

## بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ طبیعی کلروفیل از یونجه و بررسی ویژگی های کمی و کیفی آن در مقایسه با منابع گیاهی مختلف

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

۱- گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی  
(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۷)

### چکیده

کلروفیل یکی از مهمترین رنگدانه‌های طبیعی است که کاربرد فراوانی در صنعت غذا دارد. دو عامل مهمی که برای تولید کلروفیل ضروری است شامل استفاده از گیاهان حاوی مقدار زیاد کلروفیل و روش استخراج کارآمد می باشد. لذا در این تحقیق، ابتدا حلال و غلظت مناسب آن جهت استخراج کلروفیل از یونجه تعیین شد. سپس از طرح مرکب مرکزی با شش تکرار در نقطه مرکزی برای بهینه‌سازی اثر نسبت حلال به ماده جامد (۵-۱۰ ml/g)، دما (۳۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان (۳۰-۹۰ دقیقه) بر بازده کلروفیل کل و شاخص سبزی استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که اتانول ۹۰٪ بهترین حلال برای استخراج مقدار بیشینه کلروفیل (۲۹۵ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) بود. همچنین مدل درجه دوم برای بازده کلروفیل کل معنی دار بود و ضریب تبیین ( $R^2$ ) محاسبه شده برای آن ۰/۹۸۹ بود. نسبت حلال به ماده جامد مهمترین عامل معنی دار و اثرگذار بر بازده کلروفیل بود و زمان استخراج، تاثیر معنی داری بر بازده نداشت. راندمان بیشینه تحت شرایط دمای ۵۳/۲ °C، 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 (میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) محاسبه شد. در نهایت، بازده استخراج کلروفیل از ضایعات چمن، برگ درخت توت، شاتوت و چغندر قند در شرایط بهینه اندازه‌گیری شد و بیشترین بازده از برگ درخت شاتوت (۶۹۲ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) بدست آمد و ضایعات چمن و برگ چغندر قند (به ترتیب ۴۳۵ و ۳۶۲ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) در مرتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

کلیدواژه‌گان: استخراج کلروفیل، یونجه، گیاهان سبز، بازده، شاخص سبزی

\* مسئول مکاتبات: Saberian3742.hamed@gmail.com

## ۱- مقدمه

عامل مهمی که برای تولید کلروفیل ضروری است شامل استفاده از گیاهان حاوی مقدار زیاد کلروفیل و روش استخراج کارآمد می‌باشد [۱۰].

کلروفیل عمدتاً از طریق استخراج با استفاده از حلال‌های آلی از قبیل استون، متانول، اتانول و دی‌متیل سولفوکسید طی گرمایش به روش متداول از بافت گیاهی جدا می‌شود [۴ و ۱۱]. از آنجایی که حلال ۱۰۰٪ استون سبب استخراج بیشینه کلروفیل نمی‌شود، معمولاً درصدی از آب به حلال‌های آلی افزوده می‌شود [۱۲].

زو و همکاران (۲۰۱۰) اثر ۵ روش استخراج کلروفیل - شامل حلال‌های استون و اتانول به تنهایی و در نسبت‌های مختلف - را در کلم چینی مورد بررسی قرار دادند و پایداری کلروفیل استخراجی را مقایسه نمودند [۱۳]. میازک و لداکوچ (۲۰۱۳) استخراج کلروفیل از برگ‌ها (اقاقیا)، سوزن برگ‌ها (کاج) و ریزجلبک‌ها را مورد بررسی قرار دادند [۱۴]. هانگ و همکاران (۲۰۱۴) اثر سه نوع حلال استون، اتانول و دی‌متیل سولفوکسید بر استخراج کلروفیل از ترشک خزنده (*creeping oxalis*) را مورد بررسی قرار دادند [۱۵]. کنگ و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر غلظت‌های مختلف (۸۰-۱۰۰٪) اتانول، استون و متانول را بر بازده کلروفیل کل مورد بررسی قرار دادند [۱۶].

باتوجه به اهمیت کلروفیل به عنوان رنگ سبز طبیعی در صنایع غذایی و نوشیدنی و ضرورت استفاده از افزودنی‌های طبیعی به جای انواع سنتزی به خاطر ایمنی و حتی اثرات سلامتی‌بخش آن‌ها، و باتوجه به اینکه تاکنون تحقیقی جامع در زمینه استخراج کلروفیل مخصوصاً از منابع بومی مستعد در کشور صورت نگرفته است؛ ضرورت دارد تا پژوهشی جامع در این زمینه صورت پذیرد. لذا هدف از این تحقیق در ابتدا، انتخاب نوع و غلظت حلال و سپس بهینه‌سازی شرایط استخراج کلروفیل از نظر نسبت حلال به ماده جامد، دما و زمان استخراج - به طوری که کلروفیل استخراجی بیشترین بازده و کیفیت را داشته باشد - از گیاه یونجه - که یکی از متداول‌ترین منابع استخراج کلروفیل است - می‌باشد. در نهایت استخراج کلروفیل از سایر منابع بومی مستعد از قبیل ضایعات چمن، برگ درخت توت، شاتوت و چغندر قند صورت پذیرفت و بازده استخراج و شدت رنگ نمونه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

