

## کاربرد روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ از دانه آناتو به کمک امواج فراصوت

محمود یلمه<sup>۱</sup>، محمداقبر حبیبی نجفی<sup>۲</sup>، رضا فرهوش<sup>۲</sup>، فرشته حسینی<sup>۳\*</sup>

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

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۸)

### چکیده

رنگ آناتو از جمله قدیمی‌ترین کاروتنوئیدهای طبیعی می‌باشد که کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی دارد. از نقطه نظر اقتصادی، رنگ آناتو دومین افزودنی رنگی طبیعی مورد استفاده در صنعت در دنیا است که پیش‌بینی می‌شود روند تقاضا برای آن روز به روز افزایش یابد. استخراج رنگ از دانه آناتو عمدتاً به روش‌های متداول صورت گرفته و اطلاعات اندکی پیرامون استفاده از تکنیک‌های نوین نظیر تکنولوژی فراصوت و متدولوژی سطح پاسخ در استحصال رنگ از دانه آناتو موجود است. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی فرایند استخراج رنگ آناتو با کمک امواج فراصوت و تعیین بهترین شرایط فرایند با کمک طرح مربع مرکزی و متدولوژی رویه‌ی سطح پاسخ بود. به منظور بررسی تأثیر دمای استخراج (۸۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان استخراج (۱۰-۲ دقیقه)، نسبت دانه به حلال (۲۰-۵ درصد) و نسبت چرخه کاری (۰/۲-۰/۸ ثانیه)، بر راندمان استخراج رنگ از دانه آناتو و بهینه‌سازی فرایند استخراج رنگ از طرح مرکب مرکزی استفاده شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد، فاکتور نسبت دانه به حلال ( $X_4$ ) و اثر مربعی آن ( $X_4^2$ ) دارای بیشترین تأثیر بر استخراج رنگ از دانه آناتو می‌باشد. شرایط بهینه به منظور حصول بیشینه مقدار رنگ از دانه آناتو در فرایند استخراج به کمک امواج فراصوت، شامل دمای ۷۲/۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۷/۲۵ دقیقه، نسبت دانه به حلال ۱۴ درصد و زمان کاری ۰/۸ ثانیه، تعیین گردید که در این شرایط میزان جذب، ۰/۸۶۵ و راندمان استخراج رنگ ۶/۳۵ درصد دانه آناتو بود.

کلید واژه‌گان: آناتو، رنگ، استخراج، امواج فراصوت، روش سطح پاسخ

\* مسئول مکاتبات: fereshtehosseini@yahoo.com

## ۱- مقدمه

رنگ‌ها از جمله مهمترین افزودنی‌های غذایی می‌باشند که نقش کلیدی در رفتار خرید مصرف‌کنندگان دارند. امروزه اثرات منفی رنگ‌های سنتزی بر سلامتی انسان به اثبات رسیده است [۱]. بر خلاف رنگ‌های سنتزی، رنگ‌های با منشا طبیعی اثرات سمی، آلرژی‌زایی و سرطان‌زایی نداشته و برای برخی از آنها خصوصیات مفیدی همچون ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی نیز گزارش شده است [۲].

رنگ آناتو که از پریکارپ دانه آناتو بدست می‌آید کاروتنوئیدی بوده و جزء غالب آن (حدود ۸۰ درصد)، کاروتنوئید بی‌کسین می‌باشد که در آب نامحلول است. نورویکسین بخش محلول در آب و جزء دوم رنگ آناتو (حدود ۲۰ درصد) می‌باشد. علاوه بر این دو، کاروتنوئیدهای دیگری نیز وجود دارند که بخش کمی از دانه را تشکیل می‌دهند [۳]. عصاره‌ی رنگی آناتو طیف رنگ نارنجی تا قرمز دارد و در مقالات مختلف ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد-سرطانی و ضد میکروبی نیز برای آن ذکر شده است [۴، ۵]. امروزه رنگ آناتو به‌عنوان یک رنگ طبیعی و سالم، در فرآورده‌های غذایی مختلف مثل مارگارین، کره، فرآورده‌های قنادی و نانویی کاربرد گسترده‌ای دارد [۶].

روش‌های متداول استخراج رنگ نظیر خیساندن معمولاً زمان‌بر بوده و با صرف هزینه بالا و حجم زیاد حلال همراه می‌باشند. همچنین در بیشتر موارد این روش‌ها راندمان کمتری در مقایسه با روش‌های جدید نظیر استخراج با کمک امواج فراصوت، مایکروویو و حلال فوق بحرانی دارند [۷]. افزایش میزان رنگ استحصالی در استخراج رنگ به کمک امواج فراصوت عمدتاً به تاثیر کاویتاسیون صدایی که در نتیجه عبور امواج فراصوت در حلال ایجاد می‌شود نسبت داده می‌شود. [۸]. علاوه بر این، امواج فراصوت قدرت نفوذ حلال به بافت ماده و سطح تماس فاز مایع و جامد را افزایش می‌دهند [۹]. در میان روش‌های جدید، استخراج به کمک دستگاه فراصوت از نقطه نظر سهولت کار با دستگاه و هزینه پایین نسبت به دیگر روش‌های جدید نظیر استخراج با مایع فوق بحرانی و یا استخراج به کمک مایکروویو دارای مزیت است.

