*	*0.3036*
X_1^2	*2.91*	*1*	*2.91*	*0.79*	*0.3902*
X_2^2	*6.39*	*1*	*6.39*	*1.75*	*0.2107*
X_3^2	*7.59*	*1*	*7.59*	*2.08*	*0.1752*
X_4^2	*0.63*	*1*	*0.63*	*0.17*	*0.6843*
X_1X_2	*85.33*	*1*	*85.33*	*23.33*	*0.0004*
X_1X_3	*0.76*	*1*	*0.76*	*0.21*	*0.6564*
X_1X_4	*2.93*	*1*	*2.93*	*0.80*	*0.3881*
X_2X_3	*0.45*	*1*	*0.45*	*0.12*	*0.7331*
X_2X_4	*5.19*	*1*	*5.19*	*1.42*	*0.2567*
X_3X_4	*1.31*	*1*	*1.31*	*0.36*	*0.5613*
Residual	43.88	12	3.66		
Lack of Fit	*42.62*	*10*	*4.26*	*6.76*	*0.1356*
Pure Error	*1.26*	*2*	*0.63*		
Cor Total	518.52	26			

همچنین با توجه به معنی داری پارامترهای نوع حلال و نسبت حلال به ماده جامد، نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل نوع حلال و نسبت ماده جامد به حلال در بازده وزنی استخراج رنگ آناتو در شکل ۴-۲ نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۲- نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل نوع حلال و نسبت ماده جامد به حلال در بازده وزنی استخراج رنگ آناتو

۵-۱-۲- بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس خلوص رنگ

مقادیر پاسخ (خلوص رنگ) تحت شرایط مختلف آزمون در جدول ۴-۱ مشاهده مـی گـردد. نتـایج آنـالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای خلوص رنگ در جدول شماره ۴-۴ نشان داده شده است.

جدول ۴-۴- آنالیز واریانس مدل های مختلف برای خلوص رنگ آناتو

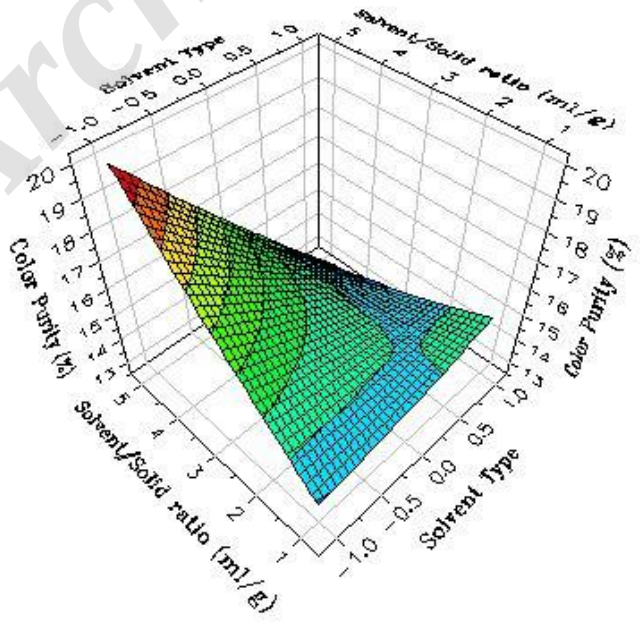
Source	*Std. Dev*	*R-Squared*	*Adjusted R-Squared*	*Predicted R-Squared*	*press*	
Linear	3.73	0.6867	0.6297	0.4854	502.58	
2FI	3.27	0.8253	0.7161	0.2714	711.57	
Quadratic	3.51	0.8484	0.6716	0.0563	921.64	Suggested
Cubic	2.54	0.9735	0.8279	-4.5428	5413.26	

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴-۵- آنالیز واریانس و معنی داری ضرایب رگرسیون برای خلوص رنگ آناتو در مدل درجه دوم

Source	*Sum of Squares*	*DF*	*Mean Square*	*F Value*	*Prob > F*
Model	828.61	14	59.19	4.80	0.0049
X_1-solvent	*593.63*	*1*	*593.63*	*48.12*	*< 0.0001*
X_2-solvent/solid ratio	*75.48*	*1*	*75.48*	*6.12*	*0.0293*
X_3-Time	*1.50*	*1*	*1.50*	*0.12*	*0.7336*
X_4-Temperature	*5.000E-003*	*1*	*5.000E-003*	*4.053E-004*	*0.9843*
X_1^2	*0.34*	*1*	*0.34*	*0.028*	*0.8702*
X_2^2	*0.11*	*1*	*0.11*	*9.258E-003*	*0.9249*
X_3^2	*10.43*	*1*	*10.43*	*0.85*	*0.3759*
X_4^2	*0.45*	*1*	*0.45*	*0.037*	*0.8514*
X_1X_2	*76.96*	*1*	*76.96*	*6.24*	*0.0280*
X_1X_3	*17.58*	*1*	*17.58*	*1.42*	*0.2557*
X_1X_4	*14.96*	*1*	*14.96*	*1.21*	*0.2924*
X_2X_3	*15.62*	*1*	*15.62*	*1.27*	*0.2824*
X_2X_4	*3.36*	*1*	*3.36*	*0.27*	*0.6113*
X_3X_4	*6.90*	*1*	*6.90*	*0.56*	*0.4688*
Residual	148.02	12	12.34		
Lack of Fit	*145.39*	*10*	*14.54*	*11.05*	*0.0858*
Pure Error	*2.63*	*2*	*1.32*		
Cor Total	976.63	26			

شکل ۴-۳ نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل نوع حلال و نسبت ماده جامد به حلال در خلوص رنگ آناتو را نشان می دهد.



شکل ۴-۳- نمودار سطح پاسخ تاثیر متقابل نوع حلال و نسبت ماده جامد به حلال در خلوص رنگ آناتو

Archive of SID
www.SID.ir

۵-۱-۳- بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده بیکسین/نوربیکسین

از آنجایی که شاخص بازده بیکسین/ نوربیکسین حاصل از ضرب دو شاخص قبلی (بازده وزنی و خلوص رنگ) می باشد و از طرفی روند تغییر هرکدام از این شاخص ها با همدیگر کاملا متفاوت است، بنابراین حاصلضرب نیز عددی متفاوت بوده که از روند مشخصی تبعیت نمی کند. اگرچه مطابق جدول ۴-۱، بیشترین خلوص (۲۶/۵ ٪) و بیشترین بازده بیکسین/ نوربیکسین (۰/۶۲ ٪ یا ۰/۶۲ گرم به ازای ۱۰۰ گرم دانه آناتو) مربوط به نمونه ۱۵ (یعنی حلال استون و بیشترین نسبت حلال به ماده جامد، دما و زمان) می باشد اما بازده بیکسین/نوربیکسین آن بسیار کم می باشد. در واقع این شاخص با هدف برطرف کردن نقص شاخص بازده وزنی و خلوص مطرح شد زیرا در شاخص بازده وزنی، همه ترکیبات استخراج شده، بیکسین و نوربیکسین نمی باشند بلکه ترکیبات دیگری نیز طی فرآیند استخراج، جداسازی شده‌اند. در شاخص خلوص نیز وزن بیکسین/ نوربیکسین نسبت به رنگ استخراج شده مشخص می شود و نه نسبت به دانه آناتو. بنابراین از آنجا که در شاخص بازده بیکسین/ نوربیکسین، وزن بیکسین/ نوربیکسین نسبت به دانه آناتو بیان می شود، این شاخص جامع تر می باشد.

