بهینه یابی استخراج رنگدانه های کاروتنوئیدی میوه خرمالو (Diospyros kaki L.)

غزاله ثابتی صتعت[1]، اسماعیل عطای صالحی[2*]، شادی بلوریان[3]

١- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی ، قوچان، ایران

٢- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی ، قوچان، ایران

٣- استادیارگروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ٩٤/١١/٠٤ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٤/٠٥)

چکیده

رنگ به عنوان مهمترین ویژگی ظاهری نقش مهمی درپذیرش مواد غذایی دارد. به دلیل مضرات بالقوه رنگهای مصنوعی کاربرد آنها در صنعت غذا محدود شده است وگرایش به سمت استفاده از رنگهای طبیعی است. برهمین اساس درتحقیق حاضر فرایند استخراج کاروتنوئیدهای میوه خرمالو با استفاده حلالهای اتانول، ان- هگزان ومخلوط آنها در دمای محیط و نقطه جوش حلالها و در سه زمان ٢ و ٤ و ٦ ساعت بهینه یابی شد. ارزیابی جذب نور تیمارهای مختلف پس از استخراج اولیه نشان داد که بیشترین شدت جذب مربوط به حلال اتانول در دمای جوش پس از ٦ ساعت بود. جهت تعیین بهترین نسبت نمونه به حلال، از حجمهای ٥٠ ،١٠٠، ٢٠٠، ٣٠٠، ٤٠٠ میلی لیتر از حلال استفاده شد، نتایج نشان دادند که تیمار استخراج درحجم ٤٠٠ میلی لیتر از حلال بیشترین راندمان استخراج ($p>0/05$) را دارا بود و همچنین اختلاف معنی داری با سایرنسبت ها پس از ٦ ساعت در دمای جوش حلال داشت. پس از استخراج، حلال نمونه بهینه توسط دستگاه روتاری حذف و باقی مانده توسط خشک کن انجمادی به صورت پودر درآمد. راندمان استخراج پودررنگی ازمیوه خرمالو ١٠/٨٥ درصد وزنی / وزنی ازکل میوه خرمالو بود .

کلید واژگان: استخراج ، خرمالو، رنگدانه، کاروتنوئید

*مسئول مکاتبات: eatayesalehi@yahoo.com

۱- مقدمه

در دهه های اخیر تمایل برای مصرف ترکیبات طبیعی و زیست فعال مانند کاروتنوئیدها افزایش یافته است. کاروتنوئیدها، به دلیل ویژگی های رنگ زایی در صنایع غذایی و آرایشی کاربرد زیادی دارند، همچنین به منظور جلوگیری از بیماری های مختلفی مانند سرطان، بیماری های مربوط به سن، آب مروارید، بیماری های قلبی و عروقی و سایر بیماری های وابسته به عملکرد ضعیف سیستم ایمنی بدن در صنایع دارویی استفاده می شود[۱]. کاروتنوئیدها به واسطه داشتن پیوندهای دوگانه مزدوج متعدد توانایی آنتی اکسیدانی زیادی دارند. آنتی اکسیدانها به خاطر توانایی واکنش با رادیکالهای آزاد قادر به جلوگیری از اثر این رادیکالهای مخرب بر بیوملکولها می باشند و می توانند از پدید آمدن بیماریها جلوگیری کنند [۲و۳] .

کاروتنوئیدها رنگ دانه های محلول در چربی هستند که بطور عمده در گیاهان ، جلبکها ، باکتریهای فتوسنتز کننده یافت می شوند. جانوران قادربه سنتز کاروتنوئیدها نیستند، و کاروتنوئیدها را از طریق رژیم غذایی خود دریافت می کنند. رنگ کاروتنوئیدها (قرمز، زرد یا نارنجی) ناشی از حضور یک سیستم از پیوند های مضاعف کنژوگه می باشد. هرچه تعداد این نوع پیوند در مولکول بیشتر باشد باندهای جذب اصلی به ناحیه ای با طول موج بیشتر انتقال یافته در نتیجه رنگ قرمزتر می شود [٤].

