نشریه علمی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی علوم و فناوری رنگ/ ۱۴ (۱۳۹۹)، ۲۸۰ـ۲۷۳
نوع مقاله: پژوهشی
20.1001.1.17358779.1399.14.4.3.7

استخراج ماده رنگزای خوراکی از برگ گیاه تاج خروس (Amaranthus celosia cristata) و بررسی پایداری آن در شرایط مختلف

زهرا توکلی[۱]، سعیده عربشاهی دلویی[۲*]

۱ـ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران، صندوق‌پستی: ۳۰

۲ـ استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران، صندوق‌پستی: ۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۹/۸/۲۰

چکیده

گیاه تاج خروس با نام علمی Amaranthus celosia cristata از خانواده Amaranthaceae دارای ماده رنگزای بتالائین از نوع بتاسیانین‌ها می‌باشد. در این تحقیق، پس از عصاره‌گیری نمونه‌های برگ تاج خروس با دو حلال (متانول-آب اسیدی شده و غیر اسیدی) و نیز دو روش (آبگیری و استخراج جامد-مایع)، پایداری عصاره انتخاب شده تحت شرایط مختلف مانند pH ، دما، نور و تاریکی مورد بررسی قرار گرفت . نتایج اثر pH بر پایداری عصاره استخراج شده نشان داد که بیشترین جذب (پایداری) مربوط به pH=۵ و کمترین آن مربوط به pH=۸ است. با افزایش دما از ۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد، میزان پایداری عصاره به طور معناداری کاهش یافت و افزایش زمان انکوبه کردن عصاره در هر دما (بجز ۴ درجه سانتی‌گراد) نیز سبب کاهش معنی‌دار در پایداری عصاره گردید ($p<۰,۰۵$). نگهداری عصاره در شرایط نوری مختلف (تاریکی، نور مرئی و پرتو فرابنفش) برای مدت زمان های متفاوت نشان داد که بیشترین پایداری مربوط به شرایط تاریکی بود و افزایش زمان نگهداری سبب کاهش پایداری عصاره در هر حالت گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره استخراج شده در دماهای پایین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در pH=5 و در تاریکی از پایداری بیشتری برخوردار می‌باشد. این ماده رنگزای طبیعی را می‌توان به عنوان رنگ دهنده در فرآورده‌هایی مثل بستنی، شربت‌های یخ، ماست و نیز برای رنگ بخشیدن به راحت‌الحلقوم‌ها، پوشش شیرینی‌ها و کرم های وسط شیرینی به کار برد.

واژه‌های کلیدی: تاج خروس، ماده رنگزای خوراکی، پایداری، pH، دما، استخراج.

Extraction of Food Colorant from Amaranth Celosia Cristata Leaf and Evaluation of Its Stability

Z. Tavakoli, S. Arabshahi-Delouee*

Department of Food Science and Technology, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, P. O. Box: 30, Azadshahr, Iran.

Received: 15-09-2019 Accepted: 01-01-2020 Available online: 10-11-2020

Abstract

Amaranth scientifically named Amaranthus celosia cristata belonged to Amaranthaceae is one of the plants which contains betalain pigments. In this study, after extraction of Amaranthus leaves by two solvents (methanol-water acidified and non-acidified) and two methods (dehydration and solid-liquid extraction), the stability of the selected extract was investigated under various conditions such as pH, temperature, light and darkness. The results of pH effect on extract stability showed that the highest adsorption was related to pH=5 and the lowest to pH=8. With increasing temperature (4 to 60°C), the extract stability decreased significantly. Moreover, increasing the incubation time of the extract at any temperature (except 4°C) caused a significant reduction in the stability of the extract ($p<0.05$). Storage of the extract in different light conditions (darkness, visible light and ultraviolet) for different periods of time showed that the highest stability was related to the dark conditions and increasing the storage time reduced the stability of the extract in each case. The results showed that the extract was more stable at temperatures below 25 °C, pH=5 and darkness. This natural colorant can be used in food products such as ice cream, ice syrup, yogurt, and in the coloring of easily-swallowed candy, sweets, and mid-cream. J. Color Sci. Tech. 14(2021), 273-280©. Institute for Color Science and Technology.

Keywords: ***Amaranthus celosia cristata*, Food colorant, Stability, pH, Temperature, Extraction.**

