

## بررسی تاثیر مقدار بنتونیت و pH عصاره بر میزان رنگ و شفافیت عصاره گیاه استویا ربودیانا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

روح الله احمدی گورجی<sup>1</sup>، یوسف حمید اوغلی<sup>2\*</sup>، بهمن شریف زاده<sup>3</sup>

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

2- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

3- استادیار، گروه مهندسی کامپیوتر و علوم مهندسی، دانشکده فنی و مهندسی شرق گیلان، دانشگاه گیلان، رودسر

(تاریخ دریافت: 98 /06/21 تاریخ پذیرش: 99/01/23)

### چکیده

به منظور بررسی اثر مقادیر مختلف بنتونیت و pH عصاره در هنگام تماس با بنتونیت بر میزان شفافیت عصاره گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، پژوهشی روی دو عامل به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا گردید. عامل اول، شامل مقادیر بنتونیت در چهار سطح با غلظت‌های، 0 (شاهد)، 10، 20 و 30 گرم در لیتر و عامل دوم، شامل pH های مختلف عصاره خام در پنج سطح با مقادیر 5/9 (شاهد)، 5/5، 4/5 و 4 بودند. نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار مقادیر مختلف بنتونیت اثر بسیار معنی داری بر میزان فنول، کارتنوئید، کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل و فلاونوئید عصاره‌ها دارد. همچنین بهترین سطح از بنتونیت با کمترین مقدار و بیشترین رنگزدایی، مقدار 20 گرم در لیتر با مقادیر فنول 0/07 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کارتنوئید 0/36 میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل a 1 میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل b 2/03، کلروفیل کل 3/04 میلی‌گرم در لیتر و در نهایت با مقدار فلاونوئید 2/69 میکروگرم در میلی‌لیتر جهت انجام آزمایش بعدی انتخاب گردید. pH عصاره برای بهبود عملکرد بنتونیت، بیانگر اثر معنی دار بر میزان فنول عصاره و اثر بسیار معنی داری بر بقیه صفات ذکر شده بود. بهترین سطح از pH عصاره با بیشترین رنگزدایی و توجه به سلامت بشر، pH (5) با مقادیر فنول 0/15 میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کارتنوئید 1/42 میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل a 0/77 میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل b 0/84 میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل کل 1/61 میلی‌گرم در لیتر و در نهایت فلاونوئید با مقدار 2/17 میکروگرم در میلی‌لیتر انتخاب گردید. بنابراین نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان با در نظر گرفتن مقادیر مناسب ترکیبات رنگ‌بری همچون بنتونیت (20 گرم در لیتر) در یک pH مناسب (5) عصاره خام، رنگ و شفافیت عصاره گیاه استویا را بهبود بخشید.

کلید واژگان: عصاره گیاه استویا ربودیانا، فنول، فلاونوئید، کلروفیل.

\*مسئول مکاتبات: hamidoghli@guilan.ac.ir

## 1- مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* گیاهی علفی و چندساله از خانواده Asteraceae گیاهی بومی مناطق شمالی آمریکای جنوبی، پاراگوئه و برزیل می‌باشد [1]. گیاه استویا هم به عنوان یک گیاه دارویی و هم یک گیاه اقتصادی از لحاظ صنعتی (به عنوان یک شیرین کننده طبیعی) مطرح است. شیرین بودن برگ‌های استویا به دلیل حضور دی‌ترپین‌ها، به ویژه استویول گلیکوزیدها است [2]. گلیکوزیدهای استویا تا 350 برابر شیرین تر از سوکروز هستند [3]. در بین گلیکوزیدهای قندی مختلف موجود در استویا، گلیکوزیدهای استویوزاید، ریبودیوزاید A و C دارای بیشترین مقادیر هستند [4]. گلیکوزیدهای قندی استویا در آب گرم 80 درجه سانتی‌گراد به راحتی قابل استخراج هستند. با توجه به بروز روزافزون مشکلاتی چون دیابت، چاقی، سکنه‌های قلبی و مغذی استویا می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای تغذیه نامطلوب و مشکلات ناشی از مصرف قند باشد [5]. استویا به دلیل وجود فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بالایی است [6]. با وجود این، اهمیت بالای استویا به دلیل وجود شیرینی طبیعی و بدون کالری در برگ‌های آن است [7]. صدها سال است که مردم در آمریکای جنوبی از عصاره استویا به عنوان شیرین کننده استفاده می‌کنند. شیرینی و خواص درمانی برگ‌های استویا، نظرات اقتصادی و علمی فراوانی را به این گیاه جلب کرده است [8].

عصاره حاصل از برگ‌های خشک گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) به دلیل وجود ترکیبات محلول، بسیار تیره می‌باشد [7] و همین امر سبب شده تا بسیاری از صنایع نتوانند به راحتی از آن استفاده کنند. به همین دلیل بسیاری از محققین به سمت راه‌حلهایی برای بهبود رنگ و شفافیت عصاره حاصل از استویا سوق پیدا کرده‌اند تا بتوان از عصاره این گیاه با ارزش، در بخش‌های دارویی و صنایع غذایی استفاده نمود. در این راستا در تحقیقات گوناگون روش‌هایی مطرح شده که در مواردی از آنها به سبب باقی ماندن حلال‌های آلی و یون‌های فلزی مصرف آنها برای سلامت انسان مضر اعلام شده است [9]. در بکارگیری غشاهای اولترافیلتراسیون و فناوری‌های پیشرفته از موادی با هزینه بالا استفاده می‌شود و به همان اندازه به

تکنولوژی‌های پرهزینه نیاز دارند [10]. استفاده از روش‌ها و ترکیباتی با تکنولوژی کم هزینه با در نظر گرفتن سلامتی انسان مورد توجه واقع شده است. جذب رنگ تیره توسط جذب‌ها فرایند با ارزشی است که بدون اضافه کردن حلال‌های سمی می‌توان به تولید یک عصاره شفاف دست یافت [7].