کاروتنوئیدها بر اساس وجود حلقه بتا و تعداد آن در ساختمان شان به سه گروه بی حلقه مثل لیکوپن، تک حلقه مثل گاما کاروتن و دوحلقه ای مثل بتا کاروتن تقسیم می شوند [٥]. بتا کاروتن، آلفا کاروتن، لوتئین، زئازانتین، بتاکریپتوزانتین و لیکوپن بیشترین مقدار کاروتنوئیدها در رژیم غذایی انسان را تشکیل می دهند و ۸۰ تا ۹۰ درصد این ترکیبات از میوه ها و سبزیجات تأمین می شود [٦]. از متداول ترین روش های استخراج کاروتنوئیدها استفاده از ترکیب حلال های مختلف می باشد. قطبیت رنگدانه عامل بسیار مهمی در تعیین حلال استخراج می‌باشد. چنانچه این فاکتور مشخص نباشد، مخلوطی از استون/هگزان (نسبت ۱:۱ حجمی/حجمی) مورد استفاده قرار می‌گیرد. معمولاً حلال های غیر قطبی مانند هگزان یا تترا هیدروفوران، گزینه های مناسبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیر قطبی (کاروتن ها) یا کاروتنوئیدهای استری شده می باشند، در حالی که حلال های قطبی مانند اتانول برای استخراج کاروتنوئیدهای قطبی (گزانتوفیل ها) مطلوب تر است ولی حلال‌های غیر قطبی مانند هگزان باعث کریستالیزاسیون می‌گردد [۱] .

از جمله منابع غنی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌توان به میوه خرمالو اشاره کرد. خرمالو با نام علمی .Diospyros kaki L از خانواده Ebenaceae بوده و در مناطق گسترده ای مانند کشورهای آسیایی و اسپانیا کاشت می شود. میوه خرمالو حاوی مقادیر زیادی ترکیبات زیست فعال مانند پلی فنول ها، کاروتنوئیدها، فیبر رژیمی و مواد معدنی می باشد. برای مثال ۱۰۰ گرم میوه خرمالو حاوی ۷۰ میلی گرم ویتامین C است در حالی که همان مقدار سیب حاوی ٤ میلی گرم ویتامین C می‌باشد[۷]. خرمالو بطور سنتی دارای مصارف دارویی مانند کاهنده فشار خون، اثر ضد سرفه و مدر می‌باشد[۸].

رنگ زرد تا نارنجی میوه رسیده خرمالو ناشی از حضور رنگدانه‌های کاروتنوئید می‌باشد. برای اولین بار Karrer و همکاران (۱۹۳۲) رنگدانه‌های موجود در میوه رسیده خرمالوی ژاپنی را مورد ارزیابی قرار دادند و لیکوپن، زئازانتین و دیگر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی را در آن تشخیص دادند[۹]. همچنین نتایج نشان داده‌اند که زئازانتین و در رتبه دوم کریپتوزانتین بیشترین درصد رنگدانه‌ها را تشکیل می‌دهند[۱۰]. تحقیق دیگری که توسط Ebert و Gross (۱۹۸۵) انجام گرفت نشان داد که در میوه کاملاً رسیده خرمالو زئازانتین، لیکوپن و آنترازانتین به ترتیب بیشترین مقدار رنگدانه‌های کاروتنوئیدی را تشکیل می‌دهند [۱۱].

تحقیقی توسط الهام خانی پور و همکاران (۱۳۸٦) در زمینه تعیین شرایط بهینه استخراج کارتنوئیدهای گوجه فرنگی انجام گرفت که در این تحقیق در روش استخراج با حلال از سه حلال غیر قطبی پترولیوم اتر با نقطه جوش ٥٥ درجه سانتی گراد – ان هگزان با نقطه جوش ٦۰ درجه سانتی گراد و مخلوط حلال های ان هگزان – اتانول – استن به نسبت (۲:۱:۱)با نقطه جوش ٥۰ درجه سانتی گراد در سه زمان (۲ و٤ و٦ ساعت) و دو دمای استخراج (دمای محیط و نقطه جوش حلال مربوطه) استفاده شد که نتایج بدست آمده نشان داد که رنگ استخراجی از گوجه فرنگی واریته رد کلود ورنگی که از گوجه فرنگی به منظور مقایسه استخراج شد رنگی نسبتا پایدار و مورد پذیرش برای مصرف کنندگان می‌باشد [۱۲].