جدول ۴-۶- آنالیز واریانس مدل های مختلف برای بازده بیکسین/نوربیکسین

Source	*Std. Dev*	*R-Squared*	*Adjusted R-Squared*	*Predicted R-Squared*	*press*
Linear	0.18	0.3565	0.2395	0.1074	0.97
2FI	0.20	0.4032	0.0302	-0.8690	2.02
Quadratic	0.18	0.6376	0.2148	-0.9027	2.06
Cubic	0.20	0.8456	-0.0033	-28.5141	31.95

Archive of SID
www.SID.ir

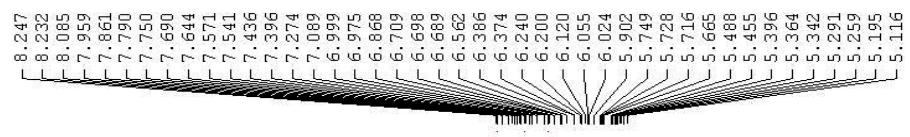
۵-۲-نتایج آزمون‌های تایید ساختار رنگ استخراج شده

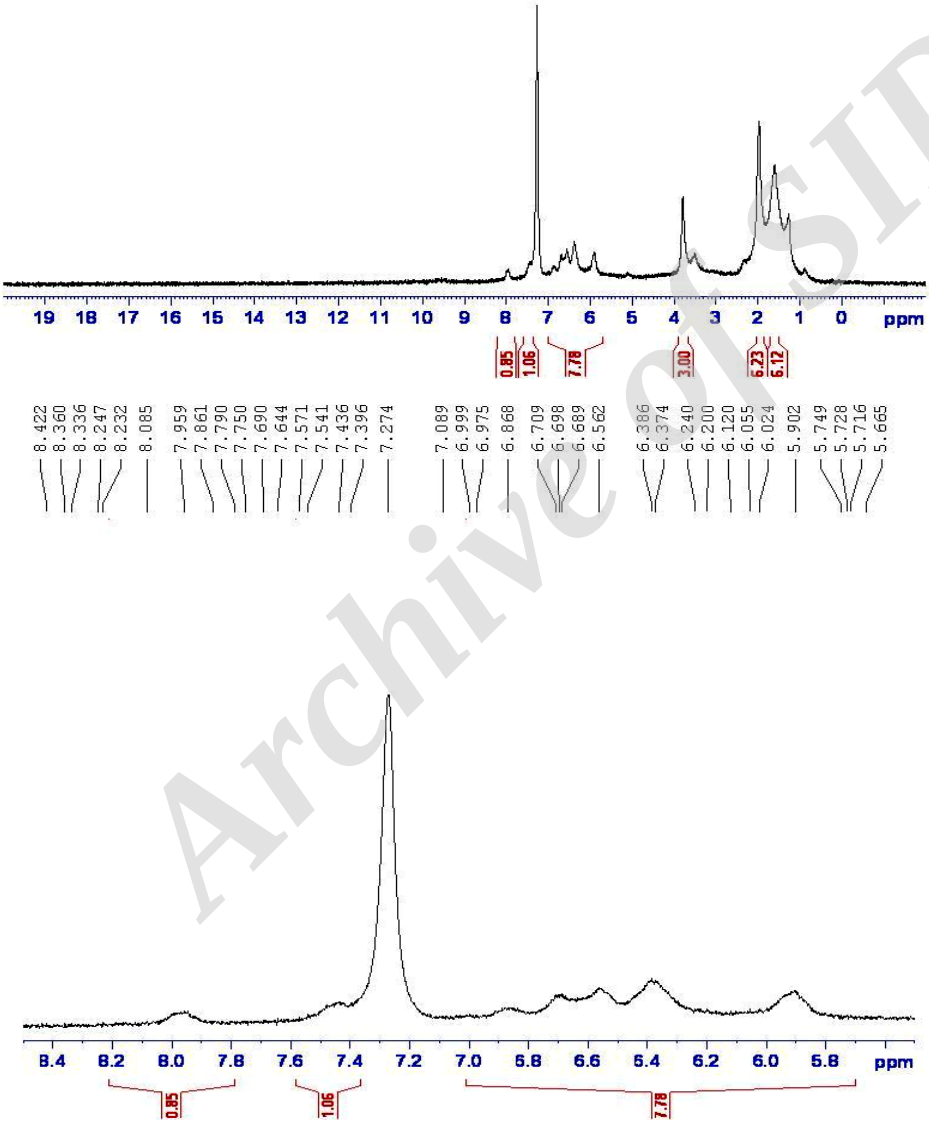
۵-۲-۱- آزمون رزونانس مغناطیسی هسته(NMR)

HNMR یا پروتون NMR شامل کاربرد رزونانس مغناطیسی هسته با درنظر گرفتن اتم هیدروژن در مولکول برای تعیین ساختار مولکول می‌باشد. شکل۴-۴، طیف HNMR ترسیم شده برای نمونه استخراج شده از دانه آناتو را نشان می دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



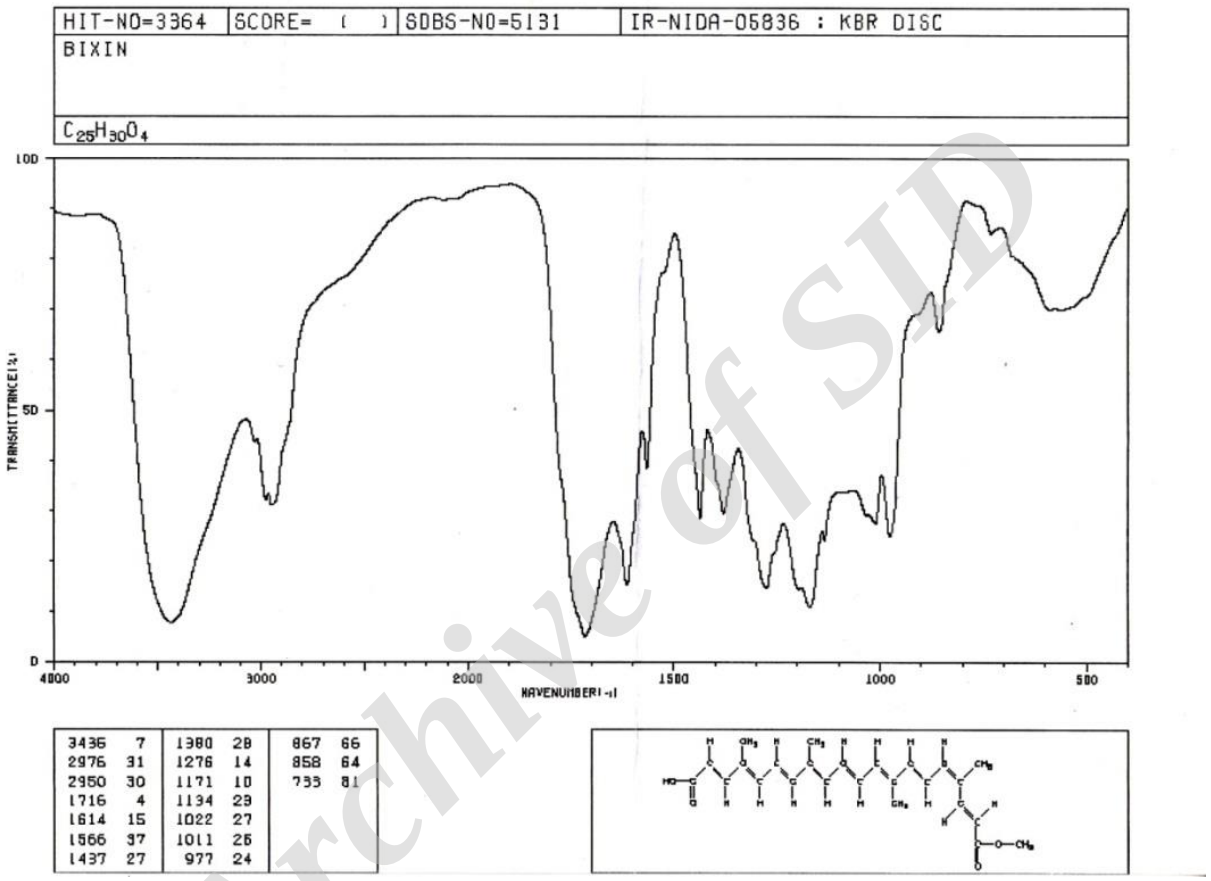


شکل ٤-٤. طیف HNMR نمونه رنگ استخراج شده

Archive of SID
www.SID.ir

۵-۲-۲- آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز (IR)

طیف IR بدست آمده از نمونه استخراج شده با طیف IR استاندارد در شکل ۴-۵ نشان داده شده است.



(الف)

Archive of SID

www.SID.ir

(ب)

شکل ٤-٥- طیف IR استاندارد (الف)، طیف IR نمونه استخراج شده (ب)

Archive of SID

www.SID.ir

۵-۳- نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو به صورت *invitro*

نتایج اندازه گیری تغییرات رنگی پودر آناتو طی نگهداری در ۳ تیمار نور- دمای محیط، تاریکی– دمای محیط و تاریکی–دمای یخچال در جدول ذیل آمده است.

