



بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ آناتو در مقیاس نیمه صنعتی و ارزیابی پایداری رنگی آن در شرایط آزمایشگاهی و سیستم مدل غذایی

فرشته حسینی^{۱*}، حامد صابریان^۲، شادی بلوریان^۳، مجید افشاری^۴

۱-استادیار گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.

۲-استادیار مرکز خدمات تخصصی کشاورزی، جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳-دانشیار گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.

۴-مدیر عامل شرکت دانش بنیان افزودنی‌های طبیعی گلچین توس (افزونه).

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

کلمات کلیدی:

استخراج آناتو،

بهینه‌سازی،

بازده رنگی،

خلوص رنگ،

L*

DOI: 10.22034/FSCT.19.132.135

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.10.3

* مسئول مکاتبات:

f.hoseini@acecr.ac.ir

در این پژوهش، تاثیر متغیرهای نوع حلال، نسبت دانه به حلال، دما و زمان استخراج بر بازده رنگی، خلوص رنگ و بازده بیکیسین/نوربیکسین دانه آناتو بود. طرح مرکب مرکزی با چهار فاکتور نوع حلال (استون، سود، سود-استون)، نسبت حلال به ماده جامد (۱:۱ تا ۱:۵ میلی لیتر بر گرم) و زمان (۲-۶ ساعت) و دمای استخراج (۲۵-۶۵ درجه سانتیگراد) در سه سطح (۱-، ۰ و ۱) بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دوم برای بازده رنگ آناتو معنی دار می باشد و ضریب تبیین (R²) محاسبه شده برای آن ۰/۹۱۵ بود که بیانگر آن است که ۹۱/۵٪ تغییر در پاسخ‌ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. همچنین دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نشان نداد. بازده بیشینه تحت شرایط حلال هیدروکسید سدیم، دمای ۴۶/۴۱ C^o، زمان ۲/۰۵ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵ به ۱، معادل ۱۳/۳۱٪ پیش بینی گردید. مدل درجه دوم برای خلوص رنگ آناتو معنی دار بود و ضریب تبیین (R²) محاسبه شده برای آن ۰/۸۴۸ بود. با تغییر نوع حلال از استون به سود و افزایش نسبت حلال به ماده جامد، خلوص افزایش یافت. شاخص بازده بیکیسین/نوربیکسین نیز که در واقع وزن بیکیسین/نوربیکسین نسبت به دانه آناتو می باشد، به عنوان یک شاخص جامع تر تعیین و محاسبه شد. همچنین موثرترین عامل در تغییرات رنگ پودر آناتو، عامل نور تشخیص داده شد که در صورت حذف آن با استفاده از بسته بندی های مناسب می توان کیفیت پودر رنگ های استخراجی را تا حدود زیادی حفظ نمود. نتایج مشابهی در خصوص پایداری پودر رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی پودر آب پنیر مشاهده شد.

۱- مقدمه

امروزه افزودنی‌های رنگی برای ایجاد ظاهر مطلوب و موردپسند مصرف‌کنندگان، به‌طور گسترده در محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در پژوهش‌های محققان مختلف، اثرات منفی رنگ‌های سنتزی بر سلامتی انسان به اثبات رسیده و نقش آنها در بروز اختلالاتی نظیر کم‌هوشی، بیش‌فعالی در کودکان، بی‌قراری و ... مورد تاکید قرار گرفته است [۱ و ۲].

رنگ آناتو (E160b) یکی از قدیمی‌ترین کاروتنوئیدهای طبیعی شناخته شده است که از پریکارپ دانه‌های درخت گرمسیری *بیگسا اورلانا*^۱ به دست می‌آید. هرچند در دانه‌های آناتو کاروتنوئیدهای مختلفی شناسایی شده‌اند، اما رنگدانه‌های اصلی آناتو بیگسین و نوربیگسین می‌باشند که بیش از ۸۰ درصد کل محتوی کاروتنوئیدهای آناتو را تشکیل می‌دهند. این رنگدانه‌ها به طرق مختلف استخراج می‌شوند تا عصاره‌های محلول در روغن، سوسپانسیون‌های روغنی یا عصاره‌های محلول در آب حاصل شود که هر کدام کاربردهای ویژه خود را دارند [۳ و ۴].