***Corresponding author**: **sarabshahi@iauaz.ac.ir**
saeedeh_arabshahi@yahoo.com

۱ـ مقدمه

یکی از عوامل مؤثر در جلب نظر و انتخاب موادغذایی، فام آنها می‌باشد که از طریق احساس بینایی دریافت می‌گردد و وجود آن در تشخیص سریع و پذیرش نهایی هر فراورده غذایی مؤثر بوده، زیرا رنگ باعث جذابیت موادغذایی می‌گردد. بنابراین استفاده از مواد رنگزا جهت ایجاد فام مطلوب در فرآورده‌های غذایی از قرن‌ها پیش رایج بوده است [۱]. مواد رنگزای مورد استفاده در صنایع غذایی از نظر منشا تولید به سه دسته طبیعی، مصنوعی و معدنی تقسیم می‌شوند. مواد رنگزای معدنی به دلیل ناخالصی‌های موجود به ویژه وجود عناصر فلزی سنگین به ندرت در مواد غذایی استفاده می‌شوند [۱]. مواد رنگزای مصنوعی ترکیبات شیمیایی هستند که در طبیعت وجود نداشته و با استفاده از روش‌های شیمیایی و سنتز مواد آلی ساخته می‌شوند [۲]. مواد رنگزای طبیعی از منابع طبیعی مانند انواع گیاهان استخراج می‌شوند. این ترکیبات به لحاظ خواص تغذیه‌ای و درمانی مطلوب‌ترین گزینه مصرفی در صنعت می‌باشند [۳]. با افزایش مضرات و خطرات مواد رنگزای مصنوعی در مواد غذایی، استخراج و خالص‌سازی مواد رنگزا از منابع طبیعی ارزان قیمت مورد توجه خاصی قرار گرفته است [۴]. از مهم‌ترین مزایای مواد رنگزای طبیعی می‌توان به تنوع و گستردگی فام، شفافیت و عدم تاثیرات مخرب بر سلامت انسان و محیط زیست اشاره نمود [۵]. ازجمله مواد رنگزای طبیعی می‌توان به کلروفیل، آنتوسیانین، تانن، فلاونوئید، کاروتنوئید، بتالائین و غیره اشاره کرد. این ترکیبات در گیاهانی مانند زرشک، چغندرقرمز، زعفران، تمشک وجود دارند. بتالائین‌ها مواد رنگزای قرمز و زرد بوده و محلول در آب هستند، این مواد رنگزا در میخک سانان (مانند کاکتوس‌ها و تاج خروس) یافت می‌شوند، بتالائین‌ها عامل ایجاد رنگ قرمز عمیق چغندر قرمز هستند و از نظر تجاری هم به عنوان عوامل رنگ‌دهنده غذایی استفاده می‌شوند [۶].

گیاه تاج خروس با نام علمی *Celosia Cristata Amaranthus* و از خانواده *Amaranthaceae*، یکی از گیاهانی است که مواد رنگزای موجود در آن متعلق به بتالائین‌ها و از نوع بتاسیانین‌ها می‌باشد [۷]. گیاه تاج خروس در سال‌های اخیر به عنوان یک گیاه زراعی جدید مطرح شده است. به لحاظ گیاه‌شناسی تاج خروس در گروه گیاهان شبه غلات قرار دارد. برگ‌های گل تاج خروس، خوراکی و تا حدودی شبیه برگ‌های چغندر یا اسفناج است [۸]. بتالائین موجود در برگ‌های گیاه تاج خروس اگر به‌درستی استخراج شود منبع بسیار خوبی از یک ماده رنگزای طبیعی به شمار می‌آید [۹]. باقی‌پور و همکارانش بتالائین چغندر قرمز را با دو روش آبگیری و استخراج جامد-مایع استخراج کرده و با استفاده از طیف‌سنج مرئی- فرابنفش مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیق مشخص ساخت که عصاره استخراج شده با روش آب‌گیری در دماهای پایین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH= ۵ و در شرایط تاریکی از پایداری بیشتری برخوردار است [۱۰]. بحرینی و همکارانش آنتوسیانین‌های موجود در پوست بادمجان را با کمک حلال‌های مختلف استخراج نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که محتوای آنتوسیانین کل عصاره‌ها با افزایش دما و زمان نگهداری کاهش می‌یابد و همچنین بهترین دمای نگهداری این ترکیبات ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد [۱۱]. واتای و همکارانش استخراج و فرمول‌بندی محلول غلیظ آنتوسیانین حاصل از تفاله انگور را بررسی نموده، سپس محلول تغلیظ شده را به شکل پودر و به همراه نشاسته و سیلیکا تولید نمودند. نتایج نشان داد که این فرآیند پایداری آنتوسیانین‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۲]. با توجه به تحقیقات انجام شده در مورد مواد رنگزای مصنوعی و اثر سو آن بر سلامت مصرف کننده، استفاده از مواد رنگزای طبیعی در فراورده‌ها می‌تواند سلامت مصرف کننده را همراه داشته باشد. گیاه تاج خروس منبع مناسبی از مواد رنگزای طبیعی غذایی به شمار آمده و چه بسا استخراج مواد رنگزا و بررسی پایداری و کاربرد آن در فرآورده‌های غذایی، ما را به سوی ایمن‌تر شدن موادغذایی مطلوب هدایت کند. با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون، استخراج مواد رنگزا از تاج خروس، بررسی پایداری و استفاده از آن در موادغذایی بررسی نشده است، لذا در این تحقیق استخراج مواد رنگزا از برگ تاج خروس، با حلال‌ها و روش‌های مختلف و نیز پایداری عصاره‌های حاصل در شرایط مختلف (دما، pH و نور و تاریکی) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد مصرفی و دستگاه‌های مورد استفاده

متانل، اسید استیک و بافر فسفات از شرکت مرک خریداری شد. برگ‌های گیاه تاج خروس به صورت تصادفی از منطقه رامیان استان گلستان در مرحله رشد جمع‌آوری، شسته و سپس در فریزر ۱۸ ^{o}C - نگهداری شد. از دستگاه تبخیرکننده گردان (آیلا N۱۰۰۰-آلمان) جهت تغلیظ نمونه‌ها و دستگاه خشک کن انجمادی (کریست alpha-آلمان) جهت خشک نمودن عصاره استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط طیف‌سنج (PG اینسترومنت- انگلستان) اندازه‌گیری شد و همچنین جهت جداسازی از سانتریفیوژ (اپندورف۵۸۱۰-آلمان) استفاده گردید.