جدول۴-۷) نتایج تاثیر شرایط نگهداری بر تغییرات رنگی پودر آناتو

زمان نگهداری	شرایط نگهداری	ویژگی های رنگی		
		L*	a*	b*
زمان صفر	نور و دمای محیط	۱۵/۹۶±۰/۰۳۵	۹/۹۱±۰/۰۵	٤/۸±۰/۰۵
	تاریکی و دمای محیط	۱۵/۹۶±۰/۰۳۵	۹/۹۱±۰/۰۵	٤/۸±۰/۰۵
	تاریکی و دمای یخچال	۱۵/۹۶±۰/۰۳۵	۹/۹۱±۰/۰۵	٤/۸±۰/۰۵
هفته دوم	نور و دمای محیط	۱٦/۱۲±۰/۲۳	۱۱/٦±۰/۱۲	۵/۹۹±۰/۱۱
	تاریکی و دمای محیط	۱۵/٦۵±۰/۱	۱۱/۳۱±۰/۰۸	۵/۹٤±۰/۰٦
	تاریکی و دمای یخچال	۱٤/۸۵±۰/۳	۱۱/۸٤±۰/۳۱	٦/۱۳۹±۰/۳
هفته چهارم	نور و دمای محیط	۱٦/۵۳±۰/٤۱	۱۲/۱۸±۰/۳۷	٦/۸٦±۰/۲۲
	تاریکی و دمای محیط	۱٦/۱٤±۰/۳۷	۱۱/۵۹±۰/۲۹	٦/۳۲±۰/۱٦
	تاریکی و دمای یخچال	۱٤/٦۵±۰/۱۹	۱۱/٤۳±۰/۱۳	۵/۸۵±۰/۰۸

Archive of SID

www.SID.ir

جدول٤-٨) نتایج آنالیز واریانس تاثیر شرایط نگهداری بر میزان روشنی (L) پودر رنگ استخراج شده

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	7.036	3.518	17.440	0.0000
Within	33	6.657	0.202		
Total	35	13.693			

Coefficient of Variation = 2.85%

جدول٤-٩) نتایج آنالیز واریانس تاثیر شرایط نگهداری بر میزان روشنی (a) پودر رنگ استخراج شده

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.528	0.264	0.324	
Within	33	26.910	0.815		
Total	35	27.438			

Coefficient of Variation = 8.15%

جدول٤-١٠) نتایج آنالیز واریانس تاثیر شرایط نگهداری بر میزان روشنی (b) پودر رنگ استخراج شده

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.523	0.262	0.482	
Within	33	17.933	0.543		
Total	35	18.456			

Coefficient of Variation = 12.88%

Archive of SID
www.SID.ir

٦-١- نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی

همانگونه که در بخش مواد و روش ذکر گردید، ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی آب پنیر انجام شد. برای تعیین غلظت مناسب رنگ ویژگی های حسی غلظت های مختلف رنگ در مقایسه با نمونه شاهد ملاک عمل قرار گرفت که نتایج آن در ذیل آمده است.

٦-١-١- نتایج آزمون های حسی پودر آب پنیر حاوی رنگ

جدول۴-۱۱ نتایج تاثیر غلظت های مختلف رنگ آناتو بر ویژگی های حسی نمونه های پودر آب پنیر را نشان می دهد.

جدول ۴-۱۱) تاثیر غلظت های مختلف رنگ آناتو بر ویژگی های حسی نمونه های پودر آب پنیر

ویژگی های حسی	طعم و مزه	ظاهر	رنگ	پذیرش کلی
۰/۱۴ درصد رنگ آناتو	۳/۳۷۵±۰/۷۴	۳/۷۵±۰/۸۹	۴/۱۲۵±۰/۸۳	۳/۷۵±۰/۷۱
۰/۲۸ درصد رنگ آناتو	۳/۵±۰/۵۳	۳/۷۵±۰/۸۹	۳/۶۲۵±۱/۰۶	۳/۸۷۵±۰/۸۳
۰/۴۲ درصد رنگ آناتو	۳/۸۷۵±۰/۶۴	۴±۰/۷۶	۴/۱۲۵±۰/۶۴	۳/۸۷۵±۰/۶۴
نمونه شاهد	۳/۳۷۵±۰/۷۴	۳±۱/۲	۳/۸۷۵±۰/۹۹	۳±۰/۹۳

مطابق جدول ۴-۱۱، در مجموع داوران حسی از نظر طعم و مزه، ظاهر ، رنگ و پذیرش کلی نمونه های حاوی ۰/۴۲ درصد آناتو را بر سایر نمونه ها ترجیح دادند. لذا نمونه های حاوی ۰/۴۲ رنگ آناتو برای تعیین پایداری طی مدت نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

٦-١-٢- نتایج تعیین پایداری رنگ آناتو در پودر آب پنیر طی شرایط نگهداری

در جدول ۴-۱۲، نتایج تغییرات شاخص های رنگی پودر آب پنیر طی ۲ ماه نگهداری در دماهای مختلف و شرایط نور و تاریکی نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴-۱۲) میانگین تغییرات شاخص های رنگی پودر آب پنیر طی ۲ ماه نگهداری در شرایط مختلف

زمان نگهداری	شرایط نگهداری	دمای محیط			دمای ۳۷ درجه سانتیگراد		
		L*	a*	b*	L*	a*	b*
زمان صفر	نور	52.11±0.24	16.85±0.11	29.25±0.05	52.11±0.24	16.85±0.11	29.25±0.05
	تاریکی	52.11±0.24	16.85±0.11	29.25±0.05	52.11±0.24	16.85±0.11	29.25±0.05
هفته ٤ (ماه اول)	نور	48.30±0.08	18.74±0.47	29.86±0.09	49.37±0.41	19.04±0.04	30.28±0.08
	تاریکی	47.76±0.24	19.04±0.24	28.48±0.08	51.16±0.24	16.75±0.17	29.69±0.16
هفته ۸ (ماه دوم)	نور	52.32±0.45	15.15±0.38	30.57±0.22	49.31±0.53	18.80±0.14	29.06±0.17
	تاریکی	47.46±0.58	19.15±0.26	28.93±0.20	48.38±0.3	14.92±0.255	28.80±0.138

در جداول ۴-۱۳، ۴-۱۴ و ۴-۱۵ نتایج آنالیز واریانس بررسی تاثیر شرایط نگهداری بر ارزش های رنگی L، a و b نشان داده شده است.

جدول۴-۱۳) آنالیز واریانس تاثیر تیمارهای نور و تاریکی (فاکتور A)، دما (فاکتور B) و زمان (فاکتور C) بر میزان روشنی (L) نمونه های پودر آب پنیر

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
2	Factor A	1	7.092	7.092	59.1199	0.0000
4	Factor B	1	1.798	1.798	14.9890	0.0004
6	AB	1	13.325	13.325	111.0807	0.0000
8	Factor C	2	86.288	43.144	359.6693	0.0000
10	AC	2	28.733	14.367	119.7664	0.0000
12	BC	2	22.828	11.414	95.1515	0.0000
14	ABC	2	8.036	4.018	33.4959	0.0000
-15	Error	36	4.318	0.120		
	Total	47	172.418			

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴-۱۴) آنالیز واریانس تاثیر تیمارهای نور و تاریکی (فاکتور A)، دما (فاکتور B) و زمان (فاکتور C) بر میزان قرمزی-سبزی (a) نمونه های پودر آب پنیر

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
2	Factor A	1	1.343	1.343	24.1222	0.0000
4	Factor B	1	2.498	2.498	44.8553	0.0000
6	AB	1	35.381	35.381	635.3172	0.0000
8	Factor C	2	22.697	11.348	203.7795	0.0000
10	AC	2	2.568	1.284	23.0569	0.0000
12	BC	2	2.027	1.014	18.2001	0.0000
14	ABC	2	30.836	15.418	276.8554	0.0000
-15	Error	36	2.005	0.056		
	Total	47	99.354			

جدول ۴-۱۵) آنالیز واریانس تاثیر تیمارهای نور و تاریکی (فاکتور A)، دما (فاکتور B) و زمان (فاکتور C) بر میزان زرد-آبی (b) نمونه های پودر آب پنیر

K Value	Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob
2	Factor A	1	4.999	4.999	307.6022	0.0000
4	Factor B	1	0.000	0.000	0.0001	
6	AB	1	1.581	1.581	97.2575	0.0000
8	Factor C	2	0.919	0.459	28.2684	0.0000
10	AC	2	2.502	1.251	76.9707	0.0000
12	BC	2	5.355	2.677	164.7507	0.0000
14	ABC	2	0.969	0.484	29.8065	0.0000
-15	Error	36	0.585	0.016		
	Total	47	16.908			

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

www.SID.ir

۷-۱-بهینه سازی استخراج رنگ از دانه های آناتو به روش ماسراسیون

بهبود کارایی سیستم‌ها و افزایش راندمان فرآیندها بدون افزایش هزینه دارای اهمیت می‌باشد. روش به کار رفته بدین منظور، بهینه‌سازی[1] نامیده می‌شود. در عملیات معمول برای اندازه‌گیری شرایط عملیاتی بهینه، یکی از پارامترها با ثابت در نظر گرفتن سایر پارامترها تغییر می‌یابد. این شیوه، تکنیک یک متغیری[2] نامیده می‌شود. از معایب اصلی این تکنیک این است که بر هم کنش میان متغیرها را لحاظ نکرده و در نتیجه اثرات کامل پارامترها بر فرآیند را پوشش نمی‌دهند. به منظور غلبه بر این مشکل، می‌توان از متدولوژی رویه پاسخ[3] (RSM) بهره گرفت (میر و مونت گومری، ۲۰۰۲).

