

بررسی کارایی روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی استخراج عصاره‌ی رنگی دانه آناتو

محمود یلمه^۱-محمدباقر حبیبی نجفی^{۲*}-رضا فرهوش^۳-فرشته حسینی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۹۱

چکیده

امروزه افزودنی‌های رنگی در طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی به منظور ایجاد ظاهر مطلوب و مورد پسند مصرف‌کننده مورد استفاده قرار می‌گیرند. عصاره آناتو یک رنگ طبیعی ایمن برای کاربردهای خوراکی است که می‌تواند به‌عنوان جایگزین رنگ‌های سنتزی بکار رود. همچنین عصاره آناتو دارای ویژگی‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی است و کاربرد آن در محصولات غذایی، لزوم استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی را کاهش می‌دهد. در این پژوهش از طرح مرکب مرکزی بمنظور بررسی تأثیر دما (۶۰-۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۱۰-۲ ساعت)، نسبت دانه به حلال (۲۰-۴ درصد) و مخلوط حلال‌های کلروفرم و استون (۱۰۰-۰ درصد) بر میزان استخراج رنگ از دانه آناتو و بهینه‌سازی فرایند استخراج رنگ، استفاده شد. از رویه سطح پاسخ نیز جهت یافتن برآورد بهترین شرایط فرایند با کمترین میزان آزمون استفاده گردید. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، فاکتورهای دما و نسبت دانه به حلال بر استخراج رنگ بیشترین اثر را دارند. شرایط عملیاتی بهینه جهت حصول بیشینه‌ی مقدار رنگ آناتو در فرآیند استخراج شامل دمای ۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۲ ساعت، نسبت دانه به حلال ۱۲/۹ و ۱۰۰ درصد کلروفرم تعیین گردید که در این شرایط راندمان استخراج رنگ آناتو ۳/۹۵ درصد و میزان جذب نوری ۰/۵۹۷ یافت شد که میزان مطلوبیت برای هر دو پاسخ ۱۰۰ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: استخراج، آناتو، بهینه‌سازی، رنگ، روش سطح پاسخ

مقدمه

افزودنی‌های طبیعی و سنتزی غذایی به‌منظور ایمنی، ایجاد ظاهری مطلوب و بهبود عطر و طعم مواد خوراکی استفاده می‌شوند مصرف‌کنندگان مواد غذایی نسبت به غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی بوده و در آن‌ها مواد طبیعی به کار رفته است تمایل بیشتری از خود نشان می‌دهند و به همین دلیل مطالعات زیادی روی امکان جایگزین کردن افزودنی‌های شیمیایی با ترکیبات طبیعی در غذاهای مختلف صورت گرفته است (برزگر و همکاران، ۱۳۸۷؛ Nakamura *et al.*, 1991). تاریخ‌شناخت استخراج رنگ آناتو به چند قرن پیش که سرخ‌پوستان آمریکای جنوبی و مردمان مکزیکی از آن به عنوان ادویه و رنگ در مواد غذایی استفاده می‌کردند، برمی‌گردد (Galindo-

Cuspinera, 2003). رنگ دانه آناتو یک رنگدانه طبیعی کاروتنوئیدی استخراج شده از پری کارپ دانه‌های درخت بیکسالورلانا (*Bixaorellana*L.) است. جزء رنگی مهم در عصاره استخراج شده که محلول در روغن است، ۹-سیس-بیکسین و جزء رنگی اصلی در عصاره استخراج شده با محلول قلیایی ۹-سیس-نوربیکسین، محلول در آب است. بخش عمده کاروتنوئیدهای پریکارپ دانه آناتو را بیکسین تشکیل می‌دهد که حدود ۸۰٪ کل کاروتنوئیدهای موجود در آناتو می‌باشد (Preston & Rickard, 1980). عصاره‌ی آناتو علاوه بر داشتن رنگ، دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است که به وجود باندهای دوگانه کوئژوگه در ساختار این کاروتنوئید مربوط است (Ramamoorthy *et al.*, 2011). اخیراً مشخص شده است که رنگ آناتو (سیس بیکسین) دارای ویژگی ضدسرطانی نیز می‌باشد و توانایی از بین بردن سلول‌های سرطانی را دارد (Tibodeau *et al.*, 2010). عصاره آناتو رنگ نارنجی تا قرمز در مواد غذایی ایجاد می‌کند و به‌عنوان یک رنگدانه طبیعی و سالم، در فرآورده‌های غذایی مختلف مانند پنیر، کره، مارگارین، فرآورده‌های قنادی، نانوائی، نوشیدنی‌های مختلف، اسنک‌ها و انواع مرباها کاربرد دارد (Henry, 1996). رنگ سیس-بیکسین حساس به نور و حرارت است و در pH

۱، ۲ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادان گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- مربی پژوهشی، گروه افزودنی‌های غذایی پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد.