بتونیت به عنوان یک خاک رس معدنی، جاذبی قوی و کم هزینه می‌باشد که در بسیاری از نقاط جهان موجود است [11]. پیش تیمار بتونیت با آب به دلیل متورم شدن ذرات بتونیت سبب افزایش ظرفیت جذب می‌شود [12]. از بتونیت در تحقیقات گوناگونی در جهت رنگ‌بری عصاره استفاده شده است. در تحقیقی که روی شربت خرما انجام شد با استفاده از 25 گرم در لیتر از محلول 20 درصدی بتونیت به همراه ژلاتین در عصاره، تاثیر 40 درصدی در کاهش کدورت مشاهده شد [13]. همچنین از بتونیت در جهت شفاف سازی عصاره نیشکر نیز استفاده شده است [14]. می‌توان با بررسی پارامترهای تاثیرگذاری مانند pH عصاره با مقدار مناسب بتونیت، کارایی ماده مورد نظر را افزایش داد. به منظور بهینه‌سازی غلظت اسید در تماس با بتونیت (جهت فعال سازی بتونیت)، میزان اسیدیته سبب شفافیت روغن کلزا شد [15]. همچنین استفاده از بتونیت فعال شده با اسید در رنگبری روغن پالم بسیار موثر بود [16]. با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده، در این پژوهش علاوه بر استفاده از بتونیت فعال شده، تاثیر میزان pH عصاره نیز در افزایش عملکرد بتونیت مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین این پژوهش با بهره‌گیری از فرایندهای بعد از عصاره‌گیری، به منظور شفاف سازی عصاره استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) با هدف نهایی استفاده از آن در صنایع مختلف دارویی و غذایی انجام شده است.

## 2- مواد و روش‌ها

این پژوهش در پاییز سال 1397 در آزمایشگاه باغبانی و مرکزی دانشگاه گیلان انجام گردید. در اوایل تیرماه برگ‌های تازه گیاه استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) از مزرعه‌ای واقع در استان گیلان تهیه شد. و پس از خشک کردن درون کیسه پلاستیکی جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین بهترین سطح بتونیت، چهار سطح 0، 10، 20، 30

تعیین میزان مناسب pH، عصاره خام با استفاده از HCl با غلظت 6 درصد و پی اچ متر (Ultrabasic UB-10) به سطوح مختلف pH شامل 4، 4/5، 5، 5/5، 5/9 (شاهد) رسانده شد [10]، سپس سطح بهینه بنتونیت حاصل از مرحله قبل (20 گرم در لیتر) به آن اضافه گردید. در نهایت پس از مخلوط شدن ترکیب در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و زمان 20 دقیقه از کاغذ صافی عبور داده شد.

گرم در لیتر مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به شکل (1) از هر سطح از مقادیر بنتونیت فعال شده محلول 20 درصد تهیه گردید و برای چند ساعت استراحت داده شد و در نهایت به 1 لیتر عصاره خام اضافه شد و به مدت 20 دقیقه روی همزن مغناطیسی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید و در نهایت از کاغذ صافی واتمن شماره 42 عبور داده شد [17]. در مرحله بعد برای