متدولوژی رویه پاسخ (RSM) که برای نخستین بار توسط باکس و ویلسون (۱۹۵۱) معرفی شد، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی است که در مورد فرآیندهایی کاربرد دارد که چند متغیری هستند یا مکانیسم‌های دخیل در آنها به خوبی مشخص نشدند و اطلاعات موجود در مورد سیستم بسیار کم می‌باشد، یا میان متغیرها بر هم‌کنش وجود داشته و پاسخ غیرخطی است (دین، ۲۰۰۲؛ هیل، ۱۹۶۶؛ میزوبوتی و همکاران، ۲۰۰۰).

فرآیند بهینه‌سازی توسط RSM را می‌توان به سه مرحله تفکیک کرد. مرحله نخست، مشخص نمودن پارامترهای مستقل و سطوح آن‌ها می‌باشد؛ مرحله دوم گزینش طرح آزمایشی و پیش بینی و ارزیابی رابطه مدل و مرحله نهایی، به دست آوردن و رسم نمودار رویه پاسخ و نمودار کنتور پاسخ به عنوان تابعی از پارامترهای مستقل و تعیین نقاط بهینه می‌باشد (میر و مونت گومری، ۲۰۰۲).

RSM در مقایسه با روش‌های کلاسیک آماری یا روش‌های بهینه‌سازی که یک متغیری می‌باشند، مزایای متعددی دارد. نخست، RSM مقدار زیادی اطلاعات را از تعداد کمی آزمایش ارائه می‌دهد. در حقیقت، روش‌های کلاسیک زمان‌بر بوده و تعداد زیادی آزمایش برای بیان رفتار سیستم مورد نیاز می‌باشند. همچنین، در RSM می‌توان اثر برهم‌کنش بین پارامترهای مستقل بر پاسخ را بررسی کرد. به ویژه در مواقعی که در سیستم سینرژیسم

[1] Optimization
[2] One-variable-at-a-time technique
[3] Response Surface Methodology

Archive of SID
www.SID.ir

یا آنتاگونیسم داشته باشیم، RSM را می‌توان به خوبی مورد استفاده قرار داد. به علاوه، مدل تجربی که پاسخ را به متغیرهای مرتبط می‌سازد، برای کسب اطلاعات در مورد فرآیند مورد استفاده قرار می‌گیرد (باس، ۲۰۰۷).

۷-۱-۱- بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده وزنی

جدول آنالیز واریانس برای تشخیص معنی‌دار بودن عبارت‌های مدل به‌کار می‌رود. به صورتی که هر چه مقدار عددی P کوچکتر و مقدار عددی F بزرگتر باشد، اثر معنی‌داری را بر پاسخ پیش‌بینی شده خواهد داشت (کووان هونگ، ۲۰۰۵). نتایج حاکی از آن بود که مدل کوادراتیک (درجه دوم) برای بازده رنگ آناتو معنی دار بود و ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای آن ۰/۹۱۵ بود که بیانگر آن است که ۹۱/۵٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. به عبارت دیگر، تنها ۸/۵٪ تغییرات کل توسط مدل، قابل پیش بینی و توضیح نمی باشد. همچنین ضریب تبیین اصلاحی (R^2 adj. =0.82) به ضریب تبیین نزدیک است که بیانگر وجود همبستگی بالا بین مقادیر آزمون و مقادیر پیش بینی شده است. آزمون عدم برازش (Lack- of- fit) بیانگر عدم موفقیت مدل جهت نشان دادن داده ها در نقاطی که در دامنه مدل رگرسیونی وجود ندارند، می باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۵). مطابق جدول ۴-۳، عدم برازش معنی دار نبود. بنابراین همه نتایج حاکی از این بودند که مدل رگرسیونی درجه دوم تحت شرایط مختلف حلال و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی بازده استخراج رنگ آناتو را پیش بینی می کند (جدول ۴-۳).

معادله (۵-۱) برای پاسخ های پیش بینی شده بازده وزنی استخراج رنگ آناتو به صورت کدگذاری شده بدست آمد:

$$\text{Yield (\%)} = 5.19 + 3.11\ X_1 + 3.18\ X_2 - 0.39\ X_3 + 0.48\ X_4 - 1.06\ X_1^2 + 1.58\ X_2^2 - 1.72\ X_3^2 + 0.50\ X_4^2 + 2.31\ X_1X_2 - 0.22\ X_1X_3 + 0.43\ X_1X_4 - 0.17\ X_2X_3 + 0.57\ X_2X_4 - 0.29\ X_3X_4 \quad (۵-۱)$$

در این رابطه X_1 ، X_2 ، X_3 و X_4 به ترتیب کدهای نوع حلال، نسبت حلال/ماده جامد، زمان و دمای استخراج می باشند.

Archive of SID
www.SID.ir

معنی داری هر پارامتر با شاخص P مشخص گردید. همانطور که در جدول ۴-۳ مشاهده می شود. اثر خطی متغیرهای X_1 ، X_2 و اثر متقابل X_1X_2 به طور قابل توجهی بازده وزنی استخراج رنگ آناتو را تحت تاثیر قرار داد. $(p < 0.05)$ به طوری که با تغییر نوع حلال از استون به سود و افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بازده افزایش یافته است که این مساله در شکل ۴-۲ نیز قابل مشاهده است.

همانطور که در معادله (۵-۱) مشاهده می شود، بزرگترین ضریب خطی مربوط به نسبت حلال به ماده جامد می باشد (۳.۱۸) و درنتیجه افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بیشترین اثر مستقیم را بر بازده استخراج داشته است. در این پژوهش دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نشان نداد.

یلمه و همکاران (۱۳۹۳) 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 کاهش نشان داد. این محققان علت کاهش بازده را، علت اشباع شدن حلال، گزارش نمودند.

پژوهش ها در مورد استخراج رنگدانه‌های طبیعی دیگر نیز شرایط مشابهی را گزارش نموده است از جمله واسموند و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که زمان استخراج در تاثیری بر بازده استخراج رنگ طبیعی کلروفیل ندارد. کنگ و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده کردند که در یک دمای مشخص، با افزایش زمان فرایند فراصوت از ۳۰ تا ۷۹ دقیقه، بازده کلروفیل افزایش یافت و در زمان ۷۹ دقیقه به اوج رسید ولی بعد از آن کاهش یافت زیرا در دماهای بالا و زمان طولانی اکسیداسیون و تخریب کلروفیل صورت می پذیرد و موجب کاهش بازده می شود.

صابریان و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند که نسبت حلال به ماده جامد مهمترین عامل معنی دار و اثرگذار بر بازده کلروفیل استخراجی با روش متداول بود؛ اگرچه زمان استخراج، تاثیر معنی داری بر بازده نداشت. راندمان بیشینه تحت شرایط دمای $^{\circ}C$ ۵۳/۲، زمان ۳۴/۸۳ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد ۹/۹۹ (ml/g) پیش بینی شد و تحت این شرایط میزان کلروفیل کل پیش بینی شده ۳۱۸ (میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) محاسبه شد.

صابریان و همکاران (۱۳۹۶) مشاهده کردند که نسبت حلال به ماده جامد، مهمترین عامل اثرگذار مثبت بر بازده کلروفیل استخراجی با روش فراصوت بود؛ اگرچه افزایش دمای استخراج، به طور قابل توجهی موجب کاهش بازده شد. افزایش شدت توان فراصوت نیز موجب افزایش معنی داری در بازده کلروفیل شد. بازده بیشینه تحت

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط دمای $^{\circ}C$ ۳۰/۲، شدت توان فراصوت ۱۰۰٪، زمان ۹/۸۳ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد ۹/۹۹ (ml/g) پیش بینی شد و تحت این شرایط میزان کلروفیل کل ۶۸۰/۵۰ (میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) به دست آمد.