رنگ آناتو دارای طیف رنگ نارنجی تا قرمز می‌باشد. امروزه رنگ آناتو به‌عنوان یک رنگ طبیعی و سالم، در فرآورده‌های غذایی مختلف مثل مارگارین، کره، فرآورده‌های قنادی، نانوائی، پنیر، بستنی، فراورده‌های گوشتی داروسازی، تولید مواد آرایشی و ... کاربرد گسترده‌ای دارد [۵]. از نقطه نظر اقتصادی، رنگ آناتو دومین افزودنی رنگی طبیعی مورد استفاده در صنعت در دیاست که پیش‌بینی می‌شود روند تقاضا برای آن روز به روز افزایش یابد [۶].

به علت استفاده زیاد از رنگ آناتو در صنعت غذا، بررسی‌های زیادی جهت ایمن بودن رنگ آناتو انجام شده است که نتایج این تحقیقات هیچ‌گونه اثر منفی ناشی از مصرف رنگ آناتو نشان ندادند [۴ و ۷]. همچنین در مقالات مختلف ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضد میکروبی نیز برای آن ذکر شده است [۸ و ۹]. از ویژگی‌های دیگر آناتو (علاوه بر رنگ‌دهی) می‌توان به کاربرد آن در مواجهه بیماری‌های مختلف، ویژگی ضد-میکروبی و خواص آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد [۵].

دانه آناتو با هزینه‌ای کم از طریق کشورهای نظیر هند در

1 *Bixa orellana*.L

دسترس بوده و می‌تواند برای استخراج رنگ مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش با توجه به عدم وجود اطلاعات و مستندات کافی در خصوص فرایند استخراج رنگ از دانه آناتو در شرایط نیمه صنعتی، در مرحله نخست، تاثیر تیمارهای متفاوت شامل متغیرهای نوع حلال، نسبت دانه به حلال، دمای استخراج و زمان استخراج 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 به منظور حصول حداکثر بازده و حداکثر ضریب اطمینان صحت آزمون، تیمارهای کمتر و همچنین زمان کوتاه‌تری مورد نیاز است. لازم به ذکر است که هدف از بهینه‌سازی، به حداکثر رساندن مقدار بازده استخراج هم از لحاظ کمی و هم کیفی (میزان خلوص رنگ استحصالی) بوده است. در مرحله بعد پایداری رنگ در شرایط نگهداری مختلف مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت کارایی آن برای سیستم مدل غذایی (پودر آب پنیر) ارزیابی شده است. ارتقاء سطح سلامت عمومی جامعه به ویژه کودکان و نوجوانان و کمک به تولید غذاهای سالم و پیشگیری از شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان از جمله اهداف انجام پژوهش بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

دانه آناتو از کشور هند خریداری شد. حلال‌ها شامل اتانول، اتیل استات، استون با برند مرک برای انجام آزمایشات و با برند کیان شیمی برای تیمارهای مرحله تولید نیمه صنعتی تهیه شدند. سود از شرکت آراکس شیمی تهیه شد.

۲-۲- بهینه‌سازی شرایط استخراج رنگ آناتو با

استفاده از روش RSM

در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر شرایط استخراج آناتو و بهینه‌سازی فرآیند مذکور از طراحی سطح پاسخ با چهار متغیر برای بررسی ارتباط بین پاسخ‌های به دست آمده و متغیرهای فرآیند و بهینه‌سازی این پاسخ‌ها استفاده می‌شود. اثر متغیرهای مستقل شامل X_1 نوع حلال، X_2 نسبت حلال به ماده جامد، X_3

تخمین خطای آزمایش استفاده شد. متغیرها مطابق جدول زیر کد گذاری شدند:

زمان و X_4 دمای استخراج، در سه سطح در جدول (۱) نشان داده است.
سه تکرار نقطه مرکزی (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) برای

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

Coded Level			Symbol	Independent Variables
-1	0	+1		
NaOH	50% Acetone + 50% NaOH	Acetone	X_1	Solvent type
1	3	5	X_2	Solvent/Solid ratio (ml/g)
6	4	2	X_3	Time (min)
65	45	25	X_4	Temperature (°C)