Zaghdoudi و همکاران (۲۰۱۵) با روش استخراج تسریع شده با حلال[1]، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی را از میوه خرمالو و چند میوه دیگر استخراج کرده و مورد بررسی قرار دادند. این محققان بهینه شرایط استخراج را در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد و مخلوط ۲۰:۸۰ (حجمی/حجمی) حلال‌های تتراهیدروفوران/متانول تعیین نمودند. براساس نتایج بدست آمده، لوتئین، زئازانتین و بتا کریپتوزانتین بیشترین مقدار رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در خرمالو را تشکیل می‌دهند [۱۳].

با توجه به ضرورت جایگزین نمودن رنگ‌های مصنوعی با رنگ‌دانه های طبیعی، هدف از پژوهش پیش‌رو بهینه یابی استخراج رنگ طبیعی از میوه خرمالو می‌باشد. در این تحقیق روش استخراج با حلال انتخاب شد. مزایای این روش سادگی و عدم نیاز به دستگاه اختصاصی، قابلیت اجرا به صورت صنعتی و امکان بازیافت حلال استفاده شده، می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

مواد اولیه مورد نیاز در این تحقیق عبارت بودند ازخرمالو کاملاً رسیده ژاپنی واریته کاکی که از گرگان تهیه شد. میوه های خریداری شده تا زمان استخراج و انجام آزمون ها در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل بتا کاروتن استاندارد از شرکت سیگما، حلال های اتانول، هگزان و تترا هیدروفوران از شرکت مرک آلمان بودند .

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- آماده سازی و استخراج رنگ از خرمالو

خرمالوی کامل همراه با پوست توسط مخلوط کن خانگی مدل TAURUS.S.A آسیاب و توسط الک با مصارف خانگی با سوراخ های متوسط، جهت یکنواخت شدن نمونه و همچنین حذف ضایعات صاف گردید. جهت جداسازی پکتین به خرمالوی آسیاب و صاف شده، اسید کلریدریک ۳۷ درصد یک نرمال و سود یک نرمال و حلال های مورد نظر که شامل اتانول، ان هگزان و مخلوط حلال ها بود به صورت همزمان به نسبت (۱:۱:۱) اضافه گردید. پکتین همزمان با اضافه کردن حلال ها در اثر تماس با حلال جدا شده و سپس توسط کاغذ صافی از فاز مایع تفکیک گردید. استخراج در سه سطح زمانی (۲، ٤ و ٦ ساعت) و دو سطح دمایی دمای محیط و دمای جوش حلال (دمای جوش حلال برای اتانول ۷۹ درجه سانتی گراد و برای ان هگزان ٦٨-٦٩ درجه سانتی گراد و برای مخلوط حلال ها ٦٩ درجه سانتی گراد است) انجام گرفت. در این زمان‌ها نمونه به صورت ثابت در دمای محیط و یا درون بن ماری (دنا ساخت ایران) در نقطه جوش حلال باقی ماند. پس از فرآیند استخراج، برای اطمینان از حذف کامل ضایعات احتمالی نمونه از پارچه توری عبور داده شد، سپس نمونه صاف شده از کاغذ صافی واتمن شماره ٤٢ عبور داده‌شد تا محلول شفاف رنگی بدست آمد.

۲-۲-۲- تعیین شرایط بهینه استخراج

نمونه های استخراج شده با نسبت ۱/۲۰ رقیق شده و میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV visible مدل Double Beam Biochrome Itd22 ساخت انگلیس) در طول موج ٤٥٣ نانومتر قرائت شد و نمونه ای که دارای بیشترین میزان جذب بود به عنوان نمونه بهینه انتخاب گردید [۱۲].

۲-۲-۳- تهیه پودر رنگی از فاز مایع استخراج شده

نمونه استخراج شده با حلال را توسط دستگاه روتاری (مدل HB contorolساخت آلمان) در دمای ٤٠ درجه سانتی گراد و تحت خلاء قرار داده شد تا حلال آن خارج گردید سپس به نمونه فاقد حلال کمی آب مقطر اضافه شد و در دستگاه سانتریفیوژ (مدل 2-16p ساخت آلمان) تحت سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت قرار داده شد تا فاز رنگی از مواد اضافی جدا گردد. سپس فاز رنگی جمع آوری شده و توسط دستگاه خشک کن انجمادی (مدل alpha-1 2 LD plus ساخت آلمان) به پودر رنگی تبدیل شد[١٤].