۷-۱-۲- بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس خلوص رنگ

نتایج حاکی از آن بود که مدل کوادراتیک (درجه دوم) برای خلوص رنگ آناتو معنی دار بود و ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای آن ۰/۸۴۸ بود که بیانگر آن است که ۸۴/۸٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. آزمون عدم برازش (Lack- of- fit) بیانگر عدم موفقیت مدل جهت نشان دادن داده ها در نقاطی که در دامنه مدل رگرسیونی وجود ندارند، می باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۵). مطابق جدول ۴-۵، عدم برازش معنی دار نبود. بنابراین همه نتایج حاکی از این بودند که مدل رگرسیونی درجه دوم تحت شرایط مختلف حلال و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی خلوص رنگ آناتو را پیش بینی می کند.

معادله (۴-۲) برای پاسخ های پیش بینی شده خلوص رنگ آناتو به صورت کدگذاری شده بدست آمد:

$$\text{Purity (\%)} = 6.05 - 5.74\,X_1 + 2.05\,X_2 - 0.29\,X_3 + 0.017\,X_4 - 0.37\,X_1^2 - 0.21\,X_2^2 + 2.01\,X_3^2 + 0.42\,X_4^2 - 2.19\,X_1X_2 - 1.05\,X_1X_3 - 0.97\,X_1X_4 + 0.99\,X_2X_3 - 0.46\,X_2X_4 + 0.66\,X_3X_4 \quad (۴-۲)$$

در این رابطه X_1 ، X_2 ، X_3 و X_4 به ترتیب کدهای نوع حلال، نسبت حلال/ماده جامد، زمان و دمای استخراج می باشند.

معنی داری هر پارامتر با شاخص P مشخص گردید. همانطور که در جدول ۴-۵ مشاهده می شود. اثر خطی متغیرهای X_1 ، X_2 و اثر متقابل X_1X_2 به طور قابل توجهی خلوص رنگ آناتو را تحت تاثیر قرار داده است ($p<0.05$). به طوری که با تغییر نوع حلال از استون به سود و افزایش نسبت حلال به ماده جامد، خلوص افزایش یافته است که این مساله در شکل ۴-۳ نیز قابل مشاهده است.

Archive of SID
www.SID.ir

همانطور که در معادله (۴-۲) مشاهده می شود، بزرگترین ضریب خطی مربوط به نوع حلال می باشد (۵.۷۴) و درنتیجه نوع حلال بیشترین اثر مستقیم را بر بازده استخراج داشته است. در این پژوهش دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر خلوص نشان نداد.

چودری و همکاران (۲۰۱۰) برای استخراج رنگ آناتو حلال های مختلف شامل اتانول ۹۵٪ (به روش استخراج سرد)، اتانول ۹۵٪ (به روش استخراج داغ)، اسید استیک ۱٪، اسید استیک ۱۰٪ و اسید استیک ۱۰۰٪ و محلول سود ۰/۵ و ۰/۲۵ درصد را مورد استفاده قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که بین حلال های مورد استفاده محلول سود ۰/۲۵ درصد بهترین راندمان خلوص رنگ را نشان داده است که با نتایج تحقیق ما مطابقت دارد.

یلمه و همکاران در پژوهش خود (۱۳۹۰) بر روی استخراج رنگ آناتو ویژگی های نوع حلال ونسبت دانه به حلال را بر راندمان استخراج رنگ موثر معرفی نمودند.

چوین و همکاران (۲۰۱۲) دانه آناتو را با استفاده از حلال استون با نسبت های ۱ : ۱ و ۱ : ۴ ماده جامد به حلال تحت شرایط نور و تاریکی استخراج کردند. این محققان گزارش کردند که با کاهش نسبت دانه به حلال بازده استخراج به طور معنی دار کاهش می یابد. همچنین حذف نور تاثیر کمی بر افزایش راندمان استخراج داشته اما به طور معنی دار میزان ترکیبات فرار موجود در عصاره استونی آناتو را کاهش می دهد.

در پژوهش بلوریان و همکاران (۱۳۹۰) بر روی استخراج رنگ طبیعی کورکومین نیز، نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان به ترتیب موثرترین فاکتورها بر استخراج رنگ طبیعی کورکومین گزارش شدند.

۷-۱-۳- بهینه سازی استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده بیکسین/نوربیکسین

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم شاخص بازده بیکسین/ نوربیکسین نشان داد که این مدل معنی دار نبوده و کیفیت مدل برای پیش بینی پایین می باشد (R^2= 63.8%) (جدول ۴-۶).

Archive of SID
www.SID.ir

۷-۱-٤- شرایط بهینه استخراج جهت بیشینه سازی بازده وزنی رنگ آناتو

براساس نتایج مذکور، شرایط بهینه متغیرهای آزمون برای استخراج رنگ از دانه آناتو با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 پیش‌بینی شد. راندمان بیشینه تحت شرایط حلال هیدروکسید سدیم، دمای ^{o}C ۴۶/۴۱ ، زمان ۲/۰۵ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵، معادل ۱۳/۳۱ با مطلوبیت ۰/۷۳۵پیش بینی گردید.

۷-۲-نتایج آزمون‌های تایید ساختار رنگ استخراج شده

طیف HNMR ترسیم شده برای نمونه استخراج شده از دانه آناتو، ساختار شیمیایی بیکسین را تایید نمود (شکل۴-۴).

لازم به ذکر است که HNMR شامل کاربرد رزونانس مغناطیسی هسته با درنظر گرفتن اتم هیدروژن در مولکول برای تعیین ساختار مولکول می باشد.

طیف سنجی مادون قرمز، روشی برای شناسایی مولکولها و به خصوص گروه عاملی مولکولهاست. هر ماده ای طیف مادون قرمز مخصوص به خود را دارد که همانند اثر انگشت، مختص خود مولکول می باشد. با کمک دستگاه طیف سنج مادون قرمز، طیف جذبی یک ترکیب ناشناخته قابل ترسیم است. طیفسنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهشهای ارتعاشی مولکولها و یونهای چند اتمی صورت می گیرد. این روش به عنوان روشی پرقدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و شناسایی ترکیبات آلی به کار میرود، زیرا طیف های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند.

مقایسه طیف IR بدست آمده از نمونه استخراج شده با طیف IR استاندارد، وجود بیکسین را در ساختار نمونه تایید نمود (شکل ۴-۵).

۷-۳- نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو به صورت *invitro*

بر اساس نتایج آنالیز واریانس انجام شده تفاوت رنگ نمونه های حاوی رنگ از نظر داوران حسی در مقایسه با نمونه شاهد معنی دار بود ($p \leq ۰/۰۵$) و داوران نمونه های حاوی ۰/۴۲٪ رنگ را در مقایسه با سایر نمونه ها مطلوب تر ارزیابی نموده اند. در مورد سایر ویژگی های حسی شامل عطر و طعم و شکل ظاهری و پذیرش کلی داوران تفاوتی

Archive of SID
www.SID.ir

بین نمونه شاهد و نمونه های حاوی غلظت های مختلف رنگ قائل نشدند. لذا می توان گفت افزودن رنگ آناتو بدون تاثیر بر عطر و طعم فراورده، سبب بهبود رنگ آن شده است.

نتایج اندازه گیری تاثیر شرایط نگهداری شامل نور–دمای محیط، تاریکی–دمای محیط و تاریکی– دمای یخچال در جدول ۴–۸ نشان داده شده است. بر اساس آنالیز واریانس انجام شده تنها تاثیر نور–دمای محیط بر تغییرات رنگی نمونه ها معنی دار بود و دو تیمار تاریکی– دمای محیط و تاریکی–دمای یخچال تاثیر معنی داری بر تغییرات ویژگی های رنگی نداشتند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که موثرترین عامل در تغییرات رنگ پودر آناتو عامل نور می باشد که درصورت حذف آن با استفاده از بسته بندی های مناسب می توان کیفیت پودر رنگ های استخراجی را تا حدود زیادی حفظ نمود.

تاثیر نور بر تجزیه بیکسین در مطالعات مختلفی نشان داده شده است. نجار و همکاران (۱۹۸۸) نشان دادند که نور مهمترین عامل مخرب در بین عوامل مختلف همچون هوا، آنتی اکسیدان ها و پراکسیدان ها بر پایداری بیکسین در محلول کلروفرم طی دوره نگهداری می باشد.

بالاس وای و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که کاهش معنی دار میزان بیکسین در اولئورزین آناتو، پودر آناتو و دانه آناتو نگهداری شده در شرایط نور اتاق در مقایسه با تیمارهای نگهداری شده در تاریکی مشاهده می شود.