۲-۴- تعیین خلوص

میزان خلوص رنگ استخراج شده مطابق روش استاندارد FDA بر اساس قانون بیر-لامبرت و با استفاده از دستگاه UV-Vis اسپکتروفوتومتر مدل CAMSPEC M550 ساخت انگلستان تعیین شد. به این منظور ۸۰ میلی گرم از رنگ استخراج شده با دقت ۰/۰۰۱ توزین شده و داخل بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری (V_1) ریخته شد و با استون به حجم رسانده شد. سپس ۵ میلی لیتر (V_2) از این محلول در بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری (V_3) دیگری ریخته شده و مجدداً با استون به حجم رسانده شد. از این محلول ۵ میلی لیتر (V_2) برداشته شده به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری (V_3) دیگری منتقل شده و مجدداً با استون به حجم رسانده شد. استون به عنوان بلانک دستگاه انتخاب شده و جذب نمونه ها در طول موج ۴۸۷ نانومتر اندازه گیری شد. میزان خلوص رنگ از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۰]:

$$\% \text{ خلوص رنگ} = \frac{Ab \times V_1 \times V_2 \times v_3}{v_1 \times v_2 \times W \times 3090}$$

در این رابطه:

Ab میزان جذب محلول رنگی، 3090 cm^{-1} $E^{1\%}$ برابر حداکثر شدت جذب نمونه خالص یک درصد در یک سل یک سانتیمتری در طول موج ۴۸۷ نانومتر می باشد.

۲-۵- بازده بیکسین/نوربیکسین

در فرایند استخراج، هم بازده وزنی رنگ حائز اهمیت است و هم خلوص رنگ به دست آمده و لزوماً نمونه ای که بالاترین بازده وزنی را داشته است بیشترین خلوص را به خود اختصاص نمی دهد. لذا برای رسیدن به مطلوبترین نمونه، شاخص به نام بازده

دامنه تغییرات نسبت حلال به ماده جامد از ۱ به ۱ تا ۵ به ۱، برای زمان ۲-۶ ساعت و برای دما ۲۵ تا ۶۵ درجه سانتیگراد می باشد.

به دلیل آن که مهمترین مسئله در این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای نسبت حلال به ماده جامد، نوع حلالها، زمان و دمای استخراج بر درصد بازده استخراج می باشد، بنابراین طرح آماری RSM انتخاب گردید.

به منظور استخراج رنگ، ابتدا دانه های آناتو با استفاده از سیستم الک بوجاری شدند و مواد زائد آنها حذف گردید. سپس دانه ها با آب شستشو شده و در مجاورت هوا خشک گردیدند. به اندازه پنج برابر وزنی دانه، هگزان به آن افزوده شد و به مدت یک شبانه روز تحت همزدن ملایم قرار گرفت تا چربی زدایی انجام شود. سپس دانه ها سانتریفوژ شده و حلال از دانه ها جدا شد.

سپس دانه های چربی گیری شده به مخزن پرکولاتور منتقل شده و مطابق تیمارهای تعیین شده، حلال با نسبت مشخص به آن افزوده گردید. پس از طی زمان لازم در دماهای تعیین شده، عصاره رنگی حاصل با استفاده از بگ فیلترها، صاف شده و به اوپراتور منتقل گردید. با توجه به حجم عصاره، تغلیظ تا رسیدن به یک پنجم حجم اولیه عصاره انجام شد. سپس عصاره تغلیظ شده در مجاورت هوا به مدت ۲ روز خشک گردید. پودر به دست آمده برای یکنواخت سازی اندازه ذرات، آسیاب شده والک گردید.

۲-۳- تعیین بازده وزنی استخراج رنگ

بازده استخراج رنگ آناتو از تقسیم وزن رنگدانه پودری به دست آمده بر وزن دانه آناتو اولیه و برحسب درصد محاسبه شد.