کلروفیل، رنگ حاصل از استخراج به وسیله حلال از برخی از گیاهان سبز خوراکی مانند علف، یونجه، گزنه، اسفناج، برگ برخی از گیاهان مانند توت، شاتوت، چغندر قند و غیره می‌باشد [۱ و ۲]، بنابراین ماده اولیه لازم جهت استخراج این محصول گرانیقیمت، بسیار ارزان است. کلروفیل‌های *a* و *b* به میزان بیشتر در گیاهان عالی و به نسبت ۳ به ۱ وجود دارند. این دو نوع کلروفیل ساختار مشابهی دارند و تفاوتشان در گروه *R* آنهاست. اگر *R* یک گروه متیل ( $CH_3$ ) باشد، کلروفیل از نوع *a* و اگر عامل فرمیل ( $CHO$ ) باشد، کلروفیل از نوع *b* است. هسته چهار پیرولی یا سر مولکول کلروفیل قطب آب دوست و زنجیر فیتولی یا دم کلروفیل قطب آب گریز (یا چربی دوست) آن را تشکیل می‌دهد و به همین جهت کلروفیل و مولکولهای نظیر آن را ترکیبات دوپسند<sup>۲</sup> می‌نامند [۳ و ۴].

کلروفیل به خاطر دو خاصیت اصلی خود، هم به عنوان یک ماده رنگی و هم ماده‌ای بوگیر در صنعت کاربرد زیادی دارد. همچنین جهت رنگ کردن فرآورده‌های لبنی، روغن‌های خوراکی، کیک، نوشیدنی‌ها، آب میوه، ژله‌ها، پاستا، فرمولاسیون غذای کودک، آدامس، شکر و محصولات قنادی و همچنین در حفظ رنگ سبزی‌های منجمد و یا کنسرو شده کاربرد دارد [۵ و ۶]. مصرف کلروفیل به خاطر منافع سلامتی‌بخش آن نیز می‌باشد و بسیاری از محصولات محتوی کلروفیل از قبیل مکمل‌ها و آب‌میوه‌های غذایی مورد استقبال قرار گرفته‌اند. تولیدکنندگان این محصولات مدعی هستند که تشابه شیمیایی بین کلروفیل و گروه پروستتیک (هم) هموگلوبین ممکن است مسئول محافظت بدن انسان در برابر چندین بیماری باشد [۷]. برخی از محققین فعالیت ضد اکسایشی کلروفیل را تایید کردند که در نهایت توانایی پیشگیری از بیماری‌های مزمن را نیز به همراه خواهد داشت. همچنین این ترکیب، مستعد فعالیت‌های ضدسرطانی (*Anti-mutagenic*) در بدن انسان می‌باشد [۸ و ۹].

در سال‌های اخیر تمرکز ویژه‌ای برای استخراج و تولید صنعتی رنگدانه‌های طبیعی از گیاهان وجود داشته است و استخراج کلروفیل به عنوان رنگدانه طبیعی از جمله آن‌ها می‌باشد. دو

## 1. Amphiphilic compounds

## ۲- مواد و روش ها

## ۲-۱- آماده سازی نمونه ها

نمونه‌های گیاهی شامل یونجه، ضایعات چمن، برگ درخت توت، شاتوت و چغندرقد از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد و همچنین فروشگاه در مشهد تهیه شدند پس از شستشو، در آون با دمای °C ۵۰ تا رسیدن به وزن ثابت (۳۰ ساعت) خشک شدند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب تیغه‌ای پودر شده و از الک با مش ۵۰ عبور داده شدند و تا زمان انجام آزمون، در نایلون در دمای اتاق نگهداری شدند. استون و اتانول با درجه آزمایشگاهی از شرکت دکتر مجللی (صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) خریداری شد.

## ۲-۲- انتخاب نوع و غلظت حلال

در این قسمت ابتدا نوع حلال و غلظت آن تعیین شد. باتوجه به تحقیقات پیشین [۱۶] عمدتاً اتانول و استون در غلظت ۸۰-۹۰٪ (حجمی/حجمی) مورد استفاده قرار گرفته اند و لذا در این آزمون نیز از استون ۸۰٪، استون ۹۰٪، اتانول ۸۰٪ و اتانول ۹۰٪ در شرایط ثابت دما، زمان و نسبت حلال با جامد به ترتیب ۶۰، ۴۵ دقیقه و ۱۰ به ۱ (میلی لیتر بر گرم) مطابق روش ازاک و بیلک (۲۰۱۵) استفاده شد [۱۷]. نمونه‌ها در داخل بطری شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ در بسته (جهت جلوگیری از تخریب کلروفیل) و بر روی دستگاه مگنت استیرر با دور rpm ۳۰۰ انجام شد. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

## ۲-۳- بهینه سازی استخراج کلروفیل با استفاده

## از RSM

بهینه‌سازی استخراج کلروفیل با استفاده از روش RSM و طرح مرکب مرکزی در سه سطح (مطابق جدول ۱) انجام پذیرفت. شرایط استخراج شامل نسبت حلال به ماده جامد (۱۰ به ۱ تا ۵ به ۱)، دمای استخراج (۳۰-۷۰ درجه) در طی زمان (۳۰-۹۰ دقیقه) می باشد. نوع و غلظت حلال بکار رفته در این آزمون، از مرحله قبل انتخاب شد. استخراج کلروفیل از نمونه‌های گیاهی به روش کودهاری و آنانتارایان (۲۰۰۷) انجام پذیرفت [۱۸]. همه آزمون‌های استخراج تا حد امکان در شرایط نور کم و در لوله آزمایش‌های قهوه‌ای رنگ انجام شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه و

دور rpm ۸۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی جمع آوری شد. ضرایب مرتبه دوم مدل با استفاده از نرم افزار آماری محاسبه شد. آزمون‌ها در دوتکرار انجام شدند.