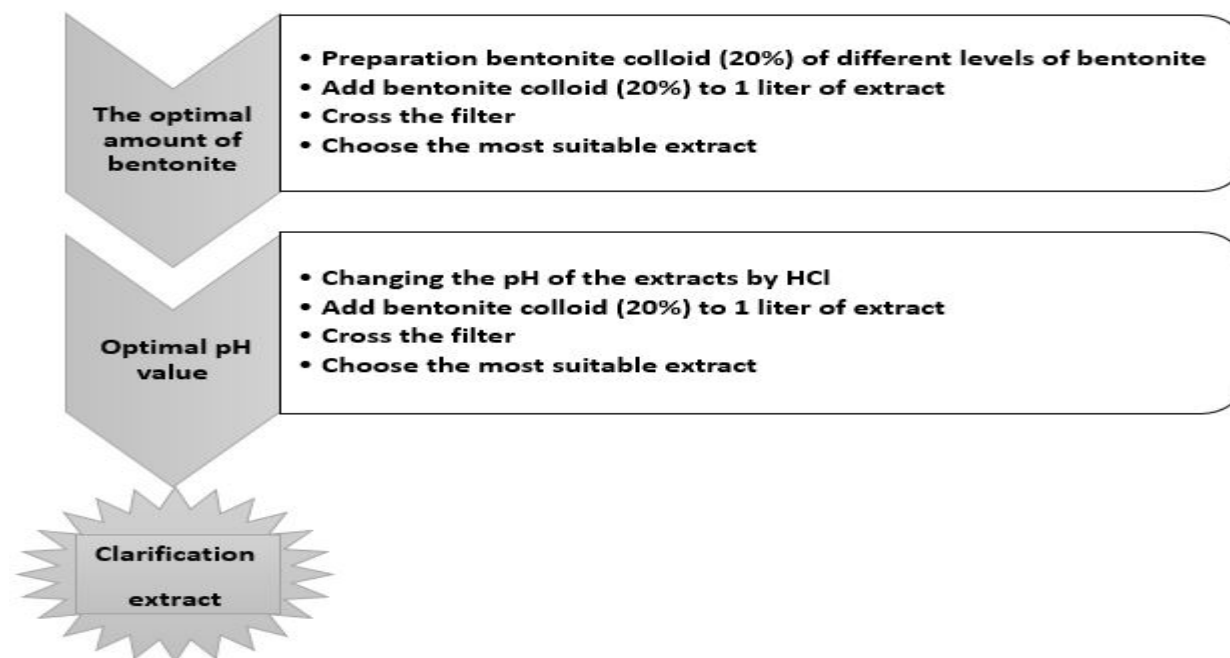


Fig 1 Overview of pre and post extraction steps to increase the clarification of Stevia extract

میزان کلروفیل A معادله (1) و B معادله (2) و کارتنوئید معادله (3) توسط روش ابو عرب و همکاران انجام شد [19]. در این روش 5 میلی لیتر عصاره استویا با 30 میلی لیتر استون 85 درصد در یک محفظه تیره مخلوط شده و به مدت 15 ساعت در دمای اتاق باقی مانده و سپس از کاغذ صافی عبور و درون یک فلاسک حجمی به وسیله استون 85 درصد به حجم 100 میلی لیتر رسانده شد. میزان جذب این مخلوط در 440، 644 و 662 نانومتر با استفاده از اسپکتروفومتر (مدل T80- UV/VIS Spectrometer + ساخت شرکت PG انگلستان) اندازه‌گیری گردید. استون 85 درصد به عنوان بلنک انتخاب گردید. محتویات کارتنوئیدها و کلروفیل‌ها با استفاده از معادلات (1، 2 و 3) محاسبه گردید.

$$(1) \text{ Chlorophyll A (mg/L)} = (9.784 \times \text{Abs}_{662}) - (0.99 \times \text{Abs}_{644})$$

## 2-1- اندازه گیری صفات فیزیولوژیکی

### 2-1-1- اندازه‌گیری فنول کل

اندازه‌گیری میزان فنول کل توسط روش فولین سیو کالتو اصلاح شده انجام گردید. در این روش 0/2 میلی لیتر عصاره خالص با 1 میلی لیتر معرف فولین 10 درصد مخلوط شد. در مرحله بعد 0/8 میلی لیتر سدیم کربنات 7/5 درصد به آن اضافه گردید (شکل 2-9)، در نهایت نمونه برای 10 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از سرد شدن در دمای اتاق جذب در 750 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفومتر (مدل T80- UV/VIS Spectrometer + ساخت شرکت PG انگلستان) خوانده شد. برای نمونه شاهد 0/2 میلی لیتر آب مقطر در نظر گرفته شد [18].

### 2-1-2- اندازه‌گیری کلروفیل A، B، کلروفیل کل و

کارتنوئید

میزان درصد شفافیت با خواندن جذب نوری 670 نانومتر قبل و بعد از عملیات تصفیه جهت اندازه گیری کدورت توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل T80- UV/VIS Spectrometer) ساخت شرکت PG انگلستان) و قرار دادن میزان جذب در معادله (4) محاسبه گردید [21].

$$\% \text{ clarification} = \left( 1 - \frac{(A_{670})_{\text{after}}}{(A_{670})_{\text{before}}} \right) \times 100$$

**Equation 4** Percent of extract clarification

## 2-2- محاسبات آماری

آزمایش به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار و به صورت جداگانه برای هر عامل منظور گردید (جدول 1). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (Version 9) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین با توجه به داشتن تیمارهای سطوح مختلف برای هر عامل (بنتونیت و pH) از آزمون توکی (اختلاف معنی دار قابل اعتماد) در سطح احتمال یک درصد استفاده گردید و رسم جداول و نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید.

$$(2) \text{ Chlorophyll B (mg/L)} = (21.426 \times \text{Abs}_{644}) - (4.65 \times \text{Abs}_{662})$$

$$(3) \text{ Total carotenoids (mg/L)} = (4.695 \times \text{Abs}_{440}) - 0.369 (\text{chl. A} + \text{chl. B})$$

**Equations, 1 Chlorophyll A, 2 Chlorophyll B, 3 Total carotenoids**

## 3-1-2- اندازه گیری فلاونوئید

فلاونوئید کل توسط روش شرح داده توسط دوانتو و همکاران اندازه گیری گردید [20]. در این روش 0/25 میلی لیتر عصاره با 1/25 میلی لیتر آب مقطر درلوله آزمایش مخلوط گردید پس از اضافه کردن 75 میکرولیتر محلول نیتريت سدیم 5 درصد مولار بعد از 6 دقیقه 150 میکرولیتر کلرید آلومینیوم 10 درصد مولار اضافه و بعد از 5 دقیقه 500 میکرولیتر هیدروکسید سدیم 1 مولار به ترکیبات اضافه گردید. و در نهایت توسط آب مقطر به حجم 2/5 میلی لیتر رسانده شد و جذب توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل T80- UV/VIS Spectrometer) ساخت شرکت PG انگلستان) در طول موج 510 نانومتر خوانده شد.