* - نویسنده مسئول: (Email: habibi@um.ac.ir)

اندازه‌گیری مقدار رنگ

۲۰ میلی‌گرم از پودر رنگ آناتو بدست آمده را در ۱۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم حل نموده و پس از رقیق‌سازی تا ۱۰۰ مرتبه شدت رنگ را بوسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۰۲ نانومتر (λ_{max}) که بیکسین بیشترین جذب را در کلروفرم دارد، انجام شد (Vasuet *al.*, 2004; Yolmehet *al.*, 2014).

راندمان استحصال رنگ

به منظور تعیین راندمان استحصال رنگ مقدار نهایی پودر رنگی بدست آمده با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ توزین شده و نسبت وزنی رنگ بدست آمده در برابر مقدار دانه اولیه به عنوان راندمان استحصال رنگ محاسبه گردید.

طرح آزمایش و تجزی ه و تحلیل آماری داده‌ها

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرایندهایی بکار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه‌ی روش سطح پاسخ شده‌است. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند. مهم‌ترین مسئله این تحقیق بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها بود، از این‌رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد (Zhang *et al.*, 2010). در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل شامل X_1 دما، X_2 زمان، X_3 نسبت دانه به حلال و X_4 نسبت حلال کلروفرم به استون، هر کدام در پنج سطح مورد ارزیابی قرار گرفت.

در جدول ۱ متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر سطوح آنها نشان داده شده‌است. آزمایش در دو تکرار انجام شد.

مدل مورد استفاده در RSM عموماً رابطه‌ی درجه دوم می‌باشد. در روش RSM برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف شده که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را ابرروی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد. در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت و $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ اثرات خطی و $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$ اثرات متقابل می‌باشند. از نرم افزار Minitab16 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ صورت گرفت.

پائین از رنگ زرد- نارنجی به صورتی تبدیل می‌شود. pH حداقل اثر را روی حلالیت و پایداری بیکسین دارد. نوربیکسین پایداری کمتری داشته و با کاهش pH رسوب می‌کند در حرارت‌های بالا فرم ایزومری سیس که فرم غالب و حساس به حرارت است، به شکل ترانس در می‌آید (Lauro, 1991). اگر چه کل رنگدانه‌ی موجود در دانه‌ها به طور گسترده از درختی به درخت دیگر فرق می‌کند اما دانه‌های با کیفیت عالی حاوی بیش از ۳ درصد بیکسین می‌باشند (FAO, 1995). درحال حاضر در دنیا استحصال رنگ از منابع طبیعی گیاهی به‌عنوان یک فناوری رایج وجود دارد اما اطلاعات تکمیلی پیرامون دانش فنی و بهینه‌سازی شرایط استخراج این رنگدانه‌ها با روش‌های نوین جهت حصول بیشترین راندمان ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام این پژوهش، دستیابی به شرایط بهینه استخراج رنگ از دانه آناتو با استفاده از روش سطح پاسخ برای تعیین مقادیر بهینه‌ی فاکتورهای مورد بررسی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، دانه‌ی آناتو تهیه شده از کشور هند، حلال‌های هگزان، استون، کلروفرم و اتیل استات از شرکت مرک آلمان و کاغذ صافی واتمن ۱ بوده است. تجهیزات مورد استفاده شامل دستگاه اسپکتروفوتومتر شیمادزو مدل UV-160A ساخت ژاپن، آون تحت خلا شل لب مدل 1410D-2E ساخت آمریکا بود.

روش‌ها

به منظور استخراج رنگ آناتو از روش کاستلو (Castello *et al.*, 2004) استفاده شد. مطابق این روش ابتدا ۲۰ گرم دانه آناتو را در ۵۰ میلی‌لیتر حلال هگزان به مدت ۶ ساعت، به‌منظور روغن‌زدایی^۴ خیسانده شد. پس از انجام فیلتراسیون و جدا نمودن هگزان، دانه‌های روغن‌زدایی شده برای استخراج رنگ مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج عصاره‌ی رنگی آناتو

حلال‌های آلی مورد آزمون شامل کلروفرم، اتانول، اتیل استات و استون بودند. از آنجا که در پیش‌تیمارهای انجام شده کلروفرم و استون نسبت به سایر حلال‌ها رنگ بیشتری جذب کردند، در فرایند استخراج نهایی از این دو حلال و مخلوط آنها با نسبت‌های مشخص استفاده شد. عصاره‌های رنگی استحصال شده پس از فرایند فیلتراسیون، بوسیله آون تحت خلا خشک شده و به صورت پودر در آمدند. جهت جلوگیری از آسیب حرارتی باندهای دوگانه کنژوگه، طی خشک کردن از دمای پائین (۴۰ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد.

جدول ۱- نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آنها.