**Table 1** Independent variables and their levels used in the CCD design

Level of factors	Temperature (°C)	Time (min)	S/S ratio (ml/g)
-1	30	30	1:5
0	50	60	1:7.5
+1	70	90	1:10

## ۲-۴- مقایسه بازده کلروفیل استخراجی از منابع

## گیاهی مختلف

در این قسمت استخراج کلروفیل از پودر گیاهان مختلف شامل یونجه، ضایعات چمن، برگ درخت توت، شاتوت و چغندرقد در شرایط بهینه شده در مرحله قبل انجام پذیرفت. در نهایت، بازده کلروفیل استخراجی از گیاهان مختلف و شاخص رنگ آن‌ها با همدیگر مقایسه شد.

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

## اسپکتروسکوپی

برای اندازه گیری میزان کلروفیل، مایع رویی بدست آمده بعد از عمل سانتریفیوژ در مراحل قبل، با استفاده از استون ۸۰٪ رقیق شد و جذب نمونه‌ها در طول موج های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل BC47358، شرکت Biochrom، ساخت انگلستان) خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر میزان کلروفیل کل محاسبه گردید [۱۹]:

$$100/1000 * (20.2 A_{645} + 8.02 A_{663}) * \text{فاکتور رقیق}$$
 سازی = کلروفیل کل (میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن تازه نمونه)

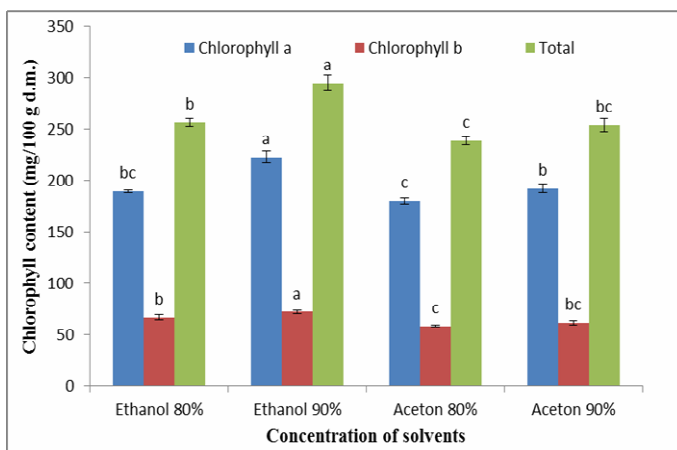
## ۲-۶- اندازه گیری شاخص رنگی

شاخص سبزی ( $a^*$ ) عصاره‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه هانتربل (HunterLab ColorFlex، مدل C04-1005-631، ساخت تایوان) صورت پذیرفت [۱۷].

## ۲-۷- طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

روش سطح پاسخ (RSM) مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرایندهایی به کار می‌رود و پاسخ مورد

همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که قطبیت نسبی و افزایش در تورم موثر جلبک با آب موجب افزایش سطح تماس حلال با ماده حل شونده می‌گردد و افزایش بازده را به همراه دارد [۲۵]. همچنین مخلوط آب و حلال آبی، ویسکوزیته محلول و در نهایت مقاومت انتقال جرم مایع را کاهش می‌دهد که افزایش استخراج را به دنبال دارد [۱۷]. مطابق شکل ۱، نتایج مربوط به بازده کلروفیل a و b نیز مشابه کلروفیل کل بود و میزان کلروفیل a در همه شرایط بیشتر از نوع b بود (۳/۰۳ + ۰/۱۳) برابر) اگرچه کنگ و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که هر سه حلال متانول، اتانول و استون موجب استخراج میزان کلروفیل b بیشتری نسبت به نوع a شدند [۲۱]. دنگ و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که سیانوباکتری‌ها عموماً حاوی کلروفیل a هستند اگرچه جلبک‌های سبز عمدتاً حاوی کلروفیل b هستند [۲۶].



**Fig 1** The extraction yield of chlorophyll a, b and total by different solvents

مطابق شکل ۲، بیشترین میزان سبزی رنگ (a کوچکتر) مربوط به حلال اتانول بود و افزایش غلظت حلال‌ها به طور معنی داری موجب کاهش شاخص سبزی (افزایش a) شد. در نهایت باتوجه به اینکه بیشترین بازده کلروفیل با استفاده از اتانول بدست آمد و همچنین از آنجایی که شاخص سبزی رنگ استخراجی با اتانول به طور معنی داری بیشتر از استون بود و از طرفی با لحاظ ایمنی حلال مورد استفاده در مواد غذایی و همچنین هزینه‌های اقتصادی، اتانول ۹۰٪ به عنوان بهترین حلال برای استخراج انتخاب شد.

نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها، قابل برآورد هستند [۲۰]. طرح مرکب مرکزی (CCD) جهت ارزیابی ضرایب مدل ریاضی درجه دوم بکار گرفته شد و آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 انجام شد. جهت انتخاب بهترین نوع حلال و غلظت آن و همچنین مقایسه منابع گیاهی از نظر بازده کلروفیل، آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS 21 و آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- انتخاب نوع حلال

نتایج حاکی از آن بود که بیشترین بازده کلروفیل کل مربوط به حلال اتانول با غلظت ۹۰٪ (و ۱۰٪ آب) بود (۲۵۶ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) (شکل ۱). سپس اتانول ۸۰٪ و استون ۹۰٪ بیشترین بازده کلروفیل را به همراه داشتند. بنابراین کارایی حلال اتانول نسبت به استون در استخراج کلروفیل بیشتر بوده است و از طرفی، غلظت ۹۰٪ حلال‌ها نسبت به ۸۰٪ بازده بیشتری را موجب شده است. کنگ و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که استخراج کلروفیل کلرا (Chlorella) با استفاده از حلال‌های استون، اتانول و متانول ۸۰٪ نسبت به حلال خالص بیشتر بود و بیشترین استخراج به ترتیب مربوط به حلال‌های متانول، اتانول و استون بود. رایت و مانورا (۱۹۹۷) حلال متانول را نسبت به استون جهت استخراج کلروفیل نمونه‌های دریایی ترجیح دادند [۲۱]. جسرین و کریستوفرسن (۱۹۸۷) مشاهده کردند که اتانول نیز همانند متانول در استخراج کلروفیل موثر و کارآمد می‌باشد [۲۲]. احتمالاً علت این امر آن است که باتوجه به اینکه کلروفیل به صورت ناهمگونی با سایر ترکیبات موجود در کلروپلاست باند شده است و حداقل دو یا حتی سه نوع از کلروفیل (a, b, c و ...) در کلروپلاست موجود است، بنابراین قطبیت‌های مختلف حلال‌های آلی و آب منجر به استخراج انواع گوناگونی از کلروفیل می‌شود و همین امر موجب تفاوت در راندمان کلروفیل کل استخراجی می‌گردد [۲۳ و ۲۴]. علاوه بر اینها، همومول و

کلروفیل کل پرداخته شد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای بازده کلروفیل کل استخراجی از یونجه در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دوم برای بازده کلروفیل کل معنی دار بود و ضریب تبیین ( $R^2$ ) محاسبه شده برای آن ۰/۹۸۹ بود که بیانگر آن است که ۹۸/۹٪ تغییر در پاسخها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. به عبارت دیگر، تنها ۱/۱٪ تغییرات کل توسط مدل، قابل پیش بینی و توضیح نمی باشد. ضریب تبیین اصلاحی ( $R^2_{adj} = 0.98$ ) 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 [۲۷]. مطابق جدول ۳، عدم برازش معنی دار نبود. بنابراین همه نتایج حاکی از این بودند که مدل رگرسیونی درجه دوم تحت شرایط مختلف دما، زمان و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی بازده کلروفیل کل را پیش بینی می کند.

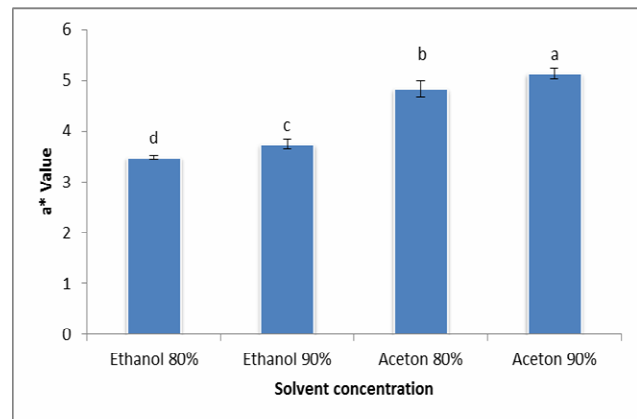


Fig 2 a\* value of extracted chlorophyll by different solvents

### ۲-۳- بهینه سازی استخراج کلروفیل در شرایط مختلف

مقادیر پاسخها (بازده کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و شاخص سبزی) تحت شرایط مختلف آزمون در جدول ۲ مشاهده می گردد. باتوجه به گستردگی نتایج و همچنین روند مشابه کلروفیل های a و b با کلروفیل کل، تنها به تجزیه و تحلیل

Table 2 Experimental conditions from the CCD and the experimental results for chlorophyll extraction from Alfalfa