۲ـ۲ـ روش کار

۲ـ۲ـ۱ـ استخراج عصاره از گیاه تاج خروس

۲ـ۲ـ۱ـ۱ـ استخراج جامد- مایع

جهت استخراج مواد رنگزا از روش جامد- مایع استفاده گردید. ۱۰۰ گرم برگ تاج خروس کاملا خرد شده در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال (۸۰ درصد متانل -۲۰درصد آب) بر روی یک هم‌زن به مدت ۳

ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده و پس از صاف شدن، مایع زیر صافی با استفاده از تبخیرکننده گردان در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. عصاره به دست آمده خشک گردید و جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری شد [۱۳]. برای استخراج متانل- اسید مواد رنگزا از محلول متانل- آب اسیدی شده با اسید استیک ۱٪ استفاده شد و تمام مراحل استخراج مانند روش متانل-آب تکرار گردید [۱۳].

۲ـ۲ـ۱ـ۲ـ استخراج به روش آبگیری

یکی از روش‌های استخراج مواد رنگزا از گیاهان، فرآیند آبگیری است. در این روش برای دستیابی به محصول بیشتر، از فرآیند خرد کردن استفاده می‌شود. ۱۰۰ گرم نمونه برگ تاج خروس به همراه ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال داخل ارلن مایر ریخته و به مدت ۱۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها صاف و مایع زیرین پس از جمع آوری به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مایع بالایی جدا و با استفاده از تبخیرکننده گردان در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حلال جدا گردید [۱۴].

۲ـ۲ـ۲ـ بررسی اثر زمان بر فرآیند استخراج

برای انتخاب زمان استخراج، ۲۰ گرم گیاه تاج خروس خرد شده در ۲۵ میلی‌لیتر متانل، در حال هم‌زدن بر روی یک هم‌زن مغناطیسی در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۳۶۰، ۴۸۰ و ۵۴۰ دقیقه خیسانده شد. جداسازی گیاهان خرد شده مطابق با روش انتخاب حلال انجام شد که ۰٫۴ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده با متانل به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شد، سپس ۲۵ میکرولیتر از آن برداشته و پس از رقیق‌سازی با ۳ میلی‌لیتر آب جذب آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۱۵].

۲ـ۲ـ۳ـ بررسی اثر pH بر پایداری عصاره استخراج شده

عصاره به دست آمده از ۱۰۰ گرم گیاه تاج خروس با آب به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. ۰٫۴ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده توسط محلول بافر فسفات ۰٫۲ مولار در محدوده pH=۲-۸ به حجم ۲۵ میلی‌لیتری رسانده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده برداشته و پس از رقیق‌سازی با ۳ میلی‌لیتر آب جذب آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۱۵].

۲ـ۲ـ۴ـ بررسی اثر دما بر پایداری عصاره استخراج شده

محدوده دمایی ۶۰-۴ درجه سانتی‌گراد مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره به دست آمده از ۱۰۰ گرم گیاه تاج خروس با آب به حجم ۲۵ میلی لیتر رسید. ۰٫۴ میلی‌لیتر عصاره استخراج شده توسط محلول بافر فسفات ۰٫۲ مولار با pH= ۵ دارای بالاترین جذب، به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول‌های تهیه با ۳ میلی‌لیتر آب رقیق شده و جذب اولیه آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای بررسی محدوده دمایی ۶۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد از ترموستات و برای دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از یخچال (۸ ساعت) استفاده شد و هر ۲ ساعت ۲۵ میکرولیتر از محلول‌ها برداشته و پس از رقیق سازی با ۳ میلی‌لیتر آب جذب آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۱۰].

۲ـ۲ـ۵ـ بررسی پایداری عصاره استخراج شده در شرایط نور (مرئی و فرابنفش) و تاریکی

عصاره به دست آمده از ۱۰۰ گرم گیاه تاج خروس با آب به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. ۰٫۴میلی‌لیتر عصاره استخراج شده توسط محلول بافر فسفات ۰٫۲ مولار در pH دارای بالاترین جذب، به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل تحت شرایط نور مرئی، فرابنفش و تاریکی قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. به منظور بررسی نور مرئی، ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده (ارتفاع تقریبی ۲٫۵ میلی‌متر در شیشه ساعت در بسته با قطر ۵ سانتی‌متر) به مدت ۷۲ ساعت زیر لامپ مرئی (لامپ تنگستن مورد استفاده در منازل) در دمای محیط قرار گرفت و در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ۲۵ میکرولیتر از آن برداشته و پس از رقیق‌سازی با ۳ میلی‌لیتر آب، جذب آن توسط طیف‌سنج اندازه‌گیری گردید.

جهت بررسی اثر نور فرابنفش ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده (ارتفاع تقریبی ۲٫۵ میلی‌متر در شیشه ساعت در بسته با قطر ۵ سانتی‌متر) به مدت ۷۲ ساعت زیر لامپ فرابنفش (UV) با طول موج ۲۵۴ نانومتر در دمای محیط قرار گرفت و در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۲۵ میکرولیتر از آن برداشته و پس از رقیق‌سازی با ۳ میلی‌لیتر آب، جذب آن اندازه‌گیری گردید.

به منظور بررسی اثر تاریکی بر عصاره استخراج شده، ۵ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده به مدت ۷۲ ساعت در ظرف دربسته تیره با پوشش ورق آلومینیمی در دمای محیط گذاشته شد و در فواصل زمانی ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۲۵ میکرولیتر از آن برداشته و پس از رقیق‌سازی با ۳ میلی‌لیتر آب، جذب آن توسط طیف‌سنج اندازه‌گیری گردید [۱۵].