۷-٤-نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی پودر آب پنیر

در آینده نزدیک کاربرد رنگ های طبیعی در محصولات غذایی با آگاهی بیشتر مصرف کنندگان و افزایش محدودیت های قانونی برای استفاده از رنگ های سنتزی افزایش می‌یابد (رائو و همکاران، ۲۰۰۴). لذا تعیین شرایط کاربرد و پایداری رنگ های طبیعی در سیستم های مدل غذایی مختلف ضروریست.

مطابق جدول ۴–۱۳، اثرات مستقل و متقابل همه متغیرهای محیطی شامل شرایط نور و تاریکی، دمای نگهداری و زمان نگهداری بر تغییرات میزان روشنی (پارامتر L) نمونه ها معنی دار بود ($p\leq ۰/۰۵$) .

همانگونه که در جدول ۴–۱۴ مشاهده می شود اثرات مستقل و متقابل همه متغیرهای محیطی شامل شرایط نور و تاریکی، دمای نگهداری و زمان نگهداری بر تغییرات میزان قرمزی نمونه ها (پارامتر a) معنی دار بود ($p\leq ۰/۰۵$) .

Archive of SID
www.SID.ir

مطابق جدول ۴-۱۵، اثرات مستقل و متقابل متغیرهای محیطی شامل شرایط نور و تاریکی و دمای نگهداری بر تغییرات میزان زردی- آبی بودن نمونه ها معنی دار بود ($p\leq ۰/۰۵$) . تنها اثر مستقل دمای نگهداری بر فاکتور b معنی دار نبوده ($p>۰/۰۵$) و نمونه های نگهداری شده در دمای محیط و دمای ۳۷ درجه میزان زردی مشابهی داشتند.

در بررسی اثرات مستقل تیمارها، مشاهده شد که حضور و عدم حضور نور در محیط نگهداری سبب تفاوت معنی دار میزان روشنی، قرمزی و زردی نمونه ها می شود. نور از طریق تسریع اکسیداسیون باندهای دوگانه کونژوگه کاروتنوئیدها میزان رنگ را کاهش می دهد (غفور و چوئی، ۲۰۰۹ و زانگ و همکاران، ۲۰۱۰).

همچنین با گذشت زمان از میزان روشنی نمونه ها کاسته شده (رنگ نمونه ها تیره تر شدند)، میزان قرمزی افزایش و میزان زردی کاهش نشان داد.

در مجموع می توان نتیجه گرفت در نمونه های نگهداری شده در تاریکی رنگ نمونه ها درخشانتر (روشنی بیشتر و زردتر) می باشد که لزوم نگهداری رنگ استخراج شده در شرایط بسته بندی غیرقابل نفوذ به نور را نشان می دهد. همچنین مطالعات بیشتر به منظور تعیین عمر ماندگاری این رنگ ها ضروری می باشد.

در پژوهش های دیگری نیز پایداری رنگ آناتو مورد مطالعه قرار گرفته است. از جمله پایداری رنگ محلول های آناتو تجاری با در معرض قرار دادن آنها در برابر دماهای ۹۰،۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵۰ دقیقه توسط فرایر و همکاران (۱۹۹۹) مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه میزان روشنی، قرمزی و غلظت نوربیکسین تعیین شد. بر طبق گزارش این محققان طی حرارت دیدن میزان زردی افزایش و میزان قرمزی کاهش می یابد که ناشی از تخریب بیکسین می باشد. بررسی سینتیک واکنش نشان داده است که تخریب ویژگی های رنگی از واکنش درجه اول تبعیت کرده و تخریب نوربیکسین با واکنش های درجه دوم برازش می شود.

رائو و همکاران (۲۰۰۴) نیز پایداری رنگ آناتو را در سیستم مدل غذایی تحت شرایط پخت متفاوت مورد بررسی قرار دادند. آنها نیز گزارش کردند که بیکسین در دماهای پایین پایداری مناسبی داشته اما دماهای بالا سبب تخریب ساختار آن می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

۷-۵-نتیجه گیری

با توجه به اهمیت سلامت بخشی رنگ های طبیعی و وجود منابع طبیعی بالقوه فراوان برای استخراج این نوع رنگ ها، استخراج و کاربرد رنگ های طبیعی در محصولات غذایی مختلف قدمی ارزشمند در ارتقاء سطح سلامت عمومی جامعه خواهد بود. بر اساس یافته های این پژوهش، رنگ آناتو را می توان تحت شرایط بهینه حلال هیدروکسید سدیم، دمای C^o ۴۶/۴۱، زمان ۲/۰۵ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵ استخراج نمود. افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بیشترین اثر مستقیم را بر بازده استخراج داشته و دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نشان ندادند. مدل رگرسیونی درجه دوم تحت شرایط مختلف حلال و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی خلوص رنگ آناتو را طی استخراج پیش بینی می کند. همچنین موثرترین عامل در تغییرات رنگ پودر آناتو، عامل نور تشخیص داده شد که درصورت حذف آن با استفاده از بسته بندی های مناسب می توان کیفیت پودر رنگ های استخراجی را تا حدود زیادی حفظ نمود. نتایج مشابهی در خصوص پایداری پودر رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی پودر آب پنیر مشاهده شد.

۷-٦-پیشنهاد پژوهش های آینده

- بهینه سازی شرایط استخراج رنگ آناتو توسط دیگر روش های آماری، مثل شبکه عصبی و...
- بررسی تاثیر فرایندهای نوین (فراصوت، میدان الکتریکی پالسی، پلاسما، سیال فوق بحرانی، و ...) بر راندمان استخراج و ویژگی های فیزیکوشیمیایی و عملکردی رنگ آناتو
- مدل سازی پایداری رنگ آناتو در شرایط مختلف
- کاربرد رنگ آناتو در سایر سیستم های مدل غذایی و بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی مواد غذایی
- تولید ریز و نانو کپسول های رنگ آناتو و بررسی ویژگی های آنها
- بررسی ویژگی های عملکردی و زیست فراهمی رنگ آناتو در مواد غذایی مختلف

Archive of SID
www.SID.ir

فهرست منابع

Archive of SID
www.SID.ir

- بلوریان، شادی.، حسینی، فرشته.، رحیمی زاده، محمد.، فضلی بزاز، بی‌بی صدیقه.، کریمی، مهدی و نجف نجفی، مسعود. ۱۳۹۰. *رنگ‌های طبیعی خوراکی*. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- بلوریان، شادی.، حسینی، فرشته.، کامکار، آیدا. ۱۳۹۰. بهینه سازی شرایط استخراج کورکومین از ریزوم زردچوبه به روش سطح پاسخ. جهاد دانشگاهی.
- حسینی، ه.، شابزاز، م.، اسدی‌نژاد، ش. ۱۳۸۷. افزودنی‌های مجاز خوراکی ایران. انتشارات وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی معاونت غذا و دارو.
- رشیدی، حسین. ۱۳۸۵. اصول تولید پنیر و فرآورده‌های آب پنیری. مشهد. انتشارات پژوهش توس.
- رنجبر، آ. مقصودلو، ی. قربانی، م. صادقی ماهونک، ع. ۱۳۸۹. نقش تیمار اتانولی و آنزیم پکتیناز بر راندمان استخراج لیکوپن از ضایعات صنایع تبدیلی گوجه فرنگی. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران.
- زند، ن. ۱۳۸۱. جایگزین کردن رنگ‌های طبیعی به جای رنگ مصنوعی در فرآورده حجیم شده برپایه ذرت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی.
- صابریان، ح.، بلوریان، ش.، حسینی، ف. ۱۳۹۶. تاثیر روش فراصوت بر استخراج رنگ خوراکی کلروفیل از برگ درخت شاتوت، فصلنامه علمی پژوهشی فناوری های نوین غذایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران. ۴ (۱۶). ۶۷-۷۶.
- صابریان، ح.، بلوریان، ش.، حسینی، ف. ۱۳۹۶. بهینه سازی شرایط استخراج رنگ طبیعی کلروفیل از یونجه و بررسی ویژگی های کمی و کیفی آن در مقایسه با منابع گیاهی مختلف، علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۴ (۷۱): ۴۷-۵۷.
- مرتضویان، امیرحمد. سهراب وند، سارا. ۱۳۸۵. پروبیوتیک‌ها و فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک (ترجمه)، تهران. انتشارات اتا.