گیاه آناتو بومی ایران نیست اما با هزینه‌ای کم از طریق کشورهای نظیر هند در دسترس بوده و می‌تواند برای استخراج رنگ مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به قیمت بسیار بالای رنگ‌های طبیعی وارداتی، در صورتی که دانش فنی استخراج این رنگ‌ها با راندمان بالا در دسترس باشد، علاوه بر رفع نیاز صنایع غذایی و دارویی کشور به رنگ‌های طبیعی، ارزش افزوده مناسبی را به همراه خواهد داشت. در این پژوهش با توجه به عدم وجود اطلاعات و مستندات کافی در خصوص نحوه تاثیر امواج فراصوت بر فرایند استخراج رنگ از دانه آناتو، کاربرد شرایط مختلف تیمار فراصوت 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 جهت حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کمتری مورد نیاز است.

## ۲- مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل، دانه‌ی آناتو تهیه شده از کشور هند، حلال کلروفرم از شرکت مرک<sup>۱</sup> آلمان و کاغذ صافی واتمن بود. تجهیزات مورد استفاده شامل دستگاه اسپکتروفوتومتر شیمادزو<sup>۲</sup> مدل UV-160A ساخت ژاپن، آون تحت خلأ شل لب<sup>۳</sup> مدل 1410D-2E ساخت آمریکا بود. استخراج رنگ به کمک دستگاه فراصوت میسونیکس<sup>۴</sup> مدل XL2020، با توان ۵۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلو هرتز، انجام شد. ظرف حاوی نمونه داخل حمام آب قرار داد شد تا بدین وسیله دمای استخراج کنترل شود. مقداری از دانه آناتو به منظور روغن زدایی<sup>۵</sup> در حلال هگزان به مدت ۶ ساعت خیسانده شد. پس از انجام فیلتراسیون و جدا نمودن هگزان، دانه‌های روغن-زدایی شده برای استخراج رنگ مورد استفاده قرار گرفتند [۱۰]. مطابق پیش تیمارهای انجام شده در فرآیند استخراج به کمک امواج فراصوت، از حلال کلروفرم که بیشترین میزان رنگ را بین

1. Merck  
2. Shimadzu  
3. Shel Lab  
4. Misonix  
5. Defatting

۰/۸ - ۰/۲ در نظر گرفته شد. در جدول ۱ متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر سطوح آنها نشان داده شده است.

جدول ۱ متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آنها

متغیر مستقل	نماد ریاضی	سطوح متغیر
		-۲ -۱ ۰ +۱ +۲
دمای استخراج (°C)	X <sub>۱</sub>	۲۰ ۳۵ ۵۰ ۶۵ ۸۰
زمان (Min)	X <sub>۲</sub>	۲ ۴ ۶ ۸ ۱۰
چرخه کار (S)	X <sub>۳</sub>	۰/۲ ۰/۳۵ ۰/۵ ۰/۶۵ ۰/۸
نسبت دانه به حلال %	X <sub>۴</sub>	۵ ۸/۷۵ ۱۲/۵ ۱۶/۲۵ ۲۰

مدل مورد استفاده در روش RSM معمولاً معادله‌ی درجه دوم است. در روش RSM برای هر متغیر وابسته، مدلی تعریف شده که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد (۲).

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

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش بینی شده،  $\beta_0$  ضریب ثابت و  $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$  اثرات خطی و  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$  اثر مربعی و  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}$  اثرات متقابل می‌باشند. از نرم افزار Minitab 16 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ صورت گرفت. چهار مدل مختلف، خطی، خطی-مربعی، خطی-مربعی-برهمکنش و درجه دوم کامل را بر نتایج بدست آمده، اعمال شد و مدل‌های مختلف را بر اساس  $R^2$ ،  $R^2$  اصلاح شده،  $R^2$  پیش‌بینی شونده مقایسه شد به صورتی که مدلی که دارای بیشترین مقادیر این سه فاکتور باشد دارای قدرت پیش‌بینی بالا و دقت بیشتری خواهد بود [۱۴].

حلال‌های آلی دیگر استخراج کرد، استفاده شد. عصاره‌ی رنگی آناتو حاصله را پس از فیلتراسیون بوسیله‌ی کاغذ صافی واتمن شماره ۱، توسط آون تحت خلا به صورت پودر در آورده شد.

### اندازه‌گیری مقدار رنگ

پس از رقیق‌سازی تا حد مناسب، اندازه‌گیری شدت رنگ بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۲ نانومتر ( $\lambda_{max}$ ) انجام شد. لازم به ذکر است که در این طول موج بیکسین دارای بیشترین جذب در کلروفورم می‌باشد.