سطوح متغیر				نماد ریاضی		متغیر مستقل
۶۰	۴۶/۲۵	۳۲/۵	۱۸/۷۵	۵	X_1	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱۰	۸	۶	۴	۲	X_2	زمان (ساعت)
۲۰	۱۶	۱۲	۸	۴	X_3	نسبت دانه به جلال (%)
۱۰۰	۷۵	۵۰	۲۵	۰	X_4	نسبت کلروفورم به استون (%)

$$Y_1 = 0.4826 + 0.291 X_1 + 0.155 X_2 + 0.3605 X_3 + 0.009 X_4 - 0.001 X_1^2 - 0.009 X_2^2 - 0.116 X_3^2 + 0.000 X_4^2 + 0.0002 X_1 X_2 - 0.001 X_1 X_3 - 0.000 X_1 X_4 - 0.0011 X_2 X_3 - 0.0001 X_2 X_4 - 0.0002 X_3 X_4.$$

ضریب تعیین مدل، R^2 پیش‌بینی شده، R^2 تعدیل شده بدست آمده برای Y_2 (مقدار جذب نوری در λ_{max}) به ترتیب ۸۹/۹۵، ۸۶/۹۶ و ۷۹/۹۷ بود. و پاسخ‌ها با ضرایب اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار بود.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4.$$

با توجه به اهمیت کیفیت رنگ، در روش آماری علاوه بر راندن Y_1 که به کمیت رنگ توجه دارد، میزان مقدار جذب نوری (Y_2) در طول موج ماکزیمم (λ_{max}) در نظر گرفته شد (جدول ۲) و برای هر یک مدل مناسب انتخاب شد.

نتایج و بحث

گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش یافته

با توجه به شرایط تعیین شده در مدل، ۲۵ استخراج نهایی انجام گرفت. جدول ۲ نتایج بدست آمده از آزمایش‌ها را نشان می‌دهد.

به کمک ضرایب رگرسیون اثر شرایط استخراج بر روی متغیرهای وابسته محاسبه شد. جداول ۳ و ۴ نتایج حاصل از تجزیه آماری را نشان می‌دهند. برای اینکه مدل توانایی خوبی برای برازش اطلاعات داشته باشد لازم است که R^2 تصحیح شده، (به منظور اطمینان از این مسئله که مدل می‌تواند بخوبی اعداد را تخمین بزند) و R^2 پیش‌بینی شده، دارای بالاترین مقدار باشد (Badwaik, 2012)؛ ضریب تعیین (R^2) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه‌ی تناسب برازش می‌باشد، بنابراین هرچه مقدار R^2 به یک نزدیک‌تر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد. لازم به ذکر است ضریب تعیین مدل، R^2 پیش‌بینی شده، R^2 تصحیح شده بدست آمده برای Y_1 در این تحقیق به ترتیب ۹۷/۷۸، ۹۵/۶۸ و ۹۷/۱۲ بود که از اعتبار بالایی برخوردار می‌باشد. علاوه بر این با توجه به نتایج آنالیز واریانس اندیس عدم برازش برای هر دو پاسخ در سطح ۹۵ درصد پاسخ‌ها معنی‌دار نبودند که این امر نشان‌دهنده این است که مدل بخوبی روند تغییر داده‌ها را نشان می‌دهند.

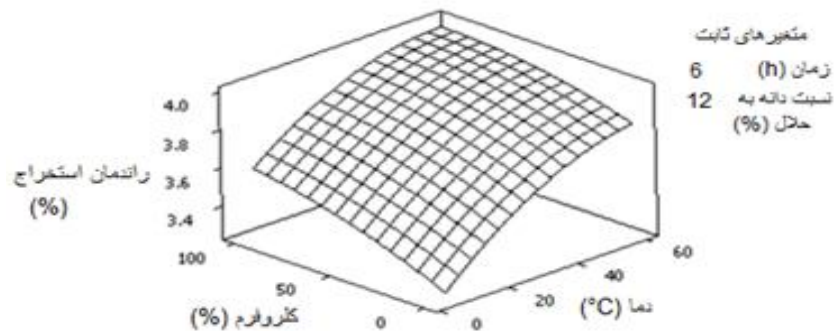
مدل مناسب برای پاسخ Y_1 (میلی‌گرم پودر رنگی بدست آمده) که به شکل درجه دوم کامل بود به صورت زیر است:

جدول ۲- تیمارهای مربوط به استخراج رنگ آناتو

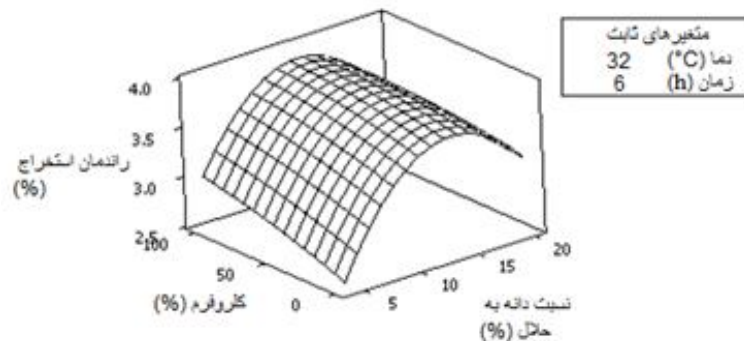
تیمار	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1	Y_2
۱	۳۲/۵	۶	۱۲	۵۰	۳/۸۰	۰/۵۶۸
۲	۱۸/۷۵	۸	۸	۲۵	۳/۲۶	۰/۵۱۴
۳	۱۸/۷۵	۴	۱۶	۲۵	۳/۵۹	۰/۵۳۶
۴	۳۲/۵	۶	۱۲	۰	۳/۶۳	۰/۵۵۷
۵	۱۸/۷۵	۴	۸	۷۵	۳/۴۳	۰/۵۲۸
۶	۱۸/۷۵	۸	۱۶	۷۵	۳/۶۳	۰/۵۴۲
۷	۳۲/۵	۶	۲۰	۵۰	۳/۳۴	۰/۵۳۰
۸	۶۰	۶	۱۲	۵۰	۳/۹۶	۰/۵۳۱
۹	۳۲/۵	۲	۱۲	۵۰	۳/۷۳	۰/۵۶۹
۱۰	۱۸/۷۵	۸	۱۶	۲۵	۳/۶۲	۰/۵۲۶
۱۱	۴۶/۲۵	۸	۱۶	۲۵	۳/۷۰	۰/۵۴۹
۱۲	۳۲/۵	۶	۱۲	۱۰۰	۳/۸۶	۰/۵۷۹
۱۳	۴۶/۲۵	۴	۸	۷۵	۳/۶۹	۰/۵۵۹
۱۴	۴۶/۲۵	۴	۱۶	۲۵	۳/۶۹	۰/۵۵۸
۱۵	۱۸/۷۵	۸	۸	۷۵	۳/۴۵	۰/۵۲۱
۱۶	۳۲/۵	۶	۴	۵۰	۲/۷۳	۰/۴۴۲
۱۷	۴۶/۲۵	۸	۱۶	۷۵	۳/۸۲	۰/۵۶۶
۱۸	۴۶/۲۵	۴	۸	۲۵	۳/۵۹	۰/۵۳۷
۱۹	۴۶/۲۵	۴	۱۶	۷۵	۳/۷۵	۰/۵۶۹
۲۰	۳۲/۵	۱۰	۱۲	۵۰	۳/۸۷	۰/۵۵۴
۲۱	۵	۶	۱۲	۵۰	۳/۴۷	۰/۵۴۵
۲۲	۱۸/۷۵	۴	۸	۲۵	۳/۱۶	۰/۴۸۵
۲۳	۱۸/۷۵	۴	۱۶	۷۵	۳/۶۹	۰/۵۵۵
۲۴	۴۶/۲۵	۸	۸	۲۵	۳/۶۱	۰/۵۲۵
۲۵	۴۶/۲۵	۸	۸	۷۵	۰/۵۳۴	۳/۷۳

جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس مدل Y_1

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F مقدار	P مقدار
رگرسیون	۱۴	۳/۶۷۶۰	۰/۲۶۲۵	۱۴۷/۷۱	۰
خطی	۴	۱/۸۳۵۴	۰/۴۵۸۸	۲۵۸/۱۴	۰
X_1 (دما)	۱	۰/۱۴۵۸	۰/۱۴۵۸	۸۲/۰۳	۰
X_2 (زمان)	۱	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۸	۰/۴۴	۰/۵۰۹
X_3 (نسبت دانه به حلال)	۱	۱/۶۸۹۳	۱/۶۸۹۳	۹۵۰/۳۴	۰
نسبت حلال کلروفورم به استون (X_4)	۱	۰/۰۴۸۶	۰/۰۴۸۶	۲۷/۳۶	۰
نمای دوم	۴	۲/۰۲۲۲	۰/۵۰۵۵	۲۸۴/۴۱	۰
X_1^2	۱	۰/۰۳۳۹	۰/۰۳۳۹	۱۹/۰۸	۰
X_2^2	۱	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۸	۰/۴۶	۰/۵۰۲
X_3^2	۱	۱/۹۸۳۴	۱/۹۸۳۴	۱۱۱۵/۸۰	۰
X_4^2	۱	۰/۰۰۵۷	۰/۰۰۵۷	۳/۲۰	۰/۰۸۰
برهمکنش	۶	۰/۱۲۵۶	۰/۰۲۰۹	۱۱/۷۸	۰
$X_1 X_2$	۱	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۹	۰/۵۱	۰/۴۸
$X_1 X_3$	۱	۰/۰۹۵۷	۰/۰۹۵۷	۵۳/۸۴	۰
$X_1 X_4$	۱	۰/۰۰۲۶	۰/۰۰۲۶	۱/۴۸	۰/۲۳
$X_2 X_3$	۱	۰/۰۰۲۶	۰/۰۰۲۶	۱/۴۸	۰/۲۳
$X_2 X_4$	۱	۰/۰۰۲۲	۰/۰۰۲۲	۱/۲۸	۰/۲۶
$X_3 X_4$	۱	۰/۰۲۱۵	۰/۰۲۱۵	۱۲/۱۱	۰/۰۰۱
خطای باقیمانده	۴۷	۰/۰۸۳۵	۰/۰۰۱۷		
عدم برازش	۱۰	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۱	۰/۴۳	۰/۷۱۰
خطای خالص	۳۷	۰/۰۱۴۳	۰/۰۰۰۴		