## 4-1-2- درصد شفافیت

**Table 1** Different levels of experimental treatments to improve clarification of Stevia extract

Experimental treatments		Replication
pH of crowd extracts	Bentonite concentration (g/l)	
4	0*	4
4.5	10	
5	20	
5.5	30	
5.9*		
4		

\*: Control

استفاده از pH در سطح 4/5 و 5 را نشان می‌دهد. مقدار فنول کل در تیمارهای استفاده از pH در سطح 4/5 و 5 با میانگین 0/15 میلی گرم در میلی لیتر و در تیمار شاهد 5/9 با 0/17 میلی گرم در میلی لیتر مشاهده می‌گردد. جذب فنولها توسط بنتونیت احتمالاً به دلیل در دسترس بودن محل‌های جذب فعال بر روی بنتونیت است [22]. بر اساس گزارش‌های لاکسامدانا سان و همکاران (2012) و نایاک و سینق (2007) میزان جذب فنول توسط بنتونیت با افزایش مقدار pH محلول به دلیل کاهش یونیزاسیون کاهش می‌یابد [14] [23].

## 3- نتایج و بحث

### 3-1- فنول کل

نتایج مقایسه میانگین مقادیر مختلف بنتونیت بر شاخص فنول کل در جدول (4)، تفاوت بسیار معنی دار سطوح مختلف بنتونیت با شاهد را نشان می‌دهد. البته سطوح مختلف استفاده از بنتونیت (10 تا 30 گرم در لیتر) در کاهش میزان فنول کل با هم اختلاف بسیار معنی داری باهم نداشتند. نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف pH جدول (5)، کمترین میزان فنول کل مربوط به

**2-3- کارتنوئید**

نشان می‌دهد، در سطح 4/5 کمترین مقدار کارتنوئید با میانگین 0/83 میلی‌گرم در لیتر و بیشترین مقدار کارتنوئید مربوط به تیمار 4 با میانگین 1/61 میلی‌گرم در لیتر است. هنوز مکانیسم جذب کاروتن و کاروتنوئید روی بتونیت مشخص نیست [24]. اما می‌توان با تغییراتی در pH عصاره جهت ارتقاء در حذف کارتنوئید بهره جست. این کار با ایجاد بار مثبت در سطح بتونیت [25] و قطبیت‌پذیری زیاد پیوندهای دوگانه [26] سبب جذب کارتنوئیدها می‌شود.

نتایج مقایسه میانگین تاثیر مقادیر مختلف بتونیت بر مقدار کارتنوئید در جدول (4)، تفاوت بسیار معنی‌داری تا سطح 10 گرم در لیتر با شاهد نشان نمی‌دهد اما از سطح 20 گرم در لیتر ما کاهش بسیار معنی‌دار کارتنوئید را مشاهده می‌کنیم. سطح 20 گرم در لیتر نشان دهنده کمترین مقدار کارتنوئید با میانگین 0/36 میلی‌گرم در لیتر در مقابل، بیشترین مقدار کارتنوئید مربوط به تیمار شاهد (0 گرم در لیتر) با میانگین 0/73 میلی‌گرم در لیتر است. نتایج مقایسه میانگین pH بر مقدار کارتنوئید جدول (5)

**Table 2** Results of analysis of variance characteristics studied in *Stevia rebaudiana* Bertoni

Clarification	Flavenooids	Total chlorophyll	Chlorophyll b	MS			DF	SOV
				Chlorophyll a	Cartenooids	Phenol		
128.48*	1.25**	40.11**	3.64**	28.49**	0.14**	0.00**	3	Bentonite(T)
14.69	0.02	0.07	0.05	0.03	0.00	0.00	12	Error
5.04	5.45	5.42	9.08	7.50	5.75	11.39	-	C.V (%)

\*\* , \* : Significantly difference at 1% and 5% probability levels, respectively.

**Table 3** Results of analysis of variance characteristics studied in *Stevia rebaudiana* Bertoni

Clarification	Flavenooids	Total chlorophyll	Chlorophyll b	MS			DF	SOV
				Chlorophyll a	Cartenooids	Phenol		
41.81 <sup>ns</sup>	0.17**	4.92**	1.55**	0.95**	0.33**	0.00*	4	pH
45.64	0.03	0.04	0.01	0.02	0.00	0.00	15	Error
8.55	8.05	7.03	7.81	11.30	6.17	5.11	-	C.V (%)

\*\* , \*, ns: Significantly difference at 1% and 5% probability levels and non-significant, respectively.

**3-3- کلروفیل a**

میلی‌گرم در لیتر و بیشترین میزان آن در تیمار شاهد (5/9) با میانگین 2/05 میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید. تیمار عصاره با بتونیت ظرفیت بالایی در جذب کلروفیل دارد [27]. در پژوهشی که توسط گونزالیز و همکاران (1994) بر روی جذب کلروفیل a از محلول استون توسط بتونیت تیمار شده با اسید انجام گردید نشان داد که تیمار عصاره با بتونیت فعال شده با اسید به دلیل تمایل روزافزون نقاط فعال در سطح جاذب اثر مثبتی در کاهش کلروفیل a دارد و نتایج مشابهی را ارائه داد [28].