No.	Temperature (°C)	Time (min)	Solvent/Solid ratio (ml/g)	Chl a (mg/100g d.m.)	Chl b (mg/100g d.m.)	TCC(mg/100g d.m.)	a* Value
1	50	60	7.5	188	61	249	3.82
2	50	60	10	235	84	317	3.90
3	50	60	5	145	48	193	3.56
4	70	90	10	230	76	304	3.95
5	50	60	7.5	187	61	248	3.88
6	70	30	10	224	74	317	3.91
7	70	90	5	118	38	156	3.72
8	30	90	5	159	50	210	3.75
9	30	30	5	151	49	201	3.80
10	50	60	7.5	196	63	258	3.80
11	30	60	7.5	177	55	232	3.97
12	70	60	7.5	161	54	215	3.70
13	30	90	10	233	74	312	4.05
14	50	90	7.5	190	64	254	3.84
15	50	60	7.5	192	63	255	3.70
16	50	30	7.5	188	61	249	3.82
17	50	60	7.5	185	59	244	3.88
18	30	30	10	211	66	278	3.98
19	50	60	7.5	192	61	253	3.85
20	70	30	5	143	48	191	3.62

**Table 3** Analysis of variance of different models for total chlorophyll content

Source	Sum of Square	df	Mean Square	F Value	p-value	R <sup>2</sup>
Mean vs Total	1,218,423	1	1,218,423			
Linear	33,395	3	11,132	43.92	< 0.0001	0.892
2FI	2,430	3	810	6.48	0.0064	0.965
Quadratic	1,240	3	413	10.70	0.0018	0.989
Cubic	95	4	24	0.49	0.7447	0.992
Residual	291	6	49			
Total	1,255,874	20	62,794			

$X_3^2$  به طور قابل توجهی بازده کلروفیل کل را تحت تاثیر قرار داد ( $p < 0.05$ ). نسبت حلال به ماده جامد اثر خطی مثبت معنی داری بر بازده کلروفیل داشت و طبق معادله (۱)، بزرگترین ضریب (+۵۷/۵۷) مربوط به این عامل بود و بنابراین مهمترین عامل معنی دار و اثرگذار بر بازده کلروفیل بوده است. بنابراین با افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بازده کلروفیل افزایش قابل توجهی پیدا کرد. علت این امر را می توان افزایش نفوذ حلال آلی به ماتریس سلول های گیاهی و در نتیجه افزایش انحلال پذیری و استخراج ترکیب رنگی دانست [۲۸].

آنالیز رگرسیون چندگانه (مدل درجه دوم) بر روی داده‌های آزمون انجام شد و معادله (۱) برای پاسخ‌های پیش بینی شده بازده کلروفیل کل به صورت کدگذاری شده بدست آمد:

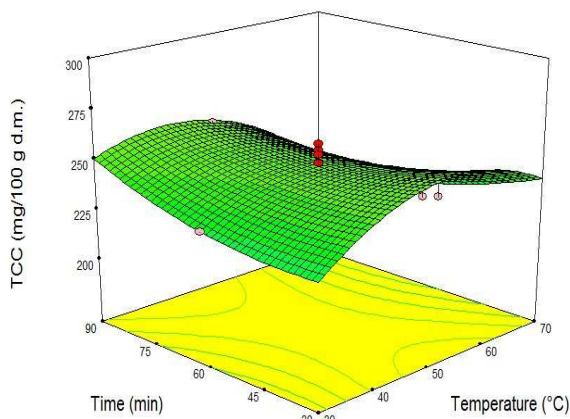
$$TCC = 248.44 - 4.99 X_1 - 0.0059 X_2 + 57.57 X_3 - 11.40 X_1 X_2 + 11.81 X_1 X_3 + 5.84 X_2 X_3 - 21 X_1^2 + 7.22 X_2^2 + 10.54 X_3^2 \quad (1)$$

در این رابطه  $X_1$ ،  $X_2$ ،  $X_3$  به ترتیب کدهای دما، زمان و نسبت حلال به ماده جامد می باشند.

معنی داری هر پارامتر با شاخص P مشخص گردید. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود اثر خطی متغیرهای  $X_1$  و  $X_3$  و اثر متقابل  $X_1 X_2$ ،  $X_1 X_3$  و  $X_2 X_3$  و همچنین اثر توان دوم  $X_1^2$  و

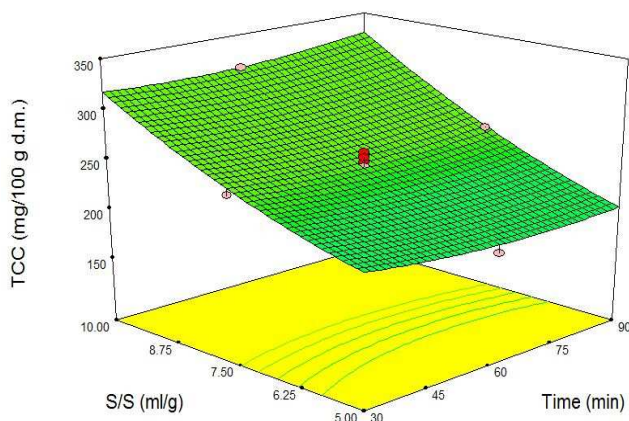
**Table 4** Analysis of variance and significance of regression coefficient for