شکل ۱- اثر متقابل درصد کلروفورم و دمای استخراج بر راندمان استخراج رنگ آناتو



شکل ۲- اثر متقابل نسبت دانه به حلال و درصد کلروفورم بر راندمان استخراج رنگ آناتو

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس مدل Y_2

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F احتمال	P احتمال
رگرسیون	۱۴	۰/۰۴۴۲	۰/۰۰۳۱	۳۰/۰۵	۰
خطی	۴	۰/۰۰۴۷	۰/۰۰۴۷	۴۵/۱۷	۰
(X_1) دما	۱	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۳۲	۳۰/۳۸	۰
(X_2) زمان	۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۴	۴/۲۳	۰/۰۴۵
(X_3) نسبت دانه به حلال	۱	۰/۰۱۷۸	۰/۰۱۷۸	۱۶۹/۳۷	۰
نسبت حلال کلروفورم به استون (X_4)	۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۵	۵/۰۹	۰/۰۲۹
نمای دوم	۴	۰/۰۲۶۵	۰/۰۰۶۶	۶۲/۹۵	۰
X_1^2	۱	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۳	۳۱/۷۲	۰
X_2^2	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۱/۵۸	۰/۲۱۶
X_3^2	۱	۰/۰۲۴۳	۰/۰۲۴۳	۲۳۱/۴۷	۰
X_4^2	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۱	۰/۹۱۸
برهمکنش	۶	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۷	۱/۲۳	۰/۳۱
$X_1 X_2$	۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۳	۳/۱۵	۰/۰۸۲
$X_1 X_3$	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۵۰	۰/۴۸۳
$X_1 X_4$	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۶۰	۰/۴۴۲
$X_2 X_3$	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۳۶	۰/۵۴۹
$X_2 X_4$	۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲	۲/۲۵	۰/۱۴۱
$X_3 X_4$	۱	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۵۰	۰/۴۸۳
خطای باقیمانده	۴۷	۰/۰۰۵۰	۰/۰۰۰۱		
عدم برازش	۱۰	۰/۰۱۲۵	۰/۰۰۱۸	۰/۲۴	۰/۳۶۰
خطای خالص	۳۷	۰/۰۰۴۸	۰/۰۰۰۴		

زمان، در عبارتهای درجه‌ی دوم X_1^2 و X_3^2 و در بین اثرات متقابل X_1X_3 و X_3X_4 است.

در شکل ۱ اثر متغیرهای درصد کلروفورم و دما، در مقادیر ثابت نسبت دانه به حلال و زمان، بر روی Y_1 مشخص شده است. دلیل افزایش شدت رنگ متناسب با افزایش دما را می‌توان ناشی از بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت رنگدانه و کاهش ویسکوزیته حلال دانست (میلائی و همکاران، ۱۳۸۹). البته در دماهای حدود ۷۰ درجه سانتی‌گراد و بالاتر از آن رنگدانه‌های آناتو تخریب شده و از شدت رنگ کاسته می‌شود (Smith, 2006). افزایش رنگ با افزایش میزان کلروفورم، به دلیل کاهش قطبیت حلال است. قطبیت کلروفورم نسبت به استون کمتر است و از آنجا که رنگدانه بی‌کسین غیرقطبی می‌باشد، با کاهش قطبیت حلال میزان استحصال رنگ افزایش می‌یابد.

در شکل ۲ اثر متقابل درصد کلروفورم و نسبت دانه به حلال، در مقادیر ثابت دما و زمان، بر روی Y_1 مشخص شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود در ابتدا با افزایش نسبت دانه به حلال تا حدود ۱۵ درصد، میزان استحصال رنگ افزایش می‌یابد ولی پس از آن به علت اشباع شدن حلال، رنگ بیشتری جذب حلال نمی‌شود.