### 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.

### طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی و آماری است که در بهینه‌سازی بسیاری از فرآیندهای مختلف بکار می‌رود مزیت اصلی روش سطح پاسخ کاهش تعداد آزمایشات لازم جهت ارزیابی پارامترهای متعدد و برهمکنش بین آنها است و در صورتی که پاسخ تحت تاثیر تعدادی از فاکتورها قرار گیرد استفاده از این روش مناسب است [۱۱].

در بهینه‌سازی بسیاری از فرآیندهای استخراجی که در آن چند فاکتور موثر است، روش آماری سطح پاسخ کارایی بالایی از خود نشان می‌دهد [۱۲، ۱۳].

از فاکتورهای موثر در استخراج به کمک امواج اولتراسوند، دمای استخراج، زمان استخراج و نسبت دانه به حلال است. در این پژوهش اثر متغیرهای مستقل شامل  $X_1$  دمای استخراج،  $X_2$  زمان استخراج،  $X_3$  چرخه‌ی کاری<sup>۱</sup> (نسبت زمان روشن به زمان خاموشی دستگاه فراصوت) و  $X_4$  نسبت دانه به حلال، هر کدام در پنج سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ترکیدن حباب‌های تشکیل شده توسط امواج فراصوت، زمان خاموشی برای دستگاه در نظر گرفته شد. در صورت عملکرد پیوسته دستگاه راندمان استخراج رنگ کاهش می‌یابد و بدین ترتیب زمان کاری دستگاه

1. Duty cycle

جدول ۲ نتایج تیمارهای مربوط به استخراج رنگ آناتو

تیمار	دما استخراج	زمان استخراج	زمان کاری	نسبت دانه به حلال %	راندمان	جذب نوری
۱	۳۵	۸	۰/۶۵	۸/۷۵	۳/۹۸	۰/۷۴۱
۲	۵۰	۱۰	۰/۵	۱۲/۵	۶/۰۹	۰/۷۳۰
۳	۳۵	۴	۰/۶۵	۱۶/۲۵	۵/۴۱	۰/۷۹۹
۴	۵۰	۶	۰/۵	۱۲/۵	۵/۵۵	۰/۷۸۳
۵	۳۵	۸	۰/۳۵	۸/۷۵	۳/۹۲	۰/۶۹۱
۶	۳۵	۴	۰/۶۵	۸/۷۵	۳/۵۹	۰/۶۵۷
۷	۶۵	۸	۰/۶۵	۱۶/۲۵	۵/۸۵	۰/۸۶۸
۸	۵۰	۶	۰/۵	۲۰	۴/۳۹	۰/۸۰۷
۹	۳۵	۴	۰/۳۵	۸/۷۵	۳/۳۸	۰/۶۴۲
۱۰	۶۵	۴	۰/۳۵	۸/۷۵	۳/۹۱	۰/۷۱۱
۱۱	۶۵	۸	۰/۶۵	۸/۷۵	۵/۱۹	۰/۷۵۸
۱۲	۶۵	۴	۰/۶۵	۱۶/۲۵	۵/۷۱	۰/۸۴۹
۱۳	۳۵	۴	۰/۳۵	۱۶/۲۵	۵/۳۲	۰/۷۹۰
۱۴	۳۵	۸	۰/۳۵	۱۶/۲۵	۵/۳۶	۰/۸۱۷
۱۵	۵۰	۶	۰/۸	۱۲/۵	۵/۷۲	۰/۸۱۹
۱۶	۶۵	۴	۰/۶۵	۸/۷۵	۵/۱۲	۰/۷۲۸
۱۷	۸۰	۶	۰/۵	۱۲/۵	۶/۰۰	۰/۷۲۲
۱۸	۵۰	۲	۰/۵	۱۲/۵	۴/۲۸	۰/۷۱۹
۱۹	۲۰	۶	۰/۵	۱۲/۵	۴/۴۰	۰/۷۴۱
۲۰	۵۰	۶	۰/۲	۱۲/۵	۵/۶۵	۰/۷۶۹
۲۱	۶۵	۴	۰/۳۵	۱۶/۲۵	۵/۰۶	۰/۸۳۱
۲۲	۶۵	۸	۰/۳۵	۸/۷۵	۵/۶۳	۰/۷۲۸
۲۳	۵۰	۶	۰/۵	۵	۲/۸۵	۰/۵۲۷
۲۴	۳۵	۸	۰/۶۵	۱۶/۲۵	۵/۶۳	۰/۸۲۴
۲۵	۶۵	۸	۰/۳۵	۱۶/۲۵	۵/۷۲	۰/۸۵۷

مقدار پاسخ بود بوسیله مقدار مطلوبیت که بین ۰ تا ۱ بود اعتبار شرایط بهینه مورد سنجش قرار گرفت.