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	Value	p-value	
Model	37,064.98	9	4118.33	106.66	< 0.0001	significant
$X_1$ -Temperature	248.81	1	248	6.44	0.0294	
$X_2$ -Time	0.00	1	3.46E-04	8.97E-06	0.9977	
$X_3$ -solvent/solid ration	33,146.62	1	33146	858.48	0.0001	
$X_1 X_2$	1,039.91	1	1039.91	26.93	0.0004	
$X_1 X_3$	1,117.37	1	1117.37	28.94	0.0003	
$X_2 X_3$	272.73	1	272.73	7.06	0.024	
$X_1^2$	1,212.41	1	1212.41	31.4	0.0002	
$X_2^2$	143.35	1	143.35	3.71	0.0829	
$X_3^2$	305.27	1	305.27	7.91	0.0184	
Residual	386.11	10	38.61			
Lack of Fit	246.99	5	49.4	1.78	0.272	not significant
Pure Error	139.12	5	27.82			
Total	37,451.08	19				



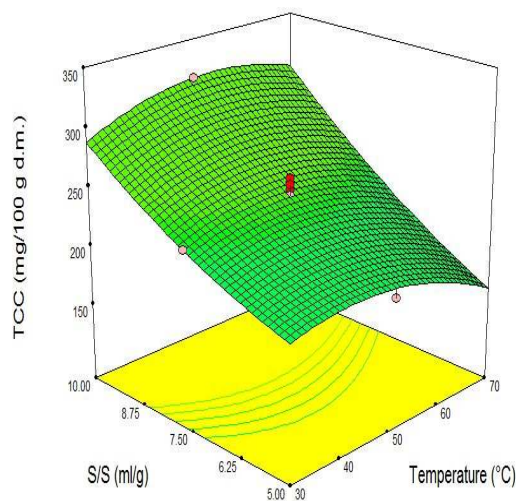
**Fig 4** Response surface plot of the combined effect of time and temperature during chlorophyll extraction

مطابق جدول ۴، اثر متقابل همه متغیرها ( $X_1X_3$ ،  $X_1X_2$  و  $X_2X_3$ ) معنی دار بود. اگرچه زمان تاثیر معنی داری بر بازده کلروفیل نداشت اما مطابق شکل ۴، اثر متقابل دما - زمان بر بازده معنی دار بود و به این صورت بود که در دمای بالا ( $70^\circ\text{C}$ )، با افزایش زمان، میزان بازده کلروفیل کل کاهش پیدا کرد که تاثیر دمای بالا طی زمان بر تخریب کلروفیل را نشان می دهد. ون البه و شوارتز (۱۹۹۶) بیان کردند که فرآیند حرارتی میوه ها و سبزیجات سبزرنگ منجر به حذف یون منیزیم و تشکیل مشتقات کلروفیل از قبیل فنوفیتین ها می شود و همین امر منجر به ازدست رفتن رنگ سبز می گردد [۲۹]. همچنین اثر متقابل نسبت حلال به جامد- دما و نسبت حلال به جامد- زمان معنی دار بود و در هر دما و زمانی، با افزایش نسبت حلال، بازده کلروفیل کل افزایش یافت (شکل های ۳ و ۵).



**Fig 5** Response surface plot of the combined effect of S/S and time during chlorophyll extraction

شکل های ۳-۵ منحنی های سه بعدی را با به تصویر کشیدن بازده کل کلروفیل به صورت تابعی از دو فاکتور دیگر و ثابت نگه داشتن فاکتور سوم در نقطه مرکزی جهت درک بهتر اثر منفرد و متقابل متغیرهای مستقل بر پاسخ نشان می دهد. مطابق شکل های ۳ و ۴، دما تاثیر درجه دوم بر بازده کلروفیل داشت و ابتدا موجب افزایش بازده و سپس موجب کاهش آن شد. به نظر می رسد در ابتدا، افزایش دما موجب افزایش نفوذپذیری حلال به سلول های گیاهی و در نتیجه افزایش استخراج کلروفیل شده است اما از آنجایی که کلروفیل ترکیبی حساس به حرارت است، با افزایش بیشتر دما، کلروفیل تخریب می شود [۲۹]. زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نداشت. 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 [۳۰]. واسموند و شوریز مشاهده کردند که کارایی استخراج با اتانول ۹۶٪ بیشتر از استون ۹۰٪ بود و زمان استخراج در زمانی که از حلال اتانول استفاده شد، تاثیری بر بازده استخراج نداشت [۳۱].



**Fig 3** Response surface plot of the combined effect of S/S and temperature during chlorophyll extraction

چغندر (کمتر از برگ درخت شاتوت بود اما به نظر می‌رسد جمع‌آوری این ضایعات مستعد، آسانتر از برگ شاتوت می‌باشد و می‌تواند در سطح صنعتی جهت استخراج کلروفیل مورد استفاده قرار گیرد.