Archive of SID
www.SID.ir

- مشرف بروجنی، ل.۱۳۸۶. بررسی تولید رنگ خوراکی قرمز از چغندر لبوئی و پایداری آن در خلال فرآیندهای غذایی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.
- یلمه، م.؛ حبیبی نجفی، م. ب.؛ حسینی، ف.؛ فرهوش، ر. ۱۳۹۳. ارزیابی اثر ضدباکتریایی رنگ آناتو بر سالمونلا انتریتیدیس موجود در سس مایونز، مجله علوم غذایی و تغذیه جلد ۱۱، شماره ۴۴، ص ۱۷-۲۲.
- یلمه، م.؛ حبیبی نجفی، م. ب.؛ حسینی، ف.؛ فرهوش، ر. ۱۳۹۲. بهینه سازی شرایط استخراج رنگدانه آناتو به روش ماسراسیون و بررسی اثرات ضد میکروبی آن در شرایط in vitro و در سیستم مدل غذایی (سس). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
- Akhtar, M.H., Bryan, M. 2008. Extraction and quantification of major carotenoids in processed foods and supplements by liquid chromatography. Food Chemistry, 111: 255–261.
- Alves de Lima, R.O., Azevedo, L., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. 2003.Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. Food and Chemical Toxicology,41: 189–192.
- Barbosa, M.I.M.J., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z.2005. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations, Food Research International, 38:989–994.
- Balaswamy, K., Prabhakara Rao, P.G., Satyanarayana, A. & Rao, D.G. 2006. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. LWT, 39: 952–956.
- Barnicoat, C.R. 1937. The reaction and properties of annatto as a cheese colour. J. Dairy Res., 8: 61-73.
- Bas, D., Boyanci, I.H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering,* 78: 836-845.
- Baysal, T., Ersus, S., Starmans .D. A. J.2000.Supercritical CO_2 Extraction of β-Carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste. *J. Agric. Food Chem.48* (11):5507–5511.
- Becerril, R., Gomez-Lus, R., Goni, P., Lopez, P., Nerin, C. 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against E. coli and S. aureus. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,388:1003–1011.

Archive of SID
www.SID.ir

- Bhalkar, S.V., Dubash, P.J. 1983. Methods of extraction of Annatto from the seeds of Bixa orellana. *Ind. J. Dairy Sci.*, 36: 157-161.
- Boyd, W.A., 2000, Annatto and other carotenoid food colorants in dairy applications, INF/COL 2000. The fourth international symposium on natural colorants: San Diego. April 2-5,337p.
- Burt, S. 2004. Essential Oils:Their Antibacterial Properties and Potentional Applications in Foods, a Review. *International Journal of Food Microbiology.* 94: 223-253.
- Calvo, M. M., Garcia, M. L., Selgas, M. D. 2008. Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat Science*, 80: 167-172.
- Cardarelli, C. R., Benassi, M. T., Mercadante, A. Z. 2007. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant colour properties. *Food Science and Technology*, 41, 1689-1693.
- Chandel, U., Begum, T., Syedy, M. 2014. Pharmacological Studies of Annatto (Bixa orellana L.), Int. J. Phar. & Biomedi. Rese. 1(1):17-20.
- Chiste, R.C., Yamashita, F., Gozzo, F.C., Mercadante, A.Z. 2011. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. Journal of Chromatography A, 18 (1):57-63.
- Choudhari, S.M., Ananthanarayan, L. 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. Food Chemistry, 102:77-81.
- Chowdhury, A. I., Molla, A. I., Sarker, M., Rana, A. A., Ray, S. K., Nur, H. P., Karim, m. m. 2010. Preparation of edible grade dye and pigments from natural source Bixa orellanae Linn . International Journal of Basic & Applied Sciences, 10; (4): 7-22.
- Chuyen, H.V., Hoi ,N. T.N &. Eun, J.B. 2012. Improvement of bixin extraction yield and extraction quality from annatto seed by modification and combination of

Archive of SID
www.SID.ir

different extraction methods. International Journal of Food Science and Technology, 47:1333–1338.

- Dean, A.; Voss, D. 2002. Design and analysis of experiments. Springer Verlag, New York. pp. 547-592.
- Delgado, V. F. and P. L. Octavio. 2003. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses.
- Doherty. S.B, Gee. V.L. , Ross, .R.P. Stanton. C, Fitzgerald .G-F, Brodkorb .A. (2010) Efficacy of whey protein gel networks, as potential viability- enhancing scaffolds for cell immobilization of lactobacillus rhamnosus GG. *Journal of Microbiological Methods*, 80:231-241.
- Ezuruike, F.U., Prieto, M.J., 2014. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations, *Journal of Ethnopharmacology.*
- FAO. 1995. Annatto seed and its extracts. In Natural .
- Ferreira, J.M., Sousa, D.F., Dantas, M.B., Fonseca,S.G.C., Menezes, D.B., Martins, A.M.C., deQueiroz, M.G.R., 2013. Effects of Bixa orellana L. Seeds on Hyperlipidemia, Phytother. Res., 27:144–147.
- Fisher J.F, Rouseff R.L. 1986. Solid-phase extraction and HPLC determination of b -cryptoxanthin and α and β-carotene in orange juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 34: 985–989.
- Fujita, H., Nakano, M., Sasaki, M. 1988. Mutagenicity test of food additives with Salmonella Typhimurium TA97 and TA102. Kenkyu Nenpo-tokyo-toritsu Eisei kenkynsho., 39: 343-350. 15 .
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D.C. and Rankin, S.A. 2003. Antimicrobial Properties of Commercial Annatto Extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage microorganisms. Journal of Food Protection, 66, 1074-1078.
- Galindo-Cuspinera,V., Rankin, A.S. 2005. Bioautography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts, J. Agric. Food Chem.,;53:2524−2529.

Archive of SID
www.SID.ir

- Ghafoor, K., Choi, Y.H. 2009. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 52(3), 295-300.
- Giridhar, P., Venugopalan, A., Parimalan, R.,2014. A Review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing – A Food Technology Perspective, Journal of Scientific Research & Reports, 3:2:327-348.
- Gross, J., Gabai, M., Lifshitz, A. 1971. Carotenoids in juice of Shamouti orange. Journal of Food Science. 36: 466–473.
- Henry, B.S., (1996). Natural food colours, in Natural Food Colorants. G.A.F. Hendry and J.D. Houghton, Eds. Chapman & Hall, New York. pp: 40–79.
- Hill, W.J.; Hunter, W.G. 1966. A review of response methodology: A literature survey. *Technometrics,* 8 4): 571-590.
- Hung, S.-M., Hsu, B.-D., & Lee, S. (2014). Modelling of isothermal chlorophyll extraction from herbaceous plants. *Journal of Food Engineering; 128*: 17-23.
- Irobi, O.N., Moo-Young, M., Anderson, W.A., Antimicrobial activity of Annatto (*Bixa Orellana*), *International Journal of Pharmacognosy*,1996;34:2:87-90.
- Karrer, P., helfenstein, A., Widmer, R., Van Itallie, T.V. Ueber 1929. Bixin. Helv. Chim. Acta. 12: 741-756.
- Kaur, D., Wani, A. A., Oberoi, D. P. S., Sogi, D.S. 2008. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. Food Chemistry. 108: 711–718.
- Kehilia, M., Kammlott, M., Choura, S., Zammel, A., Zetzl, C., Smirnova, I. Allouched , N., Sayadia, S. 2017.LaboratorySupercritical CO2 extraction and antioxidantactivity of lycopene and beta-carotene-enrichedoleoresin from tomato (Lycopersicum esculentum L.)peels by-product of a Tunisian industry. food and bioproducts processing, 102:340–349.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A., Manazir, A.S., Siddiqui, M., Khan, A.U., 2009. Antimicrobial activity of five herbal extractsagainst multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus ofclinical origin, Molecules, 14: 586-597.