۲-۲-٤- محاسبه 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 میوه خرمالوی اولیه به عنوان راندمان استحصال رنگ محاسبه گردید.

راندمان استحصال پودر رنگی در این پژوهش معادل ۱۰/۸۵ درصد بود.

1. Accelerated solvent extraction

۲-۲-۵- تعیین میزان جذب پودر استحصال شده

مقداری از پودر رنگی بدست آمده درون دستگاه هانتر لب (مدل 4010 ساخت آمریکا) قرار گرفته و اعداد قرائت می‌شود.

۲-۲-٦- تعیین زمان بازداری کارتنوئیدها با استفاده از دستگاه کروماتو گرافی مایع با کار آئی بالا

جهت تعیین زمان بازداری ابتدا محلول استاندارد کاروتنوئید تهیه شده و زمان بازداری محلول استاندارد برست می‌آید، سپس نمونه پودر رنگی را در فاز متحرک (حلال بتا کاروتن که ان هگزان است) حل نموده و بصورت محلول در می‌آید. سپس زمان بازداری نمونه را با محلول استاندارد مقایسه می‌شود. در این تحقیق با توجه به اهمیت بتا کاروتن محلول استاندارد بتا کاروتن تهیه گردید ونمونه پودری جهت وضوح بیشتر در ان هگزان جهت مقایسه حل گردید همچنین فاز متحرک برای محلول بتا کاروتن متانول، استو نیتریل و تترا هیدروفوران بود [۱۵].

۲-۳- تجزیه و تحلیل داده ها

آنالیز آماری با نرم افزار (Statistics Sas institute Inc, NC) SAS، با سه متغیر مستقل حلال ، زمان ، دما و متغیر وابسته طول جذب به صورت فاکتوریل با ۳ تکرار به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج کارتنوئید ها از میوه خرمالو و بهینه سازی فرآیند مذکور به انجام رسید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- انتخاب شرایط بهینه استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی

در جدول ۱ اثر شرایط استخراج بر میزان جذب نور محلول های حاصل از استخراج نشان داده شده است .

Table1 Comparison of average absorbance of different treatments in 453 nm

Solvent	Extraction temp	Extraction time	Absorbance
Ethanol	Ambient temp	2	0.024 ± 0.0002^{k}
n- Hexane	Ambient temp	2	0.047 ± 0.001^{j}
Ethanol- n- Hexane	Ambient temp	2	0.052 ± 0.014^{j}
Ethanol	Ambient temp	4	0.026 ± 0.021^{k}
n- Hexane	Ambient temp	4	$0.0290.010^{k}$
Ethanol- n- Hexane	Ambient temp	4	0.022 ± 0.031^{k}
Ethanol	Ambient temp	6	0.061 ± 0.013^{j}
n- Hexane	Ambient temp	6	0.12 ± 0.003^{h}
Ethanol- n- Hexane	Ambient temp	6	0.084 ± 0.005^{i}
Ethanol	Boiling temp	2	0.27 ± 0.004^{e}
n- Hexane	Boiling temp	2	0.12 ± 0.002^{h}
Ethanol- n- Hexane	Boiling temp	2	0.22 ± 0.003^{f}
Ethanol	Boiling temp	4	0.41 ± 0.001^{b}
n- Hexane	Boiling temp	4	0.19 ± 0.004^{g}
Ethanol- n- Hexane	Boiling temp	4	0.33 ± 0.003^{d}
Ethanol	Boiling temp	6	0.56 ± 0.005^{a}
n- Hexane	Boiling temp	6	0.37 ± 0.006^{c}
Ethanol- n- Hexane	Boiling temp	6	0.39 ± 0.004^{c}

استخراج کاروتنوئیدها، فرآیند انتقال جرم از نمونه به حلال می‌باشد. دلیل افزایش میزان جذب، متناسب با افزایش دما را می توان ناشی از بهبود انتقال جرم در نتیجه افزایش حلالیت رنگدانه و کاهش ویسکوزیته حلال دانست [١٦]. نتایج مشابهی توسط Rafajlovskail و همکاران (۲۰۰۷) بدست آمده است، این محققان اظهار داشتند که افزایش دما اثر مثبتی بر بهبود فرآیند انتقال جرم دارد [۱۷].