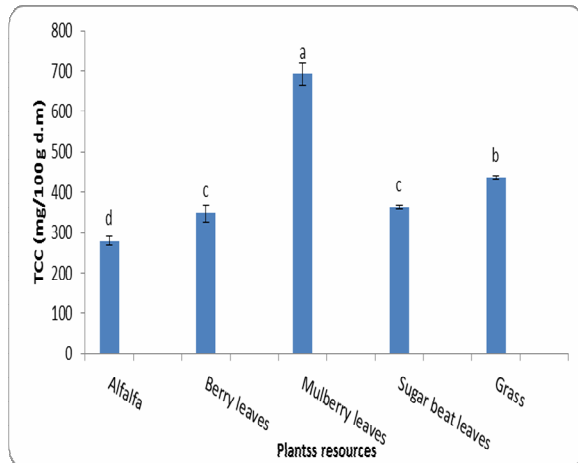


Fig 6 Comparison of the total chlorophyll (TTC) from different plant resources

#### ۴- نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که حلال اتانول جهت استخراج کلروفیل نسبت به حلال استون کارآمدتر می‌باشد. علاوه بر این، اتانول از نظر بهداشتی و ایمنی و همچنین هزینه‌های اقتصادی در اولویت قرار دارد. نتایج بهینه‌سازی حاکی از آن بود که دمای بالا موجب تخریب کلروفیل طی زمان شد و بیشترین تاثیر مربوط به اثر نسبت حلال به ماده جامد بود. راندمان بیشینه تحت شرایط دمای ۵۳/۲ °C، 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) بدست آمد. بیشترین بازده کلروفیل مربوط به برگ درخت شاتوت و سپس چمن بود. لذا برگ درخت شاتوت بهترین منبع از نظر بازده کلروفیل می‌باشد. ضایعات چمن و برگ چغندر (که هم منابع مستعدی هستند که بازده بالایی داشتند و جمع‌آوری آن‌ها جهت استخراج کلروفیل امکان‌پذیرتر از برگ شاتوت می‌باشد. گرچه از میان منابع مختلف بررسی شده، یونجه دارای کمترین میزان کلروفیل بود اما با توجه به اینکه به صورت انبوه و در طول سال کشت می‌شود و برداشت آن از مزارع کشاورزی آسان است، هنوز به عنوان یکی از منابع عمده

از میان مدل‌هایی که برای پیش‌بینی شاخص سبزی ( $a^*$  Value) استفاده شده بود، تنها مدل خطی، معنی‌دار بود اما میزان ضریب تبیین نسبتاً کم بود ( $R^2 = 0.70$ ) که حاکی از کیفیت پایین مدل برای پیش‌بینی است.

براساس نتایج مذکور، شرایط بهینه متغیرهای آزمون برای استخراج کلروفیل از یونجه با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 پیش‌بینی شد. راندمان بیشینه تحت شرایط دمای ۵۳/۲ °C، زمان ۳۴/۸۳ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد ۹/۹۹ (ml/g) پیش‌بینی شد و تحت این شرایط میزان کلروفیل کل پیش‌بینی شده ۳۱۸ (میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) بدست آمد.

#### ۳-۳- مقایسه کلروفیل استخراجی از منابع گیاهی مختلف

براساس نتایج بدست آمده در قسمت ۳-۲، بهترین شرایط استخراج کلروفیل کل از یونجه شامل دمای ۵۳/۲ °C، زمان ۳۴/۸۳ دقیقه و نسبت حلال به ماده جامد ۹/۹۹ (ml/g) بود و بنابراین استخراج کلروفیل از سایر منابع گیاهی مستعد از قبیل ضایعات چمن، برگ درخت توت، شاتوت و چغندر (که در همین شرایط انجام پذیرفت. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، بیشترین بازده کلروفیل کل از برگ درخت شاتوت (۶۹۲ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) بدست آمد و سپس چمن حاوی بیشترین میزان کلروفیل بود (۴۳۵ میلی گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک). میازک و لداکویچ (۲۰۱۳) استخراج کلروفیل از برگ‌ها (اقاقیا)، سوزن برگ‌ها (کاج) و ریزجلبک‌ها را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که بیشترین میزان رنگدانه در ریزجلبک‌ها (۴/۶۱٪) و کمترین میزان در برگ‌های سوزنی کاج (۰/۳۸٪) وجود داشت [۱۴]. چن و جیانگ (۱۹۹۹) گزارش کردند که بیشتر جلبک‌هایی که در شرایط بهینه کشت می‌شوند، حاوی ۴٪ کلروفیل بر اساس وزن خشک می‌باشند [۳۲]. شاخص سبزی کلروفیل‌های استخراجی از منابع مختلف مشابه بود و تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها وجود نداشت. بازده بالای برگ شاتوت می‌تواند مقدمه‌ای برای مدیریت و جمع‌آوری این منبع مستعد جهت استخراج کلروفیل باشد. گرچه بازده کلروفیل ضایعات چمن و برگ چغندر (که به عنوان محصول جانبی



microsomal lipid peroxidation in rat liver. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*; 32: 16-722.

- [10] Humphrey, A. (1980). Chlorophyll. *Food Chemistry*; 5: 57-67.
- [11] Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions.
- [12] Jeffrey, S. W. Mantoura, R. F. C. and Wright S. W. (1997). *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*, UNESCO, Paris, Farnce.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Hung, S.-M., Hsu, B.-D., & Lee, S. (2014). Modelling of isothermal chlorophyll extraction from herbaceous plants. *Journal of Food Engineering*; 128: 17-23.
- [16] 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.
- [17] Özkan, G., & Bilek, S. E. (2015). Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food chemistry*; 176:152-157.
- [18] Choudhari, S., & Ananthanarayan, L. (2007). Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*; 102: 77-81 .
- [19] Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, *Plant physiology*; 24: 1-16.
- [20] Hill, W.J. and Hunter, W.G. 1966. A review of response methodology: A literature survey, *Technometrics*, 8 (4): 571-590.
- [21] Wright SW, Mantoura RFC (1997) Guidelines for collection and pigment analysis of field samples. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to*