نتایج مقایسه میانگین تاثیر مقادیر مختلف بتونیت بر مقدار کلروفیل a جدول (4) نشان دهنده اختلاف بسیار معنی‌دار بین شاهد و سطوح مختلف بتونیت به کار برده شده است. البته تفاوت بسیار معنی‌داری بین سطوح مختلف بتونیت در کاهش میزان کلروفیل a مشاهده نمی‌شود. همچنین نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف pH جدول (5) نشان داد که کمترین میزان کلروفیل a مربوط به استفاده از pH در سطح 5 می‌باشد. مقدار کلروفیل a در تیمار استفاده از pH در سطح 5 با میانگین 0/77

**3-4- کلروفیل b**

کلروفیل می‌گردد که دلیل آن افزایش سطح و سایت‌های فعال جذب می‌باشد [27]. به نظر می‌رسد کاهش جذب کلروفیل کل با افزایش مقدار بتونیت به دو دلیل باشد. اولاً با افزایش غلظت بتونیت به دلیل اتصال ذرات بتونیت به هم سطح جذب کاهش می‌یابد و ثانياً افزایش غلظت بتونیت در حجمی ت از کلروفیل کل سبب افزایش مکان‌های فعال غیراشباع روی جذب می‌شود [30]. در پژوهشی دیگر که توسط آچاری و همکاران (2016) بر روی رنگ‌زدایی روغن انجام گردید نتایج مشابهی را گزارش نمودند در این پژوهش بتونیت‌های تیمار شده با اسید سبب کاهش میزان کلروفیل کل در مقایسه با بتونیت بدون تیمار با اسید گردید [31]. به دلیل این که فعالیت فیزیکی و شیمیایی موجود در سطح خاک رس به ویژه با استفاده از اسید افزایش می‌یابد [32] [33].

**3-6- فلاونوئید**

نتایج مقایسه میانگین تاثیر مقادیر مختلف بتونیت بر شاخص مقدار فلاونوئید جدول (4)، اختلاف بسیار معنی‌داری را تا سطح 10 گرم در لیتر با شاهد نشان نمی‌دهد ولی افزایش در مقدار بتونیت از 20 گرم در لیتر سبب کاهش بسیار معنی‌دار میزان فلاونوئید می‌گردد. نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف pH جدول (5) نشان داد که کمترین مقدار فلاونوئید در تیمار استفاده از pH در سطح 5 با میانگین 2/17 میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشترین مقدار در تیمار سطح 4 با 2/61 میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. گوکمن و همکاران (2001) نتایج مشابهی را در مورد کاهش مقدار فلاونوئیدها به عنوان یکی از عوامل کدورت عصاره در آب سیب بعد از تیمار با بتونیت گزارش نمودند [34]. با افزایش مقدار بتونیت در pH بهینه مقدار جذب آن با توجه به افزایش سطح جذب افزایش یافته است. بتونیت تیمار نشده با اسید دارای یک ورق نازک معمولی و تیغه‌ای در سطح خود است ولی پس از تیمار با اسید، سطح بتونیت کرکی و متخلخل تر می‌شود، که سبب افزایش سطح جذب می‌گردد [16].

نتایج مقایسه میانگین تاثیر مقادیر مختلف بتونیت بر شاخص کلروفیل b جدول (4)، اختلاف بسیار معنی‌داری را تا سطح 10 گرم در لیتر با شاهد نشان نمی‌دهد، از سطح 20 گرم در لیتر این اختلاف با شاهد مشهود است. نتایج جدول مقایسه میانگین سطوح مختلف pH جدول (5) نشان می‌دهد که کمترین مقدار کلروفیل b در تیمار استفاده از pH در سطح 5 با میانگین 0/84 میلی‌گرم در لیتر و بیشترین میزان در تیمار شاهد (5/9) با میانگین 2/16 میلی‌گرم در لیتر است. در صنایع از بتونیت‌های فعال جهت جذب کلروفیل‌ها از روغن استفاده می‌شود [15]. تیمار بتونیت با اسید علاوه بر شستشوی کاتیون‌ها از ورق‌های هشت ضلعی، ناخالصی‌هایی مانند کلسیت را حل می‌کند و کاتیون‌های قابل تعویض را با یون‌های هیدروژن جایگزین می‌کند و از سوی دیگر سبب متخلخل شدن لایه‌های بتونیت می‌گردد که همه این تغییرات سبب افزایش سطح و قطر منافذ ذرات بتونیت می‌گردد [29].

**3-5- کلروفیل کل**

نتایج مقایسه میانگین مقادیر مختلف بتونیت بر شاخص مقدار کلروفیل کل جدول (4) اختلاف بسیار معنی‌دار بین سطوح مختلف کاربرد بتونیت با شاهد را نشان می‌دهد. از 10 تا 20 گرم ما کاهش کلروفیل کل را مشاهده می‌کنیم اما استفاده مقدار 30 گرم در لیتر بتونیت اختلاف بسیار معنی‌داری با مقدار 20 گرم در لیتر نشان نمی‌دهد. نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف pH جدول (5) نشان داد که کمترین مقدار کلروفیل کل در تیمار استفاده از pH در سطح 5 با میانگین 1/61 میلی‌گرم در لیتر و در تیمار شاهد (5/9) با مقدار 4/22 میلی‌گرم در لیتر است. تیمار عصاره با بتونیت ظرفیت بالایی در جذب کلروفیل دارد، در پژوهشی که توسط چن و همکاران (2012) بر روی عصاره بافت برنج انجام گردید نتایج مشابهی را نشان داد که افزایش در مقدار استفاده از بتونیت در عصاره بافت برنج سبب کاهش میزان

**Table 4** Mean comparison effect of different concentrations of bentonite on the quantitative properties of Stevia extract