به طور کلی کاروتنوئیدها مولکولهای آبگریز هستند و بنابراین تنها در حلالهای آلی قابل حل می‌باشند. حضور گروههای هیدروکسیل در انتهای زنجیره ها باعث می‌شود که کاروتنوئیدها مولکولهای قطبی باشند و تمایل به حل شدن در حلالهای آلی مختلف داشته باشند. در نمونه هایی که حاوی مقدار زیادی رطوبت هستند (مانند میوه ها)، از حلال های آلی قابل اختلاط با آب مانند اتانول برای استخراج ترکیبات قطبی

استفاده می شود [۱۸]. در میان حلالهای مورد استفاده در این پژوهش ان هگزان غیر قطبی‌ترین حلال و اتانول قطبی ترین حلال می‌باشد.

با افزایش میزان قطبیت حلال، میزان جذب نیز افزایش می‌یابد. همانطور که در جدول (۱) مشخص می‌باشد حلال اتانول (که دارای بیشترین میزان قطبیت در میان حلال‌های مورد استفاده می‌باشد) مقدار بیشتری از ترکیبات کاروتنوئیدی را استخراج نموده است و بدین ترتیب میزان جذب نیز با استفاده از این حلال افزایش می‌یابد. Calvo و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی از پوست گوجه فرنگی با استفاده از اتانول به طور چشمگیری بیشتر از هگزان و اتیل استات می‌باشد[۱۹].

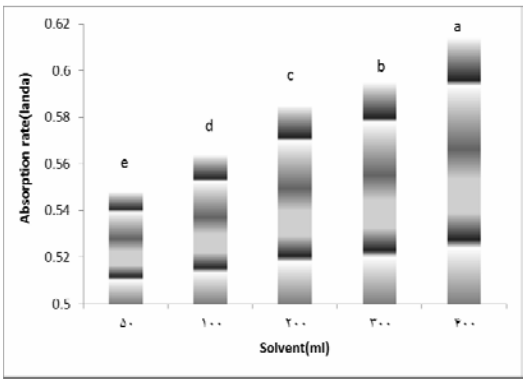

Fig 1 Absorbance of different volumes of Ethanol in boiling point

براساس نتایج بدست آمده بهترین شرایط برای حصول بیشترین مقدار ترکیبات کاروتنوئیدی شامل استخراج با حلال اتانول در دمای جوش حلال (۷۹ درجه سانتی گراد) و به مدت ٦ ساعت بود.

همانطور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود با افزایش حجم حلال میزان جذب نیز افزایش یافته که با توجه به نتایج بدست آمده، اختلاف معنی داری بین حجم های مختلف اتانول از ۵۰ تا ٤۰۰ میلی لیتر وجود داشت.

۳-۲- میانگین جذب رنگ پودر بهینه

همانگونه که پیش از این اشاره شد رنگ میوه ها و سبزیجات وابسته به پیوندهای دوگانه کونژوگه و گروه‌های فعال در مولکول کاروتنوئید می‌باشد. هر چه تعداد پیوندهای دوگانه کونژوگه بیشتر باشد، میزان جذب در طیف قرمز بیشتر می‌شود [۱۸]. همانطورکه در جدول (۲) مشاهده می‌شود، رنگ در نمونه بهینه به طور میانگین بیشتر به سمت قرمز تقریبا روشن میل کرده است که دلیلی بر وجود بتاکریپتوگزانتین و زئاگزانتین می‌باشد. لوتئین و زئاگزانتین از دسته رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌باشند که رنگ زرد- نارنجی را در میوه‌ها و سبزیجات ایجاد می‌نمایند. لوتئین نور آبی را جذب می‌کند و منجر به ایجاد ظاهری زرد رنگ می‌گردد، در حالیکه زئازانتین رنگ زرد- نارنجی ایجاد می‌کند. کریپتوزانتین گونه‌ای دیگر از رنگدانه‌های زرد- نارنجی کاروتنوئیدی می‌باشد. Takyi (۲۰۰۱) پس از بررسی رنگدانه‌های کاروتنوئیدی گزارش نموده که بتا کریپتوزانتین مسئول ایجاد رنگ نارنجی در میوه‌ها است[۲۰].