کلروفیل در دنیا مورد توجه می‌باشد. لذا توصیه می‌گردد تا علاوه بر یونجه، برگ درخت شاتوت و همچنین برگ چغندر قند و ضایعات چمن جهت استخراج کلروفیل در حد صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

## ۵- تشکر و قدردانی

از همکاری گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد به خاطر مساعدت در انجام این تحقیق، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## ۶- منابع

- [1] Iranian National Standardization Organization (INSO) 740, Permitted food additives- Food colors- List and general specifications (2012).
- [2] Bagheri, S. L., Radi, m., & Amiri, S. (2012). Investigation of chemical structure and stability of chlorophyll as a natural pigment, 21<sup>th</sup> national congress of Iranian Food Science and Technology.
- [3] Sahari, M. A. (2001). The chemistry of colorant ingredients in food. Daneshmand Publication: 23-44.
- [4] Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*: CRC Press.
- [5] Momeni, T. K. (1378). Chlorophyll and its stability, Research institute of forests and pasturages; *Sarang*: 1-117.
- [6] Humphrey, A. (2004). Chlorophyll as a color and functional ingredient. *Journal of Food Science*; 69: 422-425.
- [7] Hughes, J. H., & Latner, A. L. (1936). Chlorophyll and haemoglobin regeneration after haemorrhage. *The Journal of Physiology*; 86: 388-395.
- [8] Sato, M., Fujimoto, I., Sakai, T., Kimura, R., & Murata, T. (1979). An antioxidative component in the commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Yakugaku Zasshi*; 99: 1055-1057.
- [9] Sato, M., Imai, K., Kimura, R., & Murata, T. (1984). Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI. Effect of its administration on mitochondrial and

- [27] 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.
- [28] Agarwal, P. C., & Pruthi, J. S. (1968). A study of factors governing the recovery and quality of pectin from fresh mandarin orange waste (peel and pomace). *Indian Food Packer*; 22(3): 5-9.
- [29] Von Elbe, J., & Schwartz, S. (1996). *Colorants (Cilt 2)*. New York: Marcel Dekker: *Food Chemistry*.
- [30] Schumann R, Häubner N, Klausch S, Karsten U (2005) Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. *Int Biodeter Biodegr*; 55:213-222.
- [30] Wasmund N, Topp I, Schories D (2006) Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia*; 48:125-144.
- [32] Chen F, Jiang Y (1999) *Biotechnology of microalgae*. Light Industry Press of China, Beijing, pp 56-58.
- modern methods. *UNESCO Publ, Paris*, 429-445.
- [22] Jespersen AM, Christoffersen K (1987) Measurements of chlorophyll a from phytoplankton using ethanol as an extraction solvent. *Arch Hydrobiol*; 109:445-454.
- [23] Öquist G, Samuelsson G (1980) Sequential extraction of chlorophyll from chlorophyll-protein complexes in lyophilized pea thylakoids with solvents of different polarity. *Physiol Plantarum*; 50:57-62.
- [24] Macías-Sánchez MD, Mantell C, Rodríguez M, Martínez de la Ossa E, Lubián LM, Montero O (2009) Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*; 77:948-952.
- [25] Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A (2006) Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason Sonochem*; 13:543-548.
- [26] Deng Z, Hu Q, Lu F, Liu G, Hu Z (2008) Colony development and physiological characterization of the edible blue-green alga, *Nostoc sphaeroides* (Nostocaceae, Cyanophyta). *Progress in Natural Science*; 18:1475-1484.

## Optimizing the extraction condition of chlorophyll from Alfalfa and investigating its qualitative and quantitative properties in comparison to different plant resources

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

1. Department of Food Additives, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Mashhad, Iran  
(Received: 2016/07/04 Accepted: 2016/10/08)

Chlorophyll is one of the most important natural colorants with many applications in food industry. Two important parameters in the production of chlorophyll are including appropriate resource and method of extraction. Therefore, in this research, at first type of solvent and its concentration during extraction of chlorophyll from alfalfa were determined. Then, Central Composite Design with 6 repeats at the central point was employed to optimize the effect of solvent to solid ratio, temperature and time on the total chlorophyll and  $a^*$  value. The results indicated that ethanol 90% was the best solvent to extract the maximum yield of chlorophyll (295 mg/100 g d.m.). Moreover, a quadratic model with  $R^2=0.989$  was significant. The solvent to solid ratio was the most important parameter and time of extraction had not any significant effect on the yield. The maximum yield (318.5 mg/100 g d.m.) was obtained under temperature of 53.2 °C, time of 34.83 min and solvent to solid ratio 9.99 (ml/g). Finally, the yields of chlorophyll extraction from berry, mulberry, sugar beet leaves and grass were determined and the maximum yield was related to mulberry leaves (692 mg/100 g d.m.) and then, grass and sugar beet had 435 and 362 mg TCC/100 g d.m., respectively.

**Keywords:** Chlorophyll extraction, Alfalfa, Green plants, Yield,  $a^*$  value

---

\*Corresponding Author E-Mail Address: Saberian3742.hamed@gmail.com