پس از انتخاب مدل مناسب به کمک جدول آنالیز واریانس، معنی دار بودن عبارات مختلف، در سطح ۹۵ درصد، بررسی گردید. مرحله آخر، بهینه‌سازی شرایط است هدف از بهینه‌سازی افزایش

جدول ۳ مقایسه ضریب تعیین مدل‌های مختلف

مدل	پاسخ‌ها	راندمان استخراج	جذب نوری
خطی			
	$R^2$ %	۵۹/۴۲	۷۵/۰۳
	$R^2$ % تصحیح شده	۵۶/۵۷	۷۳/۲۸
	$R^2$ % پیش‌بینی شده	۵۱/۵۴	۶۹/۶۶
خطی-مربعی			
	$R^2$ %	۸۹/۷۰	۸۹/۰۵
	$R^2$ % تصحیح شده	۸۸/۱۵	۸۷/۴۰
	$R^2$ % پیش‌بینی شده	۸۵/۱۵	۸۱/۶۸
خطی-برهمکنش			
	$R^2$ %	۶۴/۰۳	۷۲/۹۲
	$R^2$ % تصحیح شده	۵۶/۹۷	۷۱/۲۰
	$R^2$ % پیش‌بینی شده	۵۴/۱۶	۶۸/۹۹
درجه دوم کامل			
	$R^2$ %	۹۴/۳۱	۸۹/۹۴
	$R^2$ % تصحیح شده	۹۲/۶۱	۸۶/۹۴
	$R^2$ % پیش‌بینی شده	۸۸/۶۸	۷۹/۹۸

$$0.0028 X_1 X_2 + 0.0080 X_2 X_3 - 0.0704 X_1 X_3 - 0.7167 X_1 X_2$$

جدول آنالیز واریانس برای ارزیابی معنی‌داری استفاده شد. برای هر یک از عبارات‌های مدل یک مقدار  $F$  و یک مقدار  $P$  مشخص شده که هر چقدر میزان  $F$  بیشتر و میزان  $P$  کمتر باشد عبارت مورد نظر تاثیر بیشتری در میزان پاسخ و در واقع میزان معنی‌داری بیشتری خواهد داشت [۱۵]. با توجه به جدول آنالیز واریانس مدل راندمان استخراج (جدول شماره ۴) تمامی عبارات‌های خطی به جز چرخه‌ی کار معنی‌دار بودند ( $P < 0.001$ ). بین عبارات‌های درجه دوم نیز تمامی عبارات‌ها بجز چرخه‌ی کار و بین برهمکنش‌ها، برهمکنش بین دمای استخراج و نسبت دانه به حلال و برهمکنش بین زمان استخراج و نسبت دانه به حلال معنی‌دار بودند ( $P < 0.05$ ).

### ۳- نتایج و بحث

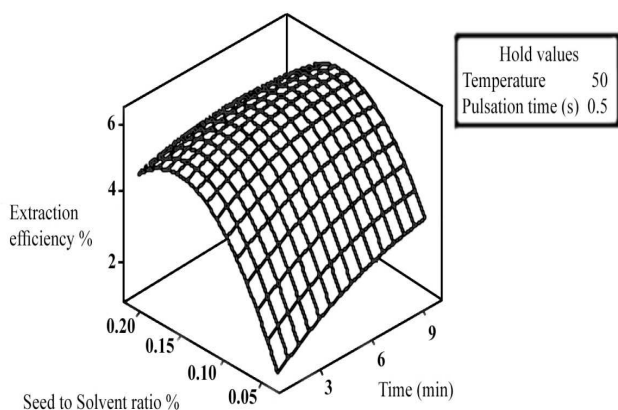
نتایج حاصل از تیمارها در جدول ۳ قابل مشاهده است. پس از مقایسه  $R^2$  های مدل‌های مختلف که در جدول ۴ مشخص شده، مدل درجه دوم کامل برای هر دو پاسخ مناسب در نظر گرفته شد. مدل مناسب برای هر یک از پاسخ‌ها به صورت زیر است:

$$\begin{aligned} \text{راندمان استخراج} = & -9/535 + 0.091 X_1 + 0.635 X_2 + \\ & 2/160 X_3 + 131/547 X_4 - 0 X_1^2 - 0.021 X_2^2 + 0.067 \\ & X_3^2 - 337/587 X_4^2 + 0 X_1 X_2 + 0.25 X_1 X_3 - 0.357 \\ & X_1 X_4 - 0.204 X_2 X_3 - 1/408 X_2 X_4 \\ & - 11/556 X_3 X_4 . \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{میزان جذب نوری} = & 0.0100 + 0.0053 X_1 + 0.0442 X_2 - \\ & 0.2858 X_3 + 6/6342 X_4 - 0 X_1^2 - 0.0020 X_2^2 - 0.4161 \\ & X_3^2 - 16/0090 X_4^2 - 0.0002 X_1 X_2 - 0.0003 X_1 X_3 - \end{aligned}$$