Archive of SID
www.SID.ir

- Khazaei, K.M., Jafari, S.M., Ghorbani, M., Hemmati Kakhki, A. Sarfarazi, M. 2016. Optimization of Anthocyanin Extraction from Saffron Petals with Response Surface Methodology. Food Anal. Methods, 9:1993–2001.
- Kiokias, S., Gordon, M. H., 2003, Antioxidant properties of annatto carotenoids, Food Chemistry, 83 523–529.
- Kong, W., Liu, N., Zhang, J., Yang, Q., Hua, S., Song, H., & Xia, C. 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from Chlorella vulgaris residue after lipid separation using response surface methodology. *Journal of food science and technology; 51*(9): 2006-2013.
- Kovary, K., Louvain, T.S., Costa e Silva, M.C., Albano, F., Pires,B. B. M., G.A.T. Laranja, Lage, C.L.S and Felzenszwalb, I.2001.Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. *British Journal of Nutrition ,* 85: 431-440.
- Kurniawati, T., Soetjipto, H., Limantara, L. 2007. Antioxidant and antibacterial activities of Bixin pigment from Annatto (*Bixa orellana L.)* seeds. Indo. J. Chem, 7 (1): 88 – 92.
- Lauro, G.J. 1991. A primer on natural Colors. Cereal Foods World, 36: 949-953.
- Levy, L.W., Regalado, E., Navarrete, S., Watkins, R.H., 1997, Bixin and Norbixin in human plasma: Determination and study of the absorption of a single dose of annatto food color. *Analyst*, 122: 977-980.
- Li, j., Zhang, L. & Liu, Y. 2013. Optimization of extraction of natural pigment from purple sweet potato by response surface methodology and its stability. *Journal of Chemistry*, 5 -10.
- Mason, T.J., Paniwynka, L., Lorimer, J.P. 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3: 253-260.
- Mccann, D., Barrett, A., Cooper, A. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. The Lancet.,6736(07)61306-3 1. 21

Archive of SID
www.SID.ir

- McKeown, G.G., 1965, Composition of oil-soluble annatto food colors. Structure of the yellow pigment formed by thermal degradation of bixin, J.Ass. Offic. Agric.*Chem,*48:835-837.
- Melendez-Martinez, A. J.,Vicario, I. M., Heredia, F. J. 2007. Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 638–649.
- 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.
- Mikkelsen, H., Larsen, J.C., Tarding, F. 1978, Hypersensivity reactions to food colours with special refernce to the natural colour annatto extract (butter colour), Arch. Toxicol., Suppl. 1: 141- 143.
- Mizubuti, I.Y.; Junior, O.B.; de Olivia souza, L.W.; dos Santos Ferreira da Silva, R.S.; Ida, E.I. 2000. Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry*, 70: 259-265.
- Morrisson, E.Y., Thompson, H., Pascoe, K., West, M., Fletcher, C. 1991. Extraction of a hyperglycaemic principle from the annatto, a medicinal plant in the west indies. Trop. Geogr. Med., 43: 184-188.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., 2002, Response surface methodology: process and product. Optimization using designed experiments, 2nd Ed, Wiley Pub Inc, New York. pp. 51-83.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. 2009. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 3rd edition. John Wiley & Sons, New York.
- Najar, S.V., Bobbio, F.O. & Bobbio, P.A. 1988. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). Food Chemistry, 29: 283–289.
- Nichenametla, S. N., T. G. Taruscio, D. L. Barney and J. H. Exon. 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46: 161-183.

Archive of SID
www.SID.ir

- Nigg, J.T.1, Lewis, K., Edinger, T., Falk, M. 2012. Meta-analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 51(1):86-97.
- Oberoi, D.P. S. & Sogi, D.S. 2017. Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology. Food Chemistry 232,316–321.
- Ochoa, O.M. 1999, Caracterizacion productiva de 67 plantas de achiote (*Bixa orellana L.)* presentes en el estado de Yucatan, Mexico. Thesis. Universidad Autonoma de Chapingo. Temozon Norte. Merida Mexico, 98 p.
- Preston, H. D., & Rickard, M. D. 1980. Extraction and chemistry of annatto. Food Chemistry, 5:47–56.
- Quiros, A. R. B, Costa, H.S. 2006. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 97–111.
- Rajendran, R. 1990, Achiote: Bixa orellana L. A natural food color and dye. 1st ed. College of agricultural science, AES: Guam., 73: 8 p.
- Ramamoorthy, S., Doss, F.P., Kundu, K., Satyanarayana, V.S.V., Kumar, V., 2010, Molecular characterization of bixin—An important industrial product, Industrial Crop and Products 32, 48–53 .
- Ramamoorthy و S., Palackan, M.G., Maimoon, L., Geetha, T., Bhakta, D., Balamurugan, P., and Rajanarayanan, S. 2011. Evaluation of Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Properties of Some Food Dye. Food Science and Biotechnology, 20(1): 7-13.
- Reith, J.F., Gielen, J.W. 1971, Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracs, J. Food Sci. Aliment., 20: 143- 152.
- Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. 2003. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans, Mutation Research, 544:195–201.
- Sadler, G., Davis, J., and Dezman, D. 1990. Rapid extraction of lycopene and b-carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. J. Food Sci. 55, 1460– 1461.

Archive of SID
www.SID.ir

- Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P. G., Rao, D. G., 2003. Chemistry, processing and toxicology of annatto (Bixa orellana L.), Journal of Food Science and Technology;40:2:131-141.
- Scotter, M., 2009.The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review, Food Additives and Contaminants,;26:8: 1123–1145.
- Sinha, K., Chowdhury, S., Saha, P.D., Datta, S. 2013. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of Bixa orellana (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural Network (ANN). Industrial Crops and Products,41:165– 171.
- Smith, J., 2006; Annatto extracts, CAT, FAO, 21:1-21.
- Somacal, S., Figueiredo, G.C., Quatrin, A., Ruviaro, R.A.,et al. 2015.The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects, Mol Cell Biochem.,; Springer.
- Stewart, I. 1977. High performance liquid chromatographic determination of provitamin A in orange juice. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 60: 132–136.
- Taham T, Cabral FA, Barrozo AS. 2015. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. J Supercrit Liquid. 100: 175-183.
- Taungbodhitham, A.k., Jones, G.P., Wahlqvist, M.L., Briggs, D.R. 1998. Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. Food Chemistry, 63 (4): 577-584.
- Tibodeau, J.D., Isham, C.R., Bible, K.C. 2010. Annatto Constituent Cis-Bixin Has Selective Antimyeloma Effects Mediated by Oxidative Stress and Associated with Inhibition of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. Antioxidants & Redox Signaling, 13(7): 987-997.
- Vasu, S., Palaniyappan, V., Kothandam, H. P., Badami, S. 2010. Microwave facilitated extraction of Bixin from Bixa orellana and it’s in-vitro antioxidant activity, Der Pharmacia Lettre. 2010. 2 (2): 479-485.

Archive of SID
www.SID.ir

- 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 comparison with the conventional method. Food chemistry; 178: 106-114.
- Wasmund N, Topp I, Schories D. 2006. Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. Oceanologia; 48:125–144.
- www.irica.gov.ir/Persian/AmarView/MonthView.aspx
- www.isiri.org, INSO 740, 2880.
- Xu, F.-f., Ye, L.-m., Xu, W.-h., & Zeng, J.-p. 2010. Comparison of Methods of chlorophyll Extraction in Chinese Cabbage. *Northern Horticulture; 23*: 013.
- Zhang, L.L., Xu, M., Wang, Y.M., Wu, D.M., Chen, J.H. 2010. Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from Infructescence of Platycarya strobilacea using response surface methodology, Molecules, 15:7923-7932.

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract:

In this research, the effects of solvent type, solvent to seed ratio, temperature and time of extraction on the yield, the color purity and the yield of bixin/ norbixin of annatto were studied. Central Composite Design with 4 parameters including of solvent type (acetone, NaOH and acetone-NaOH), solvent to seed ratio (1:1 to 5:1 ml/g), time (2-6 h) and temperature of extraction (25-65 ºC) in three levels (-1, 0 and +1) was employed. The results indicated that the quadratic model was significant for the yield of annatto and R_2 = 0.915, indicating that 91.5 % of the change in the responses could be predicted by the fitted model. In addition, the temperature and time of extraction had no any significant effect on the extraction yield. The maximum yield was predicted by NaOH under the 46.41 ºC, 2.05 h and solvent to seed ratio of 5:1, which was 13.31 %. The quadratic model was significant for the color purity of annatto and R_2 = 0.848. By changing the solvent from acetone to NaOH and increasing the solvent to seed ratio, the color purity increased. Furthermore, bixin/ norbixin yield, which is the weight ratio of bixin or norbixin to annatto seed, was determined and calculates as a comprehensive response. The most effective factor in the color change of annatto powder was determined as light and if it removed, using suitable packaging, it would be possible to maintain the best quality of the powder .Similar results were obtained regarding the stability of annatto dye in the whey powder.

Keywords: Bixin, Norbixin, Color Purity, Spectrophotometery, L*

Archive of SID

www.SID.ir

ACECR

The Final Report:

Optimization of annatto dye extraction in semi-industrial scale and evaluation of its stability

Code: 20- 2336

Food Science and Technology Research Institute
Food Additives Research Group

Fereshte Hosseini

2018

Archive of SID

www.SID.ir