نسبت a^*/b^* برای میوه های سبز رنگ منفی، برای میوه های زرد رنگ صفر و برای میوه های نارنجی مثبت می‌باشد و هرچه این نسبت بیشتر باشد نشان دهنده قرمزتر بودن نمونه می‌باشد [۲۱].

Table 2 Score of color specifications of prepared powder

a^*	b^*	L^*	a^*/b^*
8.86± 0.015	5.99± 0.025	29.24 ± 0.026	**1.48 ± 0.005**

۳-۳- مقایسه نمونه رنگ استخراجی با محلول استاندارد بتاکاروتن

شکل (۲) زمان بازداری محلول استاندارد بتا کاروتن را نشان می دهد. همانطور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، زمان بازداری نمونه استخراجی با حلال با زمان بازداری محلول استاندارد بتا کاروتن مطابقت نکرده است. همانطور که پیش از این توضیح داده شد خرمالو حاوی کارتنوئید های مختلف بوده که به دلیل اهمیت بتا کاروتن این کارتنوئید مورد بررسی قرار گرفت ، لذا با توجه به زمان بازداری کارتنوئیدهای مختلف که در شکل (٤) نشان داده شده است می‌توان نتیجه گرفت که نمونه استخراجی با حلال حاوی کارتنوئیدهای لوتئین، بتا کریپتوزانتین و زئاگزانتین می‌باشد که در نمودار حاصل از زمان بازداری نمونه استخراجی مشاهده می‌شود. با این وجود دلیل عدم مشاهده بتا کاروتن در نمونه استخراجی را می‌توان به دلیل ناچیز بودن بتا کاروتن نسبت به سایر کارتنوئیدها در نمونه دانست [۲۲].

نتایج بدست آمده مشابه نتایجی است که توسط Zaghdoudi و همکاران (۲۰۱۵) ارائه شده است. این محققان با بررسی خرمالوی واریته Kaki با روش HPLC نشان دادند که بتا کریپتوزانتین و زئا زانتین بیشترین فراوانی در میان ترکیبات کاروتنوئیدی موجود در میوه خرمالو را دارند [۲۳].

Zhou و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی دو گونه خرمالو با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا، ۸ ترکیب مختلف کاروتنوئیدی شامل نئوزانتین، وایولازانتین، لوتئین، زئازانتین، بتا کریپتوزانتین، α- کاروتن، β- کاروتن و لیکوپن را تشخیص دادند. براساس نتایج این پژوهش بتا کریپتوزانتین فراوانترین کاروتنوئید موجود در میوه هر دو گونه خرمالو بوده است، به گونه‌ای که ۲۰ تا ۳۰ درصد کل ترکیبات کاروتنوئیدی در هر دو گونه را تشکیل می‌دهد. همچنین کل مقدار بتا کریپتوزانتین، زئازانتین، بتا کاروتن و لوتئین در دو گونه خرمالوی مورد مطالعه در این پژوهش ٤٩ تا ٥٩ درصد کل ترکیبات کاروتنوئیدی را تشکیل می‌دهد [٢٤]. نتایج مشابهی نیز توسط Yuan و همکاران (٢٠٠٦) ارائه شده است [٢٥].