جدول ۴ نتایج آنالیز واریانس مدل راندمان استخراج

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	احتمال F	احتمال P
مدل	۱۴	۴۱/۱۰۲۱	۲/۹۳۵۹	۵۵/۶۳	۰/۰۰۰
خطی	۴	۱۴/۳۰۳۱	۳/۵۷۵۸	۶۷/۷۶	۰/۰۰۰
$X_1$	۱	۱/۰۴۳۰	۱/۰۴۳۰	۱۹/۷۶	۰/۰۰۰
$X_2$	۱	۰/۹۵۳۴	۰/۹۵۳۴	۱۸/۰۶	۰/۰۰۰
$X_3$	۱	۰/۰۵۹۲	۰/۰۵۹۲	۱/۱۲	۰/۲۹۵
$X_4$	۱	۱۳/۷۲۰۱	۱۳/۷۲۰۱	۲۵۹/۹۸	۰/۰۰۰
نمای دوم	۴	۱۳/۱۹۸۲	۳/۲۹۹۵	۶۲/۵۲	۰/۰۰۰
$X_1^2$	۱	۰/۳۹۲۶	۰/۳۹۲۶	۷/۴۴	۰/۰۰۹
$X_2^2$	۱	۰/۳۹۸۶	۰/۳۹۸۶	۷/۵۵	۰/۰۰۸
$X_3^2$	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰	۰/۹۶۰
$X_4^2$	۱	۱۲/۸۸۹۳	۱۲/۸۸۹۳	۲۴۴/۲۳	۰/۰۰۰
برهمکنش	۶	۲/۰۰۸۱	۰/۳۳۴۷	۶/۳۴	۰/۰۰۰
$X_1X_2$	۱	۰/۰۰۶۶	۰/۰۰۶۶	۰/۱۳	۰/۷۲۵
$X_1X_3$	۱	۰/۱۰۱۲	۰/۱۰۱۲	۱/۹۲	۰/۱۷۳
$X_1X_4$	۱	۱/۲۸۸۰	۱/۲۸۸۰	۲۴/۴۱	۰/۰۰۰
$X_2X_3$	۱	۰/۱۲۰۰	۰/۱۲۰۰	۲/۲۷	۰/۱۳۸
$X_2X_4$	۱	۰/۳۵۷۰	۰/۳۵۷۰	۶/۷۶	۰/۰۱۲
$X_3X_4$	۱	۰/۱۳۵۲	۰/۱۳۵۲	۲/۵۶	۰/۱۱۶
باقیمانده	۴۷	۲/۴۸۰۴	۰/۰۵۲۸		
خطای خالص	۳۷	۰/۰۳۰۰	۰/۰۰۰۸		



شکل ۱ اثر متقابل زمان استخراج و نسبت دانه به حلال بر راندمان

استخراج

مطابق شکل ۲، با افزایش دمای استخراج میزان راندمان استخراج افزایش می‌یابد دلیل افزایش راندمان استخراج متناسب با افزایش دما را می‌توان ناشی از بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت رنگدانه و کاهش ویسکوزیته حلال دانست [۱۲].

با توجه به جدول آنالیز واریانس مدل میزان جذب نوری (جدول شماره ۵) همه‌ی عبارت‌های خطی بجز چرخه‌ی کار معنی‌دار بودند ( $P < ۰/۰۵$ ) و بین عبارت‌های درجه دوم، تنها عبارت دمای استخراج بی‌معنی و تمام برهمکنش‌ها نیز بی‌معنی بودند ( $P > ۰/۰۵$ ).

### اثر متغیرهای مستقل بر راندمان استخراج

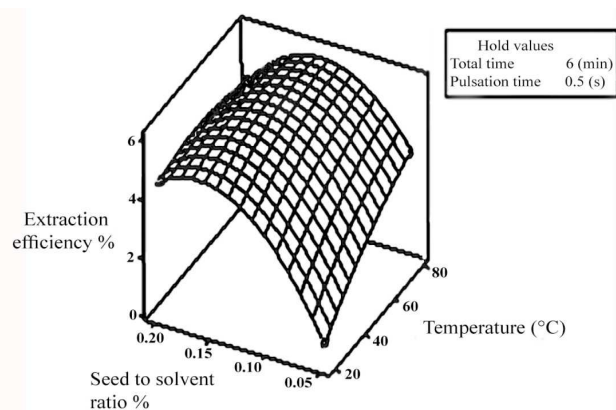
شکل ۱ اثر متقابل زمان استخراج و نسبت دانه به حلال بر راندمان استخراج در مقادیر ثابت چرخه‌ی کار و دمای استخراج را نشان می‌دهد. با افزایش نسبت دانه به حلال ابتدا میزان راندمان افزایش یافته ولی در ادامه افزایش نسبت دانه به حلال به علت اشباع شدن حلال میزان راندمان کاهش می‌یابد. مطابق شکل بیشترین میزان راندمان استخراج رنگ آناتو در شرایط نسبت دانه به حلال ۱۲/۵ درصد و ۱۰ دقیقه بدست می‌آید.

نسبت دانه به حلال ۱۴ درصد، بیشترین راندمان استخراج حاصل می‌شود.