۲ـ۲ـ۶ـ تهیه پودر عصاره گیاه تاج خروس

۲ـ۲ـ۶ـ۱ـ بررسی اثر حلال پرانی در میزان استخراج مواد رنگزا

عصاره به دست آمده از ۱۰۰ گرم گیاه تاج خروس با آب به حجم

۲۵میلی‌لیتر رسانده شد. ۰,۴ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده توسط محلول بافر فسفات ۰,۲ مولار در pH بهینه به دست آمده به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول تهیه شده با ۳ میلی‌لیتر آب رقیق‌سازی شده و جذب اولیه آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. ۰,۴ میلی‌لیتر دیگر از عصاره استخراج شده پس از رقیق شدن با بافر فسفات تا حجم ۲۵ میلی‌لیتر در دمای محیط به مدت ۳ روز قرار داده شد تا حلال آن تبخیر شود. پس از تبخیر حلال عصاره خشک شده با آب به حجم رسانده شده و جذب آن توسط طیف‌سنج اندازه‌گیری گردید [۱۵].

۲ـ۲ـ۶ـ۲ـ بررسی اثر خشک کردن انجمادی در میزان استخراج مواد رنگزا

عصاره به دست آمده از ۱۰۰ گرم برگ تاج خروس با آب به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسید. برای رقیق‌سازی بیشتر به منظور اندازه‌گیری جذب ۰,۴ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده توسط محلول بافر فسفات ۰,۲ مولار در بهینه به دست آمده به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از محلول تهیه شده با ۳ میلی‌لیتر آب رقیق سازی و جذب اولیه آن‌ها اندازه‌گیری گردید. محلول اولیه توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک و پودر به دست آمده از برگ تاج خروس با آب به حجم ۷۵ میلی‌لیتر رسانده شد. ۰,۴ میلی‌لیتر از این محلول توسط بافر فسفات ۰,۲ مولار در pH بهینه به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از رقیق‌سازی با آب جذب آن توسط طیف‌سنج اندازه‌گیری گردید [۱۵].

۲ـ۲ـ۷ـ بررسی آماری

داده‌های حاصل بر اساس طرح کاملا تصادفی و به کمک ANOVA بررسی و اختلاف معنی‌دار بین تیمارها به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت و از برنامه اکسل نیز برای ترسیم نمودارهای مربوطه کمک گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ عصاره استخراج شده به روش استخراج جامد- مایع و آبگیری

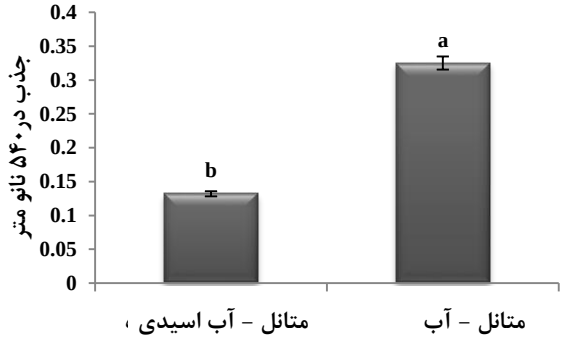
مواد رنگزای بتالائین در داخل ساختمان سلولی گیاهی قرار دارد و جهت خروج آن لازم است ساختار سلولی گیاهی در هم ریخته شود در نتیجه هر چقدر گیاه تاج خروس خردتر شود، تولید عصاره به بیشینه می‌رسد. با توجه به نتایج به دست آمده (شکل ۱) مقدار جذب در روش جامد- مایع ۰,۷۲۵ (۱۰۰ گرم نمونه) و در روش آبگیری ۰,۶۹۲ (۱۰۰ گرم نمونه) می‌باشد. عصاره استخراج شده به روش جامد- مایع جذب بیشتری نسبت به روش آبگیری داشت که نشان دهنده استخراج بیشتر این ماده توسط روش جامد- مایع می‌باشد. بنابراین در مطالعات بعدی استخراج به روش جامد - مایع انجام پذیرفت.

۳ـ۲ـ تعیین حلال جهت استخراج مواد رنگزا در روش استخراج جامد- مایع

حلال مناسب در روش استخراج جامد- مایع توانایی استخراج ترکیبات موثره بیشتری را دارد به همین جهت قبل از بررسی سایر عوامل باید حلال مناسب انتخاب شود. شکل ۲ نشان می‌دهد که از بین حلال‌های متانل- آب و متانل- آب اسیدی شده به کار رفته در روش استخراج جامد- مایع، متانل-آب دارای بازده استخراج بیشتری است.

جدول ۱: اثر روش استخراج (آبگیری و جامد- مایع) بر میزان عصاره گیاه تاج خروس.

روش استخراج	مقدار جذب (۵۴۰ نانومتر)
جامد- مایع	۰,۷۲۵ (۱۰۰ گرم)
آب‌گیری	۰,۶۹۲ (۱۰۰گرم)



شکل ۱: اثر حلال بر استخراج ماده رنگزای بتالائین از گیاه تاج خروس در روش استخراج جامد- مایع (حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۵ درصد است).

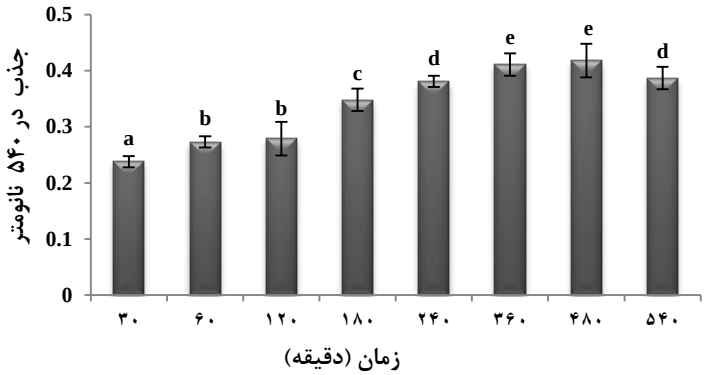
شرایط اسیدی می‌تواند باعث کاهش مقدار جذب و بازده استخراج گردد. نتایج پژوهش حدادی و نجفی پیرامون تعیین بازده استخراج و پایدارسازی مواد رنگزای بتالایین چغندر قرمز تاکید کننده این امر می‌باشد. نتایج این محققین نشان داد که افزودن اسید به حلال‌های آب خالص- اتانل باعث کاهش مقدار جذب عصاره استخراجی از چغندر قرمز می‌شود [۱۶].