مدل مناسب برای پاسخ Y_2 (مقدار جذب بی‌کسین در λ_{max}) که به شکل خطی-مربعی بود و ضریب تعیین مدل و R^2 پیش‌بینی شده بیشتری نسبت به مدل درجه دوم کامل داشت، به صورت زیر است:

$$Y_2 = 0.11828 + 0.0043 X_1 + 0.1117 X_2 + 0.370 X_3 + 0.0009 X_4 - 0.0004 X_1^2 - 0.0004 X_2^2 - 0.0013 X_3^2 + 0.0000 X_4^2 + 0.0001 X_1 X_2 - 0.0000 X_1 X_3 - 0.0000 X_1 X_4 - 0.0001 X_2 X_3 - 0.0005 X_2 X_4 - 0.0000 X_3 X_4.$$

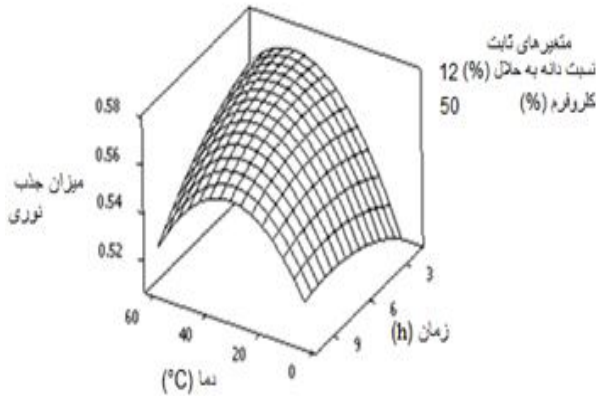
آخرین مرحله این مدل آماری، شامل ارائه گرافیکی رابطه‌ی مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه بود که به وسیله‌ی نمودار رویه پاسخ و کنتور^۱ انجام پذیرفت. شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج رنگ از دانه آناتو، با استفاده از روش بهینه‌سازی عددی جستجو شد (Myers, Montgomery & 2002). هدف از بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ آناتو، بیشینه کردن مقدار هر دو پاسخ با بالاترین میزان مطلوبیت بود.

تأثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ Y_1

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، عبارتهای مدل که در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده‌اند شامل تمام عبارتهای خطی بجز

- 1 Contour
- 2 Numerical optimization

۴۸ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان استخراج ۲ ساعت، نسبت دانه به حلال ۱۲/۹ درصد و ۱۰۰ درصد کلروفورم به‌عنوان شرایط بهینه استخراج رنگ آناتو یافت شد. در این شرایط راندمان استخراج رنگ آناتو ۳/۹۵ درصد دانه آناتو و میزان جذب نوری ۰/۵۹۷ پیش‌بینی شد و مطلوبیت هر دو پاسخ ۱۰۰ درصد بود. جهت تأیید پیش‌بینی مدل، استخراج رنگ آناتو در شرایط بهینه نیز انجام شد و نتایج تجربی (راندمان استخراج ۳/۸۷ و جذب نوری ۰/۵۸۰) دقت مدل را تأیید نمودند.



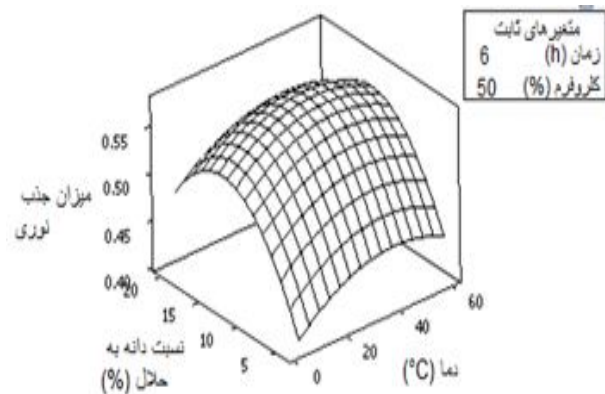
شکل ۴- اثر متقابل دما و زمان استخراج بر میزان جذب نوری

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق بیان‌گر کارایی مفید متدولوژی رویه پاسخ در بهینه‌سازی شرایط فرایند استخراج رنگ از دانه‌ی آناتو بود. متغیرهای دمای استخراج و نسبت دانه به حلال نسبت به دو متغیر درصد کلروفورم و مدت زمان استخراج اثر بیشتری را بر استخراج رنگ آناتو داشتند. در شرایط دمایی ۴۸ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان ۲ ساعت، ۱۰۰ درصد کلروفورم و نسبت دانه به حلال ۱۲/۹ درصد، بیشترین میزان رنگ آناتو استخراج شد.

تأثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ Y_2

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، همه‌ی عبارت‌های خطی و در بین عبارت‌های درجه‌ی دوم X_1^2 و X_3^2 در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشند اما همه‌ی اثرات برهمکنش‌ها بی‌معنی بودند. مطابق شکل ۳، با افزایش دما در ابتدا میزان جذب نوری افزایش، اما با افزایش بیشتر دما به‌علت تخریب حرارتی باندهای دوگانه کنژوگه، میزان جذب نوری کاهش می‌یابد (Smith, 2006). میزان جذب نوری با بالا بردن میزان نسبت دانه به حلال ابتدا افزایش و سپس به‌علت اشباع شدن حلال کاهش می‌یابد.



شکل ۳- اثر متقابل نسبت دانه به حلال و دمای استخراج بر میزان جذب نوری

در شکل ۴ اثرات متقابل دما و زمان استخراج بر میزان جذب نوری نشان داده شده است. اثر تخریبی دمای بالای استخراج بر رنگ آناتو، طی مدت زمان استخراج طولانی نسبت به زمان‌های کوتاه استخراج بیشتر می‌باشد. مطابق شکل بیشترین میزان جذب نوری در مدت زمان استخراج ۲ ساعت و دمای استخراج حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد حاصل می‌شود.

بهینه‌سازی

طی بهینه‌سازی اهمیت دو پاسخ با یکدیگر برابر در نظر گرفته شد و بهینه‌سازی به روش بهینه‌سازی عددی انجام شد. شرایط دمایی

منابع

- Badwaik, L. S., Prasad, K. & Deka, S. C., 2012, Optimization of extraction conditions by response surface methodology for preparing partially defatted peanut, *International Food Research Journal*, 19 (1), 341-346.
- Barzegar H, Karbassi A, Jamalian J, Aminlari M. 2008. Investigation of the Possible Use of Chitosan as a Natural Preservative in Mayonnaise Sauce. *JWSS - Isfahan University of Technology*. 12 (43): 361-370
- Castello, M., Chandra, N., PHatak, A. & Madhuri, S., 2004, Estimation of bixin in seeds of *Bixa orellana* L. from different locations in Western Maharashtra. *Indian Journal of Plant Physiology*, 9 (2), 185-188.
- FAO. 1995. Annatto seed and its extracts. In *Natural Colorants and Dyestuffs. Nonwood forest products* 4. Food and Agriculture Organization of the United Nations,

- 37p.<http://www.fao.org/docrep/V8879F/v8879e04.html>
- Henry, B. S., 1996, Natural food colours, Blackie Academic and Professional, Glasgow U.K., 2nded, P. 40-79.
- Lauro, G. J., 1991, A primer on natural Colors. *Cereal Foods World*, 36, 949-953.
- McKeown, G. G. 1965, Composition of oil-soluble annatto food colors. Structure of the yellow pigment formed by thermal degradation of bixin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 48, 835-837.
- Milani, E., Poorazarang, H., Vatan khah, S., & Vakilian, H. 2011. Optimization of Inulin Extraction from *Helianthus tuberosus* Using Response Surface Methodology (RSM). *Iranian Food Science And Technology Research Journal*, 6(3):176-183
- Nakamura, S., Kato, A. & Kobayashi, N., 1991, New antimicrobial characteristics of lysozyme – dextran conjugate. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 39 (2), 647-650.
- Preston, H. D., Rickard, M.D., 1980, Extraction and chemistry of Annatto, *Applied Science Publishers*, 5, 47-56.
- Ramamoorthy, S., Meera, G. P., Lubaina, M., Dipita, B., Geetha, T., Balamurugan, P. & Rajanarayanan, S., 2011, Evaluation of Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Properties of Some Food Dyes, *Food Science Biotechnology*, 20 (1), 7-13.
- Smith, J., 2006, Annatto extracts, *Chemical and Technical Assessment*: 1-26.
- 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.
- Galindo-Cuspinera, V., 2003, Volatile composition and antimicrobial properties of commercial annatto (*Bixa orellana* L.) extracts, a natural food colorant (UMI number: 3112464). University of Maryland.
- Vasu, S., Palaniyappan, V., Kothandam, H. P. & Badami, S., 2010, Microwave facilitated extraction of Bixin from *Bixa orellana* and its in-vitro antioxidant activity, *Der Pharmacia Letter*, 2 (2), 479-485.
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B. & Farhoosh, R., 2014, Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of natural pigment from annatto seeds by Response Surface Methodology (RSM), *Food chemistry*, 155, 319-324.
- Zhang, L.L., Xu, M., Wang, Y. M., Wu, D. M. & Chen, J. H. 2010, Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from Infructescence of *Platycaryastrobilacea* using response surface methodology, *Molecules*, 15, 7923-7932.

Efficacy of response surface methodology in optimization the extraction of annatto seed's colorants

Mahmoud Yolmeh¹, Mohammad B. Habibi-Najafi^{2*}, Reza Farhoosh³, Fereshteh Hosseini⁴

Received: 2013.07.05

Accepted: 2015.05.14

Introduction

Food consumers tend to use natural products without any synthetic additives. Therefore, many studies have been conducted to investigate the possibility of replacing synthetic additives with natural substances in various food products.