البته در مقادیر بالای نسبت دانه به حلال میزان راندمان استخراج کاهش می‌یابد. مطابق شکل، در شرایط، زمان استخراج ۱۰ دقیقه و

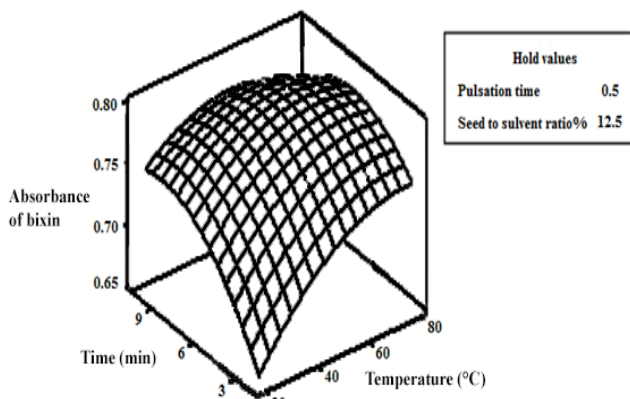
جدول ۵ نتایج آنالیز واریانس مدل میزان جذب نوری

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F احتمال	P احتمال
مدل	۱۴	۰/۲۶۲۲۸	۰/۰۱۸۷۳	۳۰/۰۱	۰/۰۰۰
خطی	۴	۰/۰۴۳۶۳	۰/۰۱۰۹۰	۱۷/۴۷	۰/۰۰۰
$X_1$	۱	۰/۰۰۳۵۱	۰/۰۰۳۵۱	۵/۶۳	۰/۰۲۲
$X_2$	۱	۰/۰۰۴۶۲	۰/۰۰۴۶۲	۷/۴۰	۰/۰۰۹
$X_3$	۱	۰/۰۰۱۰۳	۰/۰۰۱۰۳	۱/۶۶	۰/۲۰۴
$X_4$	۱	۰/۰۳۴۸۹	۰/۰۳۴۸۹	۵۵/۸۹	۰/۰۰۰
نمای دوم	۴	۰/۰۴۰۸۷	۰/۰۱۰۲۱	۱۶/۳۷	۰/۰۰۰
$X_1^2$	۱	۰/۰۰۲۲۴	۰/۰۰۲۲۴	۳/۵۹	۰/۰۶۴
$X_2^2$	۱	۰/۰۰۳۷۸	۰/۰۰۳۷۸	۶/۰۷	۰/۰۱۷
$X_3^2$	۱	۰/۰۰۵۰۱	۰/۰۰۵۰۱	۸/۰۳	۰/۰۰۷
$X_4^2$	۱	۰/۰۲۸۹۸	۰/۰۲۸۹۸	۴۶/۴۳	۰/۰۰۰
برهمکنش	۶	۰/۰۰۲۵۹	۰/۰۰۰۴۳	۰/۶۹	۰/۶۵۷
$X_1X_2$	۱	۰/۰۰۰۸۹	۰/۰۰۰۸۹	۱/۴۳	۰/۲۳۸
$X_1X_3$	۱	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۳	۰/۸۶۰
$X_1X_4$	۱	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۸	۰/۱۳	۰/۷۲۰
$X_2X_3$	۱	۰/۰۰۰۱۸	۰/۰۰۰۱۸	۰/۳۰	۰/۵۸۸
$X_2X_4$	۱	۰/۰۰۰۸۹	۰/۰۰۰۸۹	۱/۴۳	۰/۲۳۸
$X_3X_4$	۱	۰/۰۰۰۵۲	۰/۰۰۰۵۲	۰/۸۳	۰/۳۶۶
باقیمانده	۴۷	۰/۰۲۹۳۴	۰/۰۰۰۶۲		
خطای خالص	۳۷	۰/۰۰۰۴۳	۰/۰۰۰۰۱		

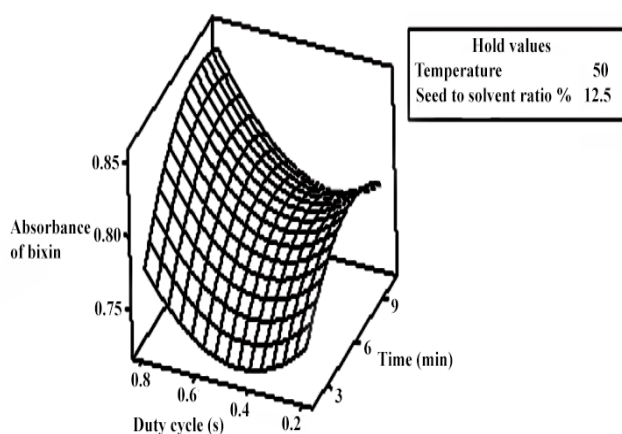


شکل ۲ اثر متقابل دمای استخراج و نسبت دانه به حلال بر راندمان استخراج

شکل ۳ اثر متقابل دما و زمان استخراج را بر راندمان استخراج، در مقادیر ثابت نسبت دانه به حلال و چرخه کار به ترتیب ۱۲/۵ درصد و ۰/۵ ثانیه نشان می‌دهد. مطابق شکل با افزایش دما و زمان استخراج میزان راندمان استخراج افزایش می‌یابد.