۳ـ۳ـ اثر زمان بر استخراج مواد رنگزا در روش استخراج جامد- مایع

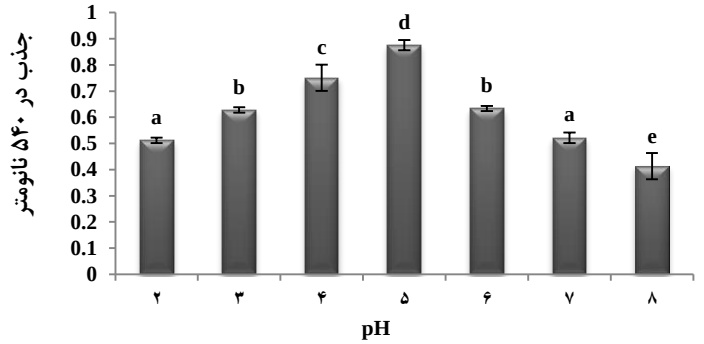
بعد از انتخاب حلال مناسب، برای دستیابی به مقدار بیشینه، عمل استخراج در مدت زمان‌های متفاوت انجام گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، میزان جذب در زمان‌های متفاوت اندازه‌گیری شد و بیشترین میزان جذب در محدوده ۳۶۰ تا ۴۸۰ دقیقه (۶ تا ۸ ساعت) بدست آمد که برای اطمینان از کامل شدن فرآیند استخراج زمان ۸ ساعت به عنوان زمان بهینه استخراج انتخاب گردید. با افزایش بیشتر زمان به علت تجزیه شدن بتالائین‌ها مقدار جذب کاهش می‌یابد. مواد رنگزای بتالایین به شرایطی مانند دما، نور، رطوبت، اکسیژن، دی‌اکسید گوگرد و pH حساس هستند به خصوص در سیستم‌هایی با فعالیت آبی بالا که اثرات متقابلی دارند و این مواد رنگزا به سرعت در چنین محیط هایی تغییر فام می‌دهند [۱۷]. با توجه به حساسیت بتالایین‌ها می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش زمان فرآیند استخراج، اثر این عوامل افزایش یافته و باعث کاهش جذب نمونه‌ها می‌شود.

۳ـ۴ـ اثر pH بر پایداری عصاره تاج خروس

نتایج اثر pH بر پایداری عصاره استخراج شده در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بیشترین جذب مربوط به pH=۵ و کمترین آن مربوط به pH=۸ است. با افزایش میزان pH از ۲ به ۵ میزان جذب به طور معناداری افزایش و بعد از آن با افزایش pH میزان جذب کاهش پیدا کرد ($p<0,05$). شدت فام قرمز محلول‌های حاوی بتالائین در pH بین ۴ تا ۶ تغییر می‌کند ولی در pH کمتر از ۴ فام آن به بنفش تبدیل می‌شود.



شکل ۲: اثر زمان بر استخراج ماده رنگزای بتالائین از گیاه تاج خروس با حلال متانل - آب در روش استخراج جامد- مایع (حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۵ درصد است)



شکل ۳: اثر pH بر پایداری ماده رنگزای (بتالائین) استخراج شده از گیاه تاج خروس با حلال متانل - آب در روش جامد – مایع (حروف کوچک نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۵ درصد است).

این تغییر رنگ تحت شرایط اسیدی قوی به دلیل تبدیل شدن شکل قرمز آنیونی آن به بنفش کاتیونی می‌باشد. در pH بالاتر از ۶ فام محلول‌های حاوی بتالائین آبی می‌شود. این تغییر فام ناشی از جابجایی باتوکرومیک در طول موج بیشینه جذب است. بیشترین اثر آبی در pH=۸ رخ داد. تحت شرایط قلیایی قوی‌تر فام محلول‌های بتالائین به سرعت به قهوه‌ای تغییر کرده و بتالائین از بین می‌رود [۱۶]. با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره استخراج شده در pH=۵ دارای بیشترین پایداری بوده و در نتیجه در آزمون‌های بعدی از pH=۵ استفاده شد. هوانگ و البه با بررسی اثر pH بر روی تخریب و بازسازی بتانین نشان دادند که بتانین مستخرج از چغندر قرمز دارای بیشترین پایداری در pH بین ۴ و ۵ می‌باشد و نتایج به دست آمده از یافته‌های این محققین با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۱۸]. باقی‌پور و همکارانش در استخراج بتالائین از چغندر قرمز با دو روش آب‌گیری و استخراج جامد- مایع بیان داشتند که افزایش pH موجب از بین رفتن مواد رنگزای بتالائین می‌گردد. در تحقیق آنها عصاره استخراج شده به روش آب‌گیری در pH=۵ از پایداری بیشتری برخوردار بود [۱۰]. علیزاده مطلق و همکارانش با بررسی استخراج بتاسیانین از گیاه آمارانتوس به نتایج مشابه دست یافتند [۱۳].