Annatto dye is a natural carotenoid pigment extracted from the pericarp of *Bixaorellana*L. seeds. The major fraction of the annatto extract is 9'-cis-bixin that is soluble in oil and 9'-cis-norbixin is the major dye fraction of the alkaline extract that is soluble in water. Annatto dye creates orange to red color in food and to be used as a natural pigment in a variety of food materials including cheese, butter, margarine, confectionary and bakery products, different kinds of drinks, snacks and jams. In addition, annatto dye has antioxidant and antimicrobial activity.

Nowadays, the extraction of natural dye from plant resources has become a common technology. However, complementary information using new methods and optimization of the extraction conditions seems to be necessary in order to accomplish the highest yield of extraction. Response surface method (RSM) is effective and efficient in optimizing color extraction conditions.

In this study, the different conditions of extraction process were optimized through RSM in order to obtain maximum yield and best quality of annatto dye.

Materials and methods

Materials

Annatto seeds were purchased from Hyderabad, India. All solvents were analytical grade, Merck, Germany.

Extraction of annatto dye

A certain amount of annatto seeds was soaked in n-hexane for 6 hours in order to remove oils. After filtration, the defatted seeds were used for dye extraction. Since chloroform and acetone showed the highest yields of extraction during preliminary experiments, these two solvents and their mixtures were exploited for the final experiments assigning 0 for pure acetone and 100 for pure chloroform. The extracts were filtered through Whatman filter paper NO.1 and then vacuum-dried in the 1410D-2E vacuum oven (Shel Lab, USA) to produce dye powder. Low temperatures (40°C) were applied to prevent thermal dissociation of conjugated double bonds during drying.

Dye measurement

The coloring strength was measured according to Vasu et al. method; model UV-160A spectrophotometer Shimadzu, Japan, at 502 nm in which bixin has the maximum absorbance value when it is dissolved in chloroform.

Determination of extraction efficiency

The obtained powder was weighed and the mass ratio of the powder to the weight of the seeds was taken into account as the extraction yield.

Experimental design

1, 2 and 3. Former MSc student and Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4. Assistant Professor, Researcher of Iranian Academic Center for Education Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran

(* - Corresponding Author Email: habibi@um.ac.ir)

In this study, Minitab® software version 16.1.1 (Minitab Inc. USA. 2010), was used and a five level four factor central composition design was created to investigate the effect of the independent variables such as temperature, extraction time, seed to solvent ratio and chloroform concentration on the dependent variables namely the extraction efficiency and absorbance values.

Results and Discussion

The values of R^2 , R^2 -adj and R^2 -pred revealed that the full quadratic models were the most adequate for the extraction efficiency and absorbance values.

The all of the linear terms show a significant effect except the extraction time ($P < 0.05$). The quadric term of extraction time and the seed to solvent ratio also had a significant effect ($P < 0.05$) on the extraction efficiency, however, the effect of other two quadric terms was insignificant ($P > 0.05$). The interactive terms of extraction temperature* seed to solvent ratio (X_1X_3) and the seed to solvent ratio*Chloroform concentration (X_3X_4) had a significant effect on the extraction efficiency ($P < 0.05$); however, the other two interactive terms was insignificant ($P > 0.05$). For the absorbance values, the all of the linear terms show a significant effect ($P < 0.05$); the quadric term of extraction temperature (X_1^2) and the seed to solvent ratio (X_3^2) also had a significant effect ($P < 0.05$) on absorbance values, but, the effect of other two quadric terms (X_2^2 and X_4^2) did not show a significant effect ($P > 0.05$). The all of interactive terms was insignificant ($P > 0.05$).

An increase in the extraction efficiency was observed with the increasing temperature. Banik and Pandey while extracting oleanolic acid from *Lantana camara* roots demonstrated that as temperature increases extraction efficiency improves too. However, at temperatures higher than 70 °C, the annatto seed pigments were degraded and the response was reduced so the quadratic effect of temperature was negative.

The absorbance value was increased by increasing the temperature; however, the absorbance value decreased at higher temperature by thermal decomposition and damage of the conjugate double bond. The absorbance value increased by increasing the chloroform concentration and seed to solvent ratio initially, however, subsequently decreased due to the damage of the conjugate double bond in higher chloroform concentration and saturation of solvent in higher seed to solvent ratio.

Temperature of 48.33 °C, extraction time of 2 hr, the ratio of seed to the solvent of 12.88 and chloroform concentration of 100% were found to be as the optimum conditions of the process. The extraction efficiency of 3.95 percent of annatto seed and absorbance value of 0.597 were acquired as the predicted results.

Keywords: Extraction, Annatto seed, Optimization, Colorant, Response surface methodology