شکل ۵ اثر متقابل زمان و دمای استخراج بر میزان جذب نوری

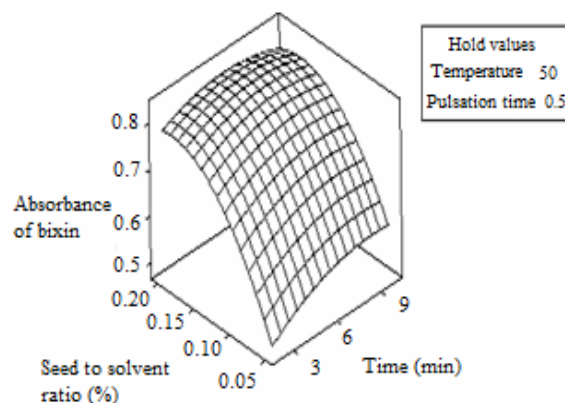


شکل ۶ اثر متقابل زمان استخراج و چرخه‌ی کار بر میزان جذب نوری

مطابق شکل ۶ که اثر متقابل زمان استخراج و چرخه‌ی کار را نشان می‌دهد با افزایش مدت زمان استخراج در ابتدا میزان جذب نوری افزایش یافته ولی در ادامه میزان جذب نوری کاهش می‌یابد. مطابق شکل اثر تخریبی مدت زمان بالای استخراج، در مقادیر بالای چرخه‌ی کاری کاهش می‌یابد که به علت کاهش زمان خاموشی دستگاه و در نتیجه عدم وجود زمان کافی جهت فعالیت تخریبی ترکیبات سونوشیمیایی ایجاد شده، می‌باشد.

### بهینه‌یابی شرایط استخراج

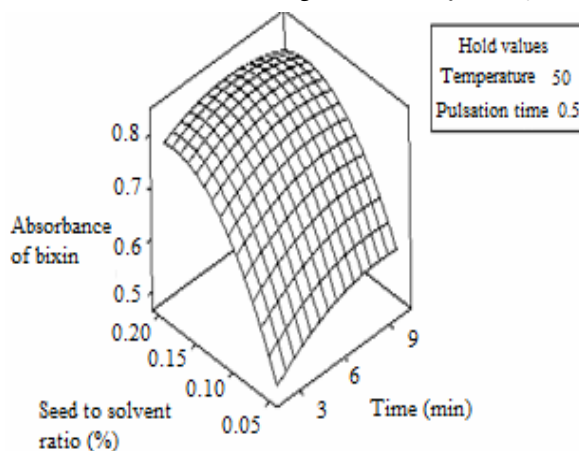
در فرایند بهینه‌سازی، اهمیت دو پاسخ با یکدیگر برابر در نظر گرفته شد و بهینه‌سازی با تکنیک بهینه‌سازی عددی انجام شد (لی و همکاران، ۲۰۱۳). زمان استخراج ۷/۲۵ دقیقه، نسبت دانه به



شکل ۳ اثر متقابل زمان و دمای استخراج بر راندمان استخراج اثر

متغیرهای مستقل بر میزان جذب نوری رنگ آناتو

مطابق شکل ۴ با افزایش نسبت دانه به حلال و مدت زمان استخراج، میزان جذب نوری در ابتدا افزایش یافته ولی در ادامه با افزایش بیشتر مدت زمان استخراج، به علت تشکیل ترکیبات سونوشیمیایی میزان راندمان کاهش می‌یابد. ترکیبات سونوشیمیایی می‌توانند از طریق اکسیداسیون باندهای دوگانه کتزوگه کاروتنوئیدها میزان رنگ را کاهش دهند [۱۶، ۱۷].



شکل ۴ اثر متقابل زمان استخراج و نسبت دانه به حلال بر میزان جذب

نوری

شکل ۵ اثر متقابل دما و زمان استخراج را در مقادیر ثابت نسبت دانه به حلال و چرخه‌ی کار نشان می‌دهد. با افزایش دما و زمان استخراج، میزان جذب نوری افزایش می‌یابد ولی میزان جذب نوری در مقادیر بالای دما و زمان استخراج کاهش می‌یابد که این امر ناشی از آسیب حرارتی باندهای دوگانه می‌باشد [۱۶]. اثر منفی مدت زمان بالای استخراج در این شکل نیز مشخص است.



- microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66, 1074-1078.
- [4] Ramamoorthy, S., Meera, G.P., Lubaina, M., Dipita, B., Geetha, T., Balamurugan, P. and Rajanarayanan, S. 2011. Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant properties of some food dyes, *Food Sci. Biotechnol*, 20 (1): 7-13.
- [5] Tibodeau, J.D., Isham, C.R. and 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, *Antioxidant & redox signaling volume* 13, 987-997.
- [6] Henry, B.S. 1996. Natural food colors. In natural food colors. Blackie academic and professional: Glasgow U.K., 2<sup>nd</sup>, 40-79.
- [7] Wang, L. and Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Tech.* 17, 300-312.
- [8] Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y. and Jo, I.H. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4988-4994.
- [9] Zou, T.B., Jia, Q., Li, H.W., Wang, C.X. and Wu, H.F. 2013. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Mar. Drugs*, 11, 1644-1655.
- [10] Castello, M., Chandra, N., Phatak, A. and Madhuri, S. 2004. Estimation of bixin in seeds of *Bixa orellana* L. from different locations in western Maharashtra. *Indian J. Plant Physiol*, 9 (2), 185-188.
- [11] Salar Bashi, D., Mortazavi, S.A., Rezaei, K., Rajaei, A. and Karimkhani, M.M. 2012. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology, *Food Sci. Biotechnology*. 21(4), 1005-1011.
- [12] Yi, S., Bingjian, D., Ting, Z., Bing, H., Fei, Y., Rui, Y., Xiaosong, H., Yuanying, N. and Quanhong, Li. 2011. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted

حلال ۱۴ درصد، دمای ۷۲/۷ درجه سانتی‌گراد و چرخه‌ی کاری ۰/۸ ثانیه به عنوان شرایط بهینه استخراج یافت شد که در این شرایط میزان جذب نوری رنگ آناتو، ۰/۸۶۵ و راندمان استخراج ۶/۳۵ درصد دانه آناتو و مقدار مطلوبیت هر دو پاسخ یک بود.

#### ۴- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد تکنیک‌های نوین نظیر امواج فراصوت می‌تواند راندمان استخراج رنگ طبیعی آناتو را بهبود بخشد. در استخراج رنگ به کمک امواج فراصوت به علت پائین بودن زمان استخراج، رنگدانه دچار آسیب کمتری می‌شود. همچنین نتایج حاصل از تحقیق، بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه‌سازی فرایند استخراج رنگ آناتو به کمک امواج فراصوت می‌باشد. بر اساس نتایج بدست آمده فاکتور نسبت دانه به حلال ( $X_4$ ) و اثر مربعی آن ( $X_4^2$ ) بیشترین تاثیر را بر راندمان استخراج رنگ آناتو دارد.

#### ۵- تشکر و قدردانی

از همکاری و حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی جهاد دانشگاهی مشهد در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌گردد.

#### ۶- منابع

- [1] Li, j., Zhang, L. and Liu, Y. 2013. Optimization of extraction of natural pigment from purple sweet potato by response surface methodology and its stability. Hindawi publishing corporation, *Journal of Chemistry*, Volume 2013, 1-5.
- [2] Sinha, K., Chowdhury, S., Saha, P.D. and 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.
- [3] Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D.C. and Rankin, S.A. 2003. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic lactic acid and spoilage

- for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92, 701-706.
- [16] Ghafoor, K. and 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.
- [17] Zhang, L.L., Xu, M., Wang, Y.M., Wu, D.M. and Chen, J.H. 2010. Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from Infructescence of *Platycarya strobilacea* using response surface methodology, *Molecules*, 15, 7923-7932.
- peanut (*Arachis hypogaea*) cakes, *Carbohydrate Research*, 346: 305-310.
- [13] Tiezheng, M., Qiang, W. and Haiwen, W. 2010, Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1450-1455.
- [14] Badwaik, L.S., Prasad, K. and 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.
- [15] Quanhong, L. and Caili, F. 2005. Application of response surface methodology

## Application of response surface methodology to optimize Ultrasound-assisted extraction conditions of dye from annatto seeds

Yolmeh, M. <sup>1</sup>, Habibi Najafi, M. B. <sup>2</sup>, Farhoosh, R. <sup>2</sup>, Hosseini, F. <sup>3\*</sup>

1. M. Sc. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2. Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Assistant prof, Department of Food Additives, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad, Iran.

(Received: 92/10/23 Accepted: 93/4/8)

Annatto color is one of the oldest of natural carotenoids that have wide applications in food technology. Annatto color is the second natural color additives used in world industry, of economic. It is predicted that demand for it is increasing day by day. Color extraction from annatto seed is done by conventional methods, mainly. Little information is available about the use of new techniques such as response surface methodology of ultrasound technology in the extraction of annatto color. The subject of this study was to optimize the ultrasound-assistant extraction process of annatto color and determination of the best process conditions by using response surface methodology and central square design. The central composite design was used in order to evaluate the effect of extraction temperature (80-20 °C), extraction time (10-2 min), seed to solvent ratio (5-20 %) and duty cycle (0.2-0.8 s), on efficiency of dye extraction from annatto seed and to optimize the extraction process. ANOVA shows the seed to solvent ratio variable ( $X_4$ ) and it square effect ( $X_4^2$ ) have the greatest impact on dye extraction from the annatto seeds. In temperature of 72.7 °C, extraction time of 7.25 min, the seed to solvent ratio of 14 percent and duty cycle of 0.8 s were found as the optimum conditions of the ultrasound-assistant extraction process in order to obtain the maximum efficiency of color under which the absorbance value and extraction efficiency was determined as 0.865 and 6.35 percent of annatto seed, respectively.

**Keywords:** Annatto, Antioxidant, Ultrasound-assisted, Optimization, Response surface methodology.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: fereshtehosseini@yahoo.com