Flavonoids (µg/ml)	Total Chlorophyll (mg/l)	Chlorophyll b (mg/l)	Chlorophyll a (mg/l)	Carotenoids (mg/l)	Phenol (mg/ml)	Bentonite (g/l)
3.34±0.08 <sup>a</sup>	9.53±0.33 <sup>a</sup>	3.74±0.24 <sup>a</sup>	6.45±0.25 <sup>a</sup>	0.73±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>	0
3.17±0.10 <sup>a</sup>	4.51±0.30 <sup>b</sup>	3.10±0.20 <sup>a</sup>	1.40±0.10 <sup>b</sup>	0.66±0.04 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>b</sup>	10
2.69±0.13 <sup>b</sup>	3.04±0.14 <sup>c</sup>	2.03±0.03 <sup>b</sup>	1±0.11 <sup>b</sup>	0.36±0.03 <sup>b</sup>	0.07±0.0 <sup>b</sup>	20
2.10±0.24 <sup>c</sup>	2.66±0.23 <sup>c</sup>	1.67±0.35 <sup>b</sup>	0.98±0.21 <sup>b</sup>	0.38±0.01 <sup>b</sup>	0.08±0.0 <sup>b</sup>	30

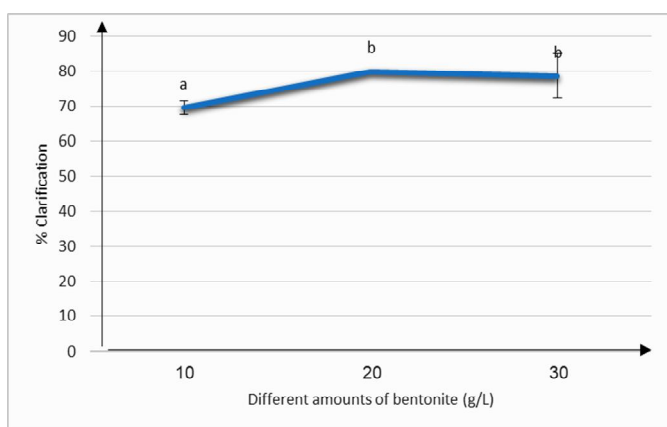
Comparison of the average effect of different amounts of bentonite on total phenol content. There is no significant difference between 1% or 5% probability level using Tukey test. The top lines of the graph represent the Means ± SD.

**Table 5** Mean comparison effect of different pH of extract on quantitative traits of Stevia extract

Flavonoids (µg/ml)	Total Chlorophyll (mg/l)	Chlorophyll b (mg/l)	Chlorophyll a (mg/l)	Carotenoids (mg/l)	Phenol (mg/ml)	pH extract
2.61±0.14 <sup>a</sup>	1.99±0.25 <sup>c</sup>	0.97±0.11 <sup>bc</sup>	1.01±0.14 <sup>cd</sup>	1.61±0.06 <sup>a</sup>	0.16±0.00 <sup>ab</sup>	4
2.34±0.07 <sup>ab</sup>	3.73±0.31 <sup>a</sup>	2.13±0.34 <sup>a</sup>	1.37±0.22 <sup>bc</sup>	0.83±0.04 <sup>c</sup>	0.15±0.01 <sup>b</sup>	4.5
2.17±0.17 <sup>b</sup>	1.61±0.14 <sup>c</sup>	0.84±0.08 <sup>c</sup>	0.77±0.17 <sup>d</sup>	1.42±0.07 <sup>ab</sup>	0.15±0.00 <sup>b</sup>	5
2.20±0.31 <sup>ab</sup>	2.89±0.10 <sup>b</sup>	1.44±0.06 <sup>b</sup>	1.44±0.07 <sup>b</sup>	1.38±0.07 <sup>b</sup>	0.16±0.00 <sup>ab</sup>	5.5
2.59±0.16 <sup>ab</sup>	4.22±0.09 <sup>a</sup>	2.16±0.12 <sup>a</sup>	2.05±0.06 <sup>a</sup>	1.32±0.12 <sup>b</sup>	0.17±0.00 <sup>a</sup>	5.9

Comparison of the average effect of different amounts of bentonite on total phenol content. There is no significant difference between 1% or 5% probability level using Tukey test. The top lines of the graph represent the Means ± SD.

همکاران (2001) نتایج مشابهی را در مورد افزایش شفافیت عصاره در عصاره‌های تیمار شده با بنتونیت گزارش دادند [27]. لاکسامدانا سان و همکاران (2012) نیز نتایج مشابهی را در مورد کاهش میزان شفافیت با افزایش مقدار بنتونیت گزارش نمودند [14].

**Fig 2** Effect of different amounts of bentonite on the clarification of *Stevia rebaudiana* extract

### 3-7- درصد شفافیت

نتایج جدول (2) تفاوت معنی داری را بین سطوح مختلف بنتونیت با هم را نشان می‌دهد. با توجه به شکل (2) افزایش میزان بنتونیت تا 20 گرم در لیتر ما شاهد بهبود قابل توجه در شفافیت عصاره هستیم. کاربرد مواد رنگ‌بری همانند بنتونیت می‌تواند در شفافیت عصاره تا 79 درصد موثر واقع شود که با تغییرات پارامترهای تاثیرگذاری مانند pH می‌توان میزان شفافیت را تا 82 درصد افزایش داد. در بین مقادیر مختلف کاربرد بنتونیت مقدار 20 گرم در لیتر عصاره با میزان تاثیر شفافیت عصاره 79/94 درصد دارای بیشترین مقدار بود. همچنین کمترین میزان شفافیت عصاره نیز مربوط به تماس 10 گرم در لیتر عصاره با میزان شفافیت 69/55 درصد بود. البته افزایش بیش از 20 گرم در میزان بنتونیت تاثیر منفی روی شفافیت عصاره داشته است. در بین سطوح مختلف pH نیز بیشترین مقدار تاثیر در شفافیت مربوط به اسیدیته 4 و 5 که به ترتیب به میزان 82/55 و 82/43 درصد بود. و کمترین میزان تاثیر در شفافیت مربوط به اسیدیته 4/5 و 5/9 (شاهد) که به ترتیب با مقادیر 76/01 و 76/68 درصد بود. چن و