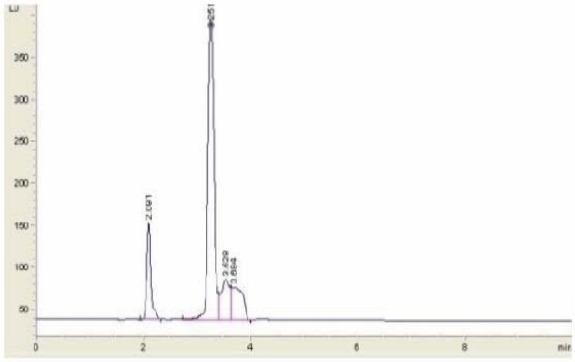

Fig 2 Retention Time (RT) of standard β- carotene solution

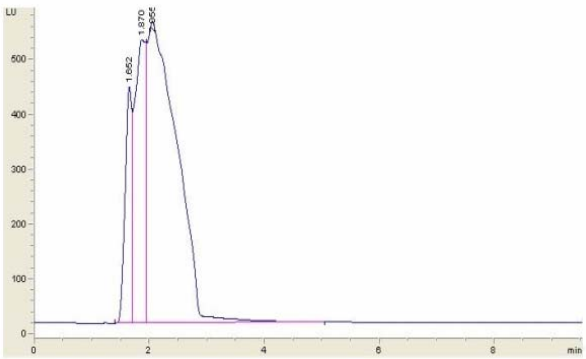

Fig 3 Retention Time (RT) colorant powder solved in n- Hexan

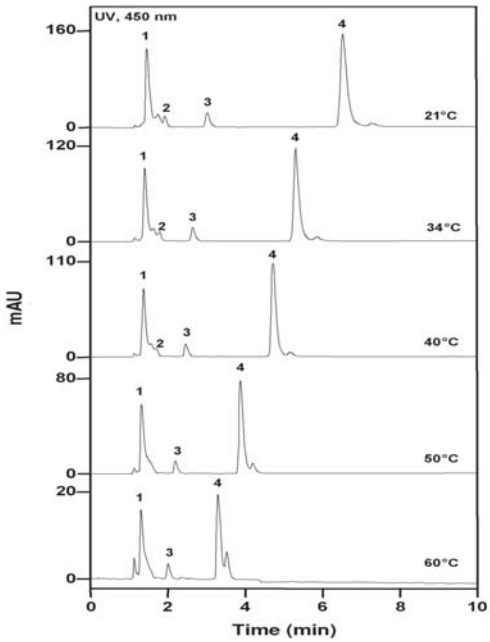

Fig 3 Internal standards of different carotenoids in different temperatures
1. Lutein 2. Zeaxanthin 3. β- Cryptoxanthin 4. β-carotene

٤- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این تحقیق حاکی آن بود که استخراج با حلال اتانول در شرایط دمایی ۷۹ درجه سانتی گراد (دمای جوش اتانول)و مدت زمان ٦ ساعت به عنوان بهترین شرایط استخراج بوده و بیشترین میزان رنگ کاروتنوئید تحت این شرایط استخراج شد.. و نیز بهینه حجم حلال اتانول ٤٠٠ میلی لیتر بود که تفاوت معنی داری (p>۰/۰۵) با سایر حجم های مورد استفاده نشان داد. در تعیین نوع رنگدانه‌های کاروتنوئیدی با آزمونHPLC ، بر خلاف انتظار نمونه فاقد بتا کاروتن یا مقدار ناچیزی بتا کاروتن بود که قابل مشاهده در آزمون نبود و بجای آن حاوی کارتنوئید های دیگر نظیر لوتئین و زئا گزانتین و بتا کریپتوکسانتین بود .

٥- منابع

[1] Arvayo-Enríquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortárez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J., & Rodríguez-Ramírez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, *5*(12), 2916-2924.

[2] Böhm, F., Edge, R., & George Truscott, T. (2012). Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen ($^1O_2$) and free radicals: potential effects for human health. Acta Biochimica Polonica, 59(1), 27.

[3] Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. European journal of medicinal chemistry, 70, 102-110

[4] Ibanez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Castro-Puyana, M. (2012). Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications, Ed. M. Hayes. Science Business, Springer, Meida, 55-98.

[5] Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, *46*(2), 438-450.

[6] Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., ... & Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular nutrition & food research*, *53*(S2), S194-S218.

[7] Jang, I. C., Jo, E. K., Bae, M. S., Lee, H. J., Jeon, G. I., Park, E., ... & Lee, S. C. (2010). Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (Diospyros kaki cv. Fuyu) fruit. J. Med. Plants Res, 4(2), 155-160.

[8] Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. Journal of the American Dietetic Association, 96(10), 1027-1039.

[9] Karrer, P., & Helfenstein, A. (1932). Plant pigments. Annual Review of Biochemistry, 1(1), 551-580.

[10] Schön, K. (1935). Studies on carotenoids: The carotenoids of Diospyros fruits. II. The carotenoids of arbutus fruits (Arbutus unedo). Biochemical Journal, 29(7), 1779

[11] Ebert, G., & Gross, J. (1985). Carotenoid changes in the peel of ripening persimmon (Diospyros kaki) cv Triumph. Phytochemistry, 24(1), 29-32.