۳ـ۵ـ اثر دما بر پایداری عصاره تاج خروس

جدول ۲ نتایج اثر دما بر پایداری عصاره استخراج شده را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود با افزایش دما میزان پایداری عصاره به طور معناداری کاهش یافته و تنها در زمان صفر با افزایش دما اختلاف معناداری دیده نمی‌شود. همچنین تنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان، میزان پایداری اختلاف معناداری را نشان نداد، ولی در سایر دماها با گذشت زمان، میزان پایداری به طور معناداری کاهش یافت ($p<۰,۰۵$). ماده رنگزای موجود در گیاه تاج خروس نسبت به حرارت حساس بوده و تجزیه می‌گردد [۱۹، ۲۰]. با توجه به نتایج به دست آمده عصاره استخراج شده در محصولاتی مثل بستنی، شربت‌های یخ، ماست و در خامه‌های مورد استفاده در شیرینی‌پزی کاربرد دارد ولی برای محصولاتی که در حین تولید نیاز به حرارت بالا دارند مناسب نمی‌باشد. فخاری زواره و باقی پور با استخراج مواد رنگزای چغندر قرمز و بررسی پایداری آن به نتایج مشابهی دست یافتند و بیان داشتند که با افزایش دما از میزان پایداری عصاره کاسته شده و مواد رنگزا تجزیه می‌گردند [۱۵]. باقی‌پور و همکارانش بیان داشتند که افزایش دما موجب از بین رفتن مواد رنگزای بتالائین می‌گردد. در تحقیق آنها عصاره استخراج شده به روش آب‌گیری در دماهای پایین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد از پایداری بیشتری برخوردار بود [۱۰].

۳ـ۶ـ اثر شرایط نور (مرئی و فرابنفش) و تاریکی بر پایداری عصاره تاج خروس

جدول ۳ نتایج اثر شرایط نوری را بر پایداری عصاره استخراج شده نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد در تمامی زمان‌ها (به جز زمان صفر) بین شرایط نوری مختلف اختلاف معنادار وجود دارد ($p<۰,۰۵$). با افزایش زمان میزان پایداری در هر یک از شرایط نوری به طور معناداری کاهش یافت ($p<۰,۰۵$) و تنها در شرایط تاریکی بین زمان‌های ۲ و ۴ و نیز بین ۶ و ۱۲ ساعت و نور فرابنفش بین زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نگردید ($p<۰,۰۵$). ماده رنگزای بتالائین نسبت به منابع نوری مختلف از قبیل نور مرئی و فرابنفش حساس بوده و تجزیه می‌شود.

جدول ۲: اثر دما بر پایداری ماده رنگزای استخراج شده از گیاه تاج خروس با حلال متانل - آب به روش جامد – مایع (حروف بزرگ نشان‌دهنده اختلاف بین دماهای مختلف وحروف کوچک نشان دهنده اختلاف بین زمان‌های مختلف در سطح اطمینان ۵ درصد است).

	درصد باقی مانده جذب در۵۴۰ نانومتر			
	زمان (ساعت)			
دما (سانتی‌گراد)	صفر	۲	۴	۶
۴	۱۰۰^{Aa}	۹۹,۹۸±۰,۲۶^{Aa}	۹۹,۹۷±۰,۵^{Aa}	۹۹,۹۸±۰,۵^{Aa}
۲۰	۱۰۰^{Aa}	۹۶,۴۶±۰,۷^{Bb}	۹۳,۵۳±۰,۳۷^{Bc}	۹۱,۴۶±۰,۲۶^{Bd}
۲۵	۱۰۰^{Aa}	۹۳,۳۵±۰,۵^{Cb}	۸۹,۵۶±۰,۴۱^{Cc}	۸۷,۳۵±۰,۱۱^{Cd}
۳۰	۱۰۰^{Aa}	۹۱,۷۵±۰,۲۶^{Db}	۸۵,۴۹±۰,۵^{Dc}	۸۳,۳۲±۰,۲۵^{Dd}
۴۰	۱۰۰^{Aa}	۸۹,۳±۰,۳۷^{Eb}	۷۷,۸۱±۰,۷^{Ec}	۷۴,۴۶±۰,۱۷^{Ed}
۵۰	۱۰۰^{Aa}	۸۱,۹۶±۰,۲۶^{Fb}	۷۱,۸۶±۰,۱۱^{Fc}	۶۱,۱۸±۰,۴۱^{Fd}
۶۰	۱۰۰^{Aa}	۵۰,۷۶±۰,۳۷^{Gb}	۳۸,۰۰±۰,۲۶^{Gc}	۳۰,۵۶±۰,۵^{Gd}

- حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و حروف بزرگ متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌داردر هر ستون (در سطح ۵ درصد) می‌باشند.

جدول ۳: اثر شرایط نور و تاریکی بر میزان پایداری عصاره رنگی تاج خروس به مدت ۶ ساعت در pH =۵ (حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف بین دماهای مختلف و حروف کوچک نشان دهنده اختلاف بین زمان‌های مختلف در سطح اطمینان ۵ درصد است).