#### 4- نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار 20 گرم در لیتر بتونیت در pH عصاره 5 سبب بهبود در شفافیت عصاره استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) تا 82 درصد می-گردد. البته در انتخاب سطح مناسب از بتونیت علاوه بر توجه به خصوصیت رنگزدایی سعی شده که کمترین سطح از بتونیت که دارای بیشترین کارایی در شفافیت عصاره باشد به کار گرفته شود تا دارای توجیه اقتصادی باشد. همچنین در انتخاب سطح مناسب pH به سلامت جامعه توجه شده است. تیمار سطح 20 گرم در لیتر بتونیت باعث بهبود کل صفات شامل: فنول کل، کارتونئید، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و فلاونوئید گردید. البته در نظر گرفتن pH عصاره در کارایی بیشتر سطح بهینه بتونیت چشمگیر بود. با نتایج به دست آمده توصیه می-گردد، با کاربرد سطح مناسب بتونیت (20 گرم در لیتر) به عنوان یک جاذب سطحی ارزان و تنظیم pH مناسب (5) عصاره، سبب افزایش کیفیت رنگ و شفافیت عصاره گردیم.

#### 5- منابع

- [1] Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A. & Escriche, I. (2015). Influence of extraction methods on the yield of steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*. 70(2), 119–127.
- [2] Lemus-Moncada, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Journal of Food Chemistry*. 132(3), 1121- 1132.
- [3] Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L. & Vilarem, G. (2015). Response surface methodology to optimize accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*. 166, 561–567.
- [4] Reis, M. H. M., Da Silva, F. V., Andrade, C. M. G., Rezende, S. L., Wolf Maciel, M. R. & Bergamasco, R. (2007). Clarification and purification of aqueous stevia extract using membrane separation process. *Journal of Food Process Engineering*. 32(3), 338–354.
- [5] Sardesai, V. M. & Waldshan, T. H. (1991). Natural and synthetic intense sweeteners. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2(5), 236-244.
- [6] Muanda, F., Soulimani, R., Diop, B. & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Journal of Food Science and Technology*. 44(9), 1865–1872.
- [7] Arakawa, F. S., Mahl, C. R. A. M., De Oliveira S. P. D., Da Igreja, G., Simões M. R. & Da Silva C. F. (2012). Clarification of aqueous stevia extract using alginate beads evaluation by factorial design methodology. *Journal of Adsorption Science & Technology*. 30(2), 147-158.
- [8] Chatsudthipong, V. & Muanprasat. C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 121(1), 41–54.
- [9] Silva, F. V., Bergamasco, R., Andrade, C. M. G. Pinheiro, N., Machado, N. R. C. F., Reis, M. H. M., Araújo, A. & Rezende, S. L. (2007). Purification process of stevioside using zeolites and membranes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5(1).
- [10] Moraes, E. & Machado, N. R. (2001). Clarification of *Stevia rebaudiana* (Bert.) extract by adsorption in modified zeolites. *Journal of Acta Scientiarum*. 23(6), 1375-1380.
- [11] Banat, F. A., Al-Bashir, B., Al-Asheh, S., Hayajneh, O. (2000). Adsorption of phenol by bentonite. *Environmental Pollution*. 107(3), 391-398.
- [12] Dik, T., Ozilgen, M. (1994). Rheological behaviour of bentonite-apple juice dispersions. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*. 27(1), 55-58.
- [13] Shafiee, S., Loghmani, V., Sharifan, A., Hojjatolslami, M. (2015). Comparison of the new method in purification and decolorization of date juice with the commercial technique. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 6(6), 411-417.
- [14] Laksameethanasan, P., Somla, N., Janprem, S. & Phochuen, N. (2012). Clarification of sugarcane juice for syrup production. *Journal of Procedia Engineering*. 32, 141 – 147.
- [15] Makhoukhi, B., Didi, M. A., Villemin, D. & Azzouz, A. (2009). Acid activation of Bentonite for use as a vegetable oil bleaching agent. *Journal of GRASAS Y ACEITES*. 60(4), 43-