[12] Khanipour. E, Keramat. J, Shokrani,R. (2007**).**Determination of Optimum Conditions for Carotenoid Extraction from Tomatoes. . Journal of *Sciences* and Technology of *Agriculture* and Natural Resources, 11(40):289-297

[13] Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., & Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (Diospyros kaki L.), peach (Prunus persica L.) and apricot (Prunus armeniaca L.). Food chemistry, 184, 131-139.:

[14] Sh. Bolurian, S. Khalilian and M. Khalilian. 2014 , Extraction of curcumin from Curcuma longa: Optimization condition of extraction with ultrasound waves by RSM, *Electerrnic Journal of Food Processing and Presevation* , Vol. 5 (2): 75-89

[15] Neyestani T, Gharavi A. 2007, Simultaneous determination of lycopene and beta-carotene with high-performance liquid chromatography. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology1, (3):45-50,

[16] M. Yolmeh, M. B. Habibi-Najafi, R. Farhoosh, F. Hosseini. (2016). Efficacy of Response Surface Methodology in Optimization the Extraction of Annatto Seed's Colorants, *Journal of Food Science and Technolpgy*. 50(13).

[17] Rafajlovska, V., Slaveska-Raicki, R., Koleva Gudeva, L., & Klopceska, J. (2007). Spice paprika oleoresin extraction under different conditions involving acetone and ethanol.

[18] Das, S., & Bera, D. (2013). Mathematical Model Study on Solvent Extraction of Carotene from Carrot. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, *2*(9), 343- 349.

[19] Calvo, M. M., Dado, D., & Santa-María, G. (2007). Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β-carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. European Food Research and Technology, *224*(5), 567-571.

[20] Takyi, E.E.K. (2001). Bioavailability of Carotenoids from Vegetables versus Supplements. In Vegetables, Fruits, and Herbs in Health Promotion; Watson, R.R., Ed.; CRC Press LCC: Danvers, MA, USA, pp. 19–31

[21] Zhou, C. H., Xu, C. J., Sun, C. D., Li, X., & Chen, K. S. (2007). Carotenoids in white- and red-fleshed loquat fruits. J. of

Agricultural and Food Chemistry, *55*(19), 7822-7830

[22] Huck, C. W., Popp, M., Scherz, H., & Bonn, G. K. (2000). Development and Evaluation of a New Method for the Determination of the Carotenoid Content in Selected Vegetables by HPLC and HPLC—MS—MS. *Journal of chromatographic science*, *38*(10), 441-449

[23] Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., & Guiavarc'h, Y. (2015). Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (Diospyros kaki L.), peach (Prunus persica L.) and apricot (Prunus armeniaca L.). Food chemistry, 184, 131-139.

[24] . Zhou, C., Zhao, D., Sheng, Y., Tao, J., & Yang, Y. (2011). Carotenoids in fruits of different persimmon cultivars. Molecules, 16(1), 624-636.

[25] Yuan, B., Xu, H. L., & Leng, P. (2006). Content and chemical composition of carotenoids in persimmon fruit. China Agriculture Science Bullten, 22, 277-280.

Optimization of carotenoid pigments extraction from persimmon fruit (Diospyros kaki L.)

Sabeti Sanat, Gh. [1], Ataye Salehi, E. [2*], Blourin, Sh. [3]

1. Msc Gratuated, Department of Food and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
2. Assistant profosser, Department of Food and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
3. Assistant profosser, Department of Food Additives Research, Institute of Food Science and Technology, Academic Center OF Education, Mashhad, Iran

(Received: 2016/01/24 Accepted: 2016/06/25)

The color is the main appearance characteristic in acceptance of food materials. Because of side effect of artificial colors the uses of theirs have been minimized and there is more trend to use natural pigment. The purpose of this study was optimization of carotenoids extraction from from Persimmon fruit (Diospyros kaki L.) by using ethanol, n- hexane and their mixture in environmental temperature and boiling point in 2,4,and 6 hours times. The results showed that, most absorption density is for ethanol solvent in boiling point after 6 hours. To selection the best ratio of sample to solvent, used the 50, 100, 200, 300, 400 ml of ethanol and got the most efficiency ($p>0.5$) is for 400ml of solvent and there was a meaning difference with other ratioes after 6 hour test in boiling point. After extraction, the sample solvents have been removed by rotary evaporator and residue has been powdered by freeze driers. The extraction efficiency of Persimmon color pigments powder was 10.85 percent to weight of whole amount of fruit.

Key words: Carotenoid, Extraction, Persimmon fruit, Pigment

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