	درصد باقی مانده جذب در ۵۴۰ نانومتر		
زمان (ساعت)	تاریکی	نور مرئی	نور فرابنفش
صفر	۱۰۰^{Aa}	۱۰۰^{Aa}	۱۰۰^{Aa}
۲	۹۸,۷۴±۰,۱^{Ba}	۹۲,۳۱±۰,۷^{Bb}	۹۰,۶۱±۰,۳۷^{Bc}
۴	۹۸,۳۳±۰,۷^{Ba}	۸۸,۴۵±۰,۵^{Cb}	۸۵,۸۵±۰,۳۷^{Cc}
۶	۹۷,۹۰±۰,۲۶^{Ca}	۸۶,۲۴±۰,۲۶^{Db}	۸۳,۶۴±۰,۴۱^{Dc}
۱۲	۹۷,۵۲±۰,۵^{Ca}	۸۵,۸۰±۰,۹^{Eb}	۸۲,۸۲±۰,۵^{Ec}
۲۴	۹۶,۶۳±۰,۹^{Da}	۸۴,۵۳±۰,۲۶^{Fb}	۸۱,۹۳±۰,۷^{Fc}
۴۸	۹۵,۶۸±۰,۱^{Ea}	۸۳,۴۴±۰,۱^{Gb}	۸۱,۰۹±۰,۱۱^{Fc}
۷۲	۹۴,۶۴±۰,۳۷^{Fa}	۸۲,۶۱±۰,۳۷^{Hb}	۸۰,۵۳±۰,۲۶^{Gc}

- حروف کوچک متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و حروف بزرگ متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون (در سطح ۵ درصد) می‌باشند.

نور جذب شده احتمالا الکترون‌های کروموفور ماده رنگزا را به یک حالت تحریک شده با انرژی بیشتر انتقال می‌دهند که باعث کاهش انرژی فعال‌سازی مولکول و در نتیجه افزایش سرعت تجزیه می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده هنگامی که عصاره گیاه تاج خروس در معرض تاریکی، نور مرئی و فرابنفش قرار می‌گیرد به ترتیب بیش از ۵، ۱۷ و ۱۹ درصد تجزیه می‌گردد. در نتیجه عصاره استخراج شده در شرایط تاریکی از پایداری بیشتری برخوردار است. فخاری زواره و باقی پور با استخراج مواد رنگزای چغندر قرمز و بررسی پایداری آن به نتایج مشابهی دست یافتند و شرایط تاریکی را به‌عنوان شرایط پایدار بیان نمودند [۱۵]. باقی پور و همکارانش با بررسی استخراج بتالائین از چغندر قرمز و استفاده از آن در صنایع لبنی و علیزاده مطلق و همکارانش با بررسی استخراج ماده رنگزای غذایی بتاسیانین از گیاه آمارانتوس، به نتایج مشابه دست یافتند [۱۰، ۱۳].

۳ـ۷ـ اثر روش‌های مختلف خشک‌کردن بر عصاره تاج خروس

عصاره به دست آمده از گیاه تاج خروس را می‌توان به پودر تبدیل کرد تا نگهداری آن آسان‌تر و پایداری آن بیشتر شود. برای این منظور دو روش خشک‌کردن انجمادی و حلال پرانی مورد بررسی قرار گرفتند. جدول ۴ میزان جذب نمونه‌های خشک شده توسط روش حلال‌پرانی و خشک‌کردن انجمادی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل روش حلال پرانی به علت طولانی بودن زمان تبخیر حلال و همچنین اثر نور بر نمونه‌ها، کاهش شدید جذب را نشان می‌دهد. بتالایین‌ها در معرض دما، اکسیژن و نور پایداری بالایی ندارند به‌طوری که اکسایش بتالایین‌ها در حضور نور تسریع می‌شود [۲۱]. نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که روش خشک کردن انجمادی تاثیر مخربی بر میزان جذب نمونه‌ها نداشته و می‌تواند به عنوان روشی مناسب جهت خشک کردن عصاره گیاه تاج خروس در نظر گرفته شود.

جدول ۴: مقدار جذب عصاره خشک شده با روش حلال‌پرانی و خشک‌کردن انجمادی (حروف کوچک در هر گروه نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح اطمینان ۵ درصد است).

روش خشک‌کردن		میزان جذب (۵۴۰ نانومتر)
حلال‌پرانی		
	قبل از حلال‌پرانی	۰,۶۲۳^{a}
	بعد از حلال‌پرانی	۰,۰۷۶^{b}
خشک‌کن انجمادی		
	قبل از خشک‌کن انجمادی	۰,۶۰۳^{a}
	بعد از خشک‌کن انجمادی	۰,۵۹۳^{a}

۴ـ نتیجه‌گیری

در این تحقیق، استفاده از حلال متانل- آب غیر اسیدی و روش استخراج جامد- مایع بیشترین بازدهی استخراج ماده رنگزا از برگ گیاه تاج خروس را به دنبال داشت. نتایج اثر pH بر پایداری عصاره استخراج شده نشان داد که بیشترین جذب مربوط به pH=۵ و کمترین مربوط به pH=۸ است. با افزایش میزان pH از ۳ به ۵ میزان جذب به طور معناداری افزایش و بعد از pH=۵، میزان جذب کاهش پیدا کرد ($p<0,05$). با افزایش دما میزان پایداری عصاره به طور معناداری کاهش یافته و تنها در زمان صفر با افزایش دما اختلاف معناداری دیده نشد. همچنین تنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان میزان پایداری اختلاف معناداری را نشان نداد ولی در

سایر دماها با گذشت زمان میزان پایداری به‌طور معناداری کاهش یافت ($p<۰,۰۵$). نگهداری عصاره در شرایط نوری مختلف (تاریکی، نور مرئی و پرتو فرابنفش) برای مدت زمان‌های متفاوت نشان داد که بیشترین پایداری مربوط به شرایط تاریکی بود و افزایش زمان نگهداری سبب کاهش پایداری عصاره در هر حالت گردید. نتایج به دست آمده مشخص ساخت که عصاره استخراج شده در دماهای پایین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد در pH=۵ و در تاریکی، از پایداری بیشتری برخوردار می‌باشد. هم چنین جهت خشک کردن عصاره حاصل، استفاده از روش خشک‌کردن انجمادی نسبت به روش حلال‌پرانی، به علت عدم نیاز به دمای بالا و عدم تغییر فام نمونه توصیه می‌گردد. به نظر می‌رسد این ماده رنگزای طبیعی را می‌توان به صورت عصاره یا پودر خشک در فرآورده‌هایی مثل بستنی، شربت‌های یخ و ماست و در رنگ کردن راحت‌الحلقوم‌ها، پوشش شیرینی‌ها و کرم‌های وسط شیرینی به کار برد.