- adsorbed on silica gel. Canadian Journal of Chemistry. 62(7), 1279-1286.
- [26] Bauer R. K., De Mayo P., Ware W.R. & Wu K.C. (1982). Surface photochemistry: The photophysics of pyrene adsorbed on silica gel, alumina, and calcium fluoride. The Journal of Physical Chemistry. 86, 3781-3789.
- [27] Chen, Z., Liu, J., Zeng, M., Wang, Z., Yu, D., Yin, C., Jin, L., Yang, S. & Baoan, S. (2012). Dot immunobinding assay method with chlorophyll removal for the detection of southern rice black-streaked dwarf virus. Journal of Molecules. 17(6), 6886-6900.
- [28] Gonzalez, P. E., Villafranca S. M, Socias V. M. & Gallego, C. A. (1994). Adsorption of chlorophyll-a from acetone solution on natural and activated bentonite. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 61(2), 175-178.
- [29] Valenzuela-Diaz, F. R, Souza-Santos, P. (2001). Studies on the acid activation of Brazilian smectite clays. Química Nova. 24, 345-353.
- [30] Huang, Y., Ma, X., Liang, G. & Yan, H. (2008). Adsorption of phenol with modified rectorite from aqueous solution, Chemical Engineering Journal. 141(1-3), 1-8.
- [31] Achary A. A., Liang, J., Hydamaka, A., Eskin, N. A. M., Thiyam-Holländer, U. (2016). A new ultrasound-assisted bleaching technique for impacting chlorophyll content of coldpressed hempseed oil. LWT - Food Sci Technol. 72, 439-46.
- [32] Srasra, E., Bergaya, F., Van Damme, H. & Ariguib, N. K. (1989). Surface properties of an activated bentonite-decolorisation of rape-seed-oils. Applied Clay Science. 4, 41 1-21.
- [33] Gonzalez, F., Pesquera, C., Blanco, C., Benito, J., Mendioroz, S. & Pajares, J. A. (1989). Structural and textural evolution of Al- and Mg-rich palygorskites. I. Under acid treatment. Applied Clay Science. 4, 373-88.
- [34] Gökmen, V., Artık, N., Acar, J., Kahraman, N. & Poyrazog˘lu, E. (2001). Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. European Food Research and Technology. 213(3), 194-199.
- 349.
- [16] Meesuk, L. & Vorasith, N. (2006). The use of bentonite to remove dark colour in repeatedly used palm oil. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 41(6), 1189-1200.
- [17] Farmani, B., Haddad Khodparast, M., Hesari, J., Rezaei, A. (2005). Purification of raw sugar cane syrup with bentonite 1- Determination of optimum amount of bentonite and pH. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2 (4), 1- 9.
- [18] Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, M .R. (1999). [14] Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Journal of Methods in Enzymology. 299, 152-178.
- [19] Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A. & Abu-Salem, M.F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science. 4(5), 269- 281.
- [20] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K. & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional val of tomatoes by increasing total antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 3010-3014.
- [21] FUH, W. S. & CHIANG, B. H. (1990) Purification of stevioside by membrane and ion exchange processes, Journal of Food Science. 55(5), 1454-1457
- [22] Srivastava, V.C., Swamy, M. M., Mall, I.D., Prasad B. & Mishra I.M. (2006). Adsorptive removal of phenol by bagasse fly ash and activated carbon: equilibrium, kinetics and thermodynamics. Colloids and Surfaces A. 272(1-2), 89 -104.
- [23] Nayak P. S. & Singh B. K. (2007). Removal of phenol from aqueous solutions by sorption on low cost clay. Desalination. 207(1-3), 71-79.
- [24] Haque Khan, I., Fareha, T. & Salman, I. (2014). Utilization of locally available bentonites for water purification by activation. Journal of Comsats. 20(1), 67-74.
- [25] Bauer, R. K., De Mayo, P., Natarajan, L. U. & Ware W. R. (1984). Surface photochemistry: the effect of surface modification on the photophysics of naphthalene and pyrene

## Effect of amount of bentonite and pH level on color and clarification of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) extracts.

Ahmadi Goragi, R. <sup>1</sup>, Hamidoghli, Y. <sup>2\*</sup>, Sharifzadeh, B. <sup>3</sup>

1. M. Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant Professor. Department of Computer Engineering and Engineering Science, Faculty of Engineering - East Guilan, University of Guilan, Roodsar, Iran

(Received: 2019/09/12 Accepted: 2020/04/11)

In order to investigate the effect of different levels of bentonite and pH of the extract on exposure to bentonite on the healing rate of stevia extract (*Stevia rebaudiana* Bertoni), a study was conducted on two factors in a completely randomized design with four replications. The first factor contains bentonite in four levels with concentrations of 0 (control), 10, 20 and 30 g / l and the second factor contains different pH of crude extract in five levels with 5.9 (control), they were 5.5, 5, 4.5 and 4, respectively. The results of analysis of variance showed that treatment with different amounts of bentonite had a significant effect on phenol, carotenoid, chlorophyll a, chlorophyll b and chlorophyll and flavonoid extracts. Also the best level of bentonite with the least amount and maximum clarification was 20 g / l with 0.07 mg / ml phenol, 0.36 mg / l carotenoid, chlorophyll a 1 mg / l, Chlorophyll b.03, Chlorophyll 3.03 mg / l and flavonoid content of 2.69 µg / ml were selected for subsequent experiment. The pH of the extract showed a significant effect on the phenol content of the extract and a significant effect on other traits. The best level of pH of the extract with the highest clarification and attention to human health, pH (5) with 0.15 mg/ml phenol, 1.42 mg / l carotenoid, 0.77 mg chlorophyll a Chlorophyll b 0.84 mg/l, chlorophyll b 1.61 mg / l and flavonoid with 2.17 µg / ml were selected. Therefore, the results of this study show that by considering appropriate amounts of dye compounds such as bentonite (20 g / l) at a suitable pH (5), the crude extract, color and transparency of stevia extract can be improved.

**Keywords:** Stevia rebaudiana extract, Phenol, Flavonoid, Chlorophyll.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: hamidoghli@guilan.ac.ir