۵ـ مراجع

۱. م. زورمند، بررسی استخراج بتالائین‌ها از چغندرقرمز و جداسازی آن‌ها از آب چغندر قرمز توسط غشا اولترافیلتراسیون، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، رشته مهندسی شیمی، ایران، ۱۳۸۰.

۲. م.و. رمضانی پور، س. اقبالی اصل، افزودن رنگ‌های خوراکی طبیعی یا مصنوعی در صنایع غذایی. معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۱۳۹۰.

۳. س. ع. ر. حسینی‌نیا، رنگ‌های مجاز مصرفی در صنایع غذایی، *فصلنامه تازه‌های علمی دانشگاه پزشکی مشهد*، (۱۳۸۹)۱۰۰.

۴. ل. لطفی، م. حامدی، ا. کلباسی، استخراج آنتوسیانین ازگلبرگ زعفران و بررسی کمیت و کیفیت آنتوسیانین استخراجی: بررسی اثر آب سولفوره، هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۳۸۷.

۵. م. غفارزاده، م. ادریسی، مروری بر مواد رنگزای طبیعی و روش‌های استخراج آنها. *نشریه علمی مطالعات در دنیای رنگ*. (۱۳۹۵)۶، ۸۲-۶۳.

6. F. Salisbury, B. Cleon, W. Ross, Plant Physiology (4th ed.). Wadsworth publishing, Belmont, California, 1991, 325–326.

7. J. S. Yaacob, L. C. Hwei, R. M. Taha, Pigment analysis and tissue culture of Amaranthus cruentus L, Institute of Biological Sciences, University of Malaya, Department of Physics, 2012.

۸. ا. آینه بند، و. آقاسی زاده، م. مسکرباشی، بررسی اثر تاریخ‌های مختلف کاشت بر عملکرد کمی و کیفی ارقام گیاه زراعی جدید تاج خروس علوفه‌ای (Amaranthus spp.)، *مجله پژوهش‌های زراعی ایران*، (۱۳۸۶)۲، ۲۲۸-۲۲۱.

9. E. Vélez-Jiménez1, K. Tenbergen, P.D. Santiago, M.A. Cardador-Martínez1, Functional attributes of amaranth. austin *J. Food Sci. Nutr*. 2(2014), 1-6.

۱۰. س. باقی پور، س. فلاحی، ع. اسلامی میاندهی، ع، استخراج بتالائین از چغندر قرمز و استفاده آن در صنایع لبنی اولین همایش ملی میان وعده‌های غذایی، مشهد، ۱۳۹۳.

11. Z. Bahreini, V. Heydari, B. Vahid, M. Asadi, Extraction, Identification and thermal stability of anthocyanins from eggplant peel as a natural colorant. *Prog. Color Colorants Coat.* 8(2015), 59-67.

12. T. Vatai, M. skerget, Z. Knez, S. Kareth, Extraction and formulaion of anthocyanin–concentrates grape residues. *J. Supercrit. Fluid*. 45(2008), 32-36.

۱۳. ن. علیزاده مطلق، ش. روحانی، ه. زرآبادی، ه. حدادی، استخراج و خالص سازی ماده رنگزای غذایی بتاسیانین از گیاه آمارنتوس. *نشریه علمی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۹۰)۵، ۱۵۱-۱۴۵.

14. M. R. Castellar, J. M. Obon, M. Alacid, J. A. Fernandez-Lopez, Color properties and stabilityof betacyanins from Opuntia fruits. *J. Agric. Food Chem.* 51(2003), 2772-2776.

۱۵. ع. فخاری زواره، س. باقی‌پور، استخراج ماده رنگزای غذایی از چغندر قرمز و بررسی شرایط پایداری آن. *نشریه علمی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۸۸)۳، ۲۵۰-۲۴۳.

۱۶. ط. حدادی، م. ع. نجفی، تعیین راندمان استخراج و پایدار سازی رنگدانه بتالایین چغندرقرمز. *فناوری‌های نوین غذایی*. (۱۳۹۵)۳، ۶۳-۵۷.

17. A. F. Halwani, H. A. Sindi, H. A. Jambi, Characterization of physical properties of red beet pigments. *J Biochem. Tech*. 9(2018), 10-14.

18. S. Huang, J. H. Elbe, Effect of pH on the degradation andregeneration of betanine. *J. Food Sci*. 52(1987), 1689-1993.

19. J. Czapski, The effect of heating condition on losses and regeneration of betacyanin. Z. *Lebensm unters forsch*. 180(1985), 21-25.

20. J. Czapski, Heat stability of betacyanins red beet juice and in betanine solutions. Z. *Lebensm unters forsch*. 191(1990), 275-278.

21. A. S. Varner, Modeling and optimization of the dehydration of beets for use as a value-added food ingredient. Thesis, The University of Georgia. Athens, Georgia, 2014.