بیکیسین/نوربیکیسین مطابق رابطه زیر تعریف گردید:

خلوص × بازده رنگ = بازده بیکیسین/نوربیکیسین

= بازده بیکیسین/نوربیکیسین

× ۱۰۰ (وزن رنگ / (وزن بیکیسین/نوربیکیسین)) × (وزن دانه آناتو/وزن رنگ)

= بازده بیکیسین/نوربیکیسین

× ۱۰۰ (وزن دانه آناتو / (وزن بیکیسین/نوربیکیسین))

۶-۲-آزمون‌های شناسایی و تایید ساختار رنگ استخراج شده

*طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)

تعیین ساختار و خلوص نمونه بر مبنای بیکیسین با استفاده از دستگاه NMR مارک Bruker، (ساخت آمریکا) واقع در گروه شیمی دانشگاه کاشان انجام شد. بدین منظور چند میلی‌گرم از نمونه در حلال کلروفرم حل شده و در لوله مخصوص دستگاه NMR قرار گرفت.

*طیف‌سنجی مادون قرمز (IR)

نمونه رنگ استخراج شده به مدت 24 h در آون تحت خلا قرار گرفت تا کاملاً عاری از هرگونه رطوبت شود. سپس از مخلوط نمونه رنگ به همراه برمید پتاسیم (KBr) قرص تهیه شده و در داخل دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز-Double beam Shimadzu-4300 (ساخت ژاپن) قرار گرفت. به منظور اطمینان از خلوص ترکیب استخراج شده، طیف به‌دست آمده از نمونه با طیف استاندارد بیکیسین مقایسه شد.

۷-۲-مطالعه پایداری رنگ آناتو به صورت

Invitro تحت شرایط نگهداری

بدین منظور پودر رنگ آناتو به دست آمده در پاکت‌های پلی اتیلنی بسته‌بندی شده. هوای بسته‌بندی تا حد امکان تخلیه شده و تحت شرایط: دمای ۴°C (یخچال) و تاریکی، دمای ۲۵°C (محیط) و تاریکی و دمای ۲۵°C (محیط) و نور نگهداری و طی مدت زمان معین رنگ نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هانتربل مدل colorflex ساخت آمریکا و به صورت ارزش‌های

CIELAB شامل L (روشنی)، a (قرمزی-سبزی) و b (زردی-آبی) اندازه‌گیری شد.

برای همبستگی بهتر بین تفاوت‌های کالریمتریک و دیداری، تفاوت رنگ‌سنجی کل (ΔE) برای هر نمونه نسبت به نمونه شاهد از فرمول زیر محاسبه شد (نمونه روز صفر به عنوان شاهد انتخاب شد):

پارامتر C یا کروما که تعیین‌کننده میزان خلوص و اشباعیت رنگ می‌باشد از طریق تبدیل مختصات کارتیزین (a, b) به مختصات قطبی بر اساس فرمول زیر به دست آمد:

$$C = \sqrt{(a)^2 + (b)^2}$$

۸-۲-ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل

غذایی

به منظور ارزیابی پایداری رنگ‌دانه استحصالی، پودر آب پنیر به عنوان یک سیستم مدل غذایی مورد بررسی قرار گرفت. پودر آب پنیر بدون رنگ از شرکت صنایع غذایی گلشاد مشهد تهیه شد. رنگ آناتو در سه سطح ۰/۱۴، ۰/۲۸ و ۰/۴۲ درصد به پودر آب پنیر افزوده شد. پودر آب پنیر تهیه شده در فرمولاسیون درآژه به میزان ۶۰٪ کل درآژه روغن نباتی و ۴۰٪ مواد پودری به کار گرفته شد و محصول نهایی به صورت اسنک شامل ۵۰٪ درآژه و ۵۰٪ پایه (ذرت اکستروود شده) تهیه گردید. نمونه‌ها در پاکت‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شده و در دو محیط نور و تاریکی و طی دو دمای ۳۷ درجه و دمای محیط به مدت زمان مشخص نگهداری شد. کیفیت پایداری رنگ نمونه‌ها طی این مدت از طریق اندازه‌گیری تغییرات شاخص‌های رنگی (L, a, b) ارزیابی شد.

۹-۲-طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

برای بهینه‌سازی استخراج رنگ روش سطح پاسخ (RSM) استفاده شد. با کمک این طرح آماری، تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته و کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی اثر متغیرها در استخراج رنگ آناتو

با روش ماسراسیون براساس میزان بازده رنگی

مقادیر پاسخها (بازده رنگی، خلوص رنگ و بازده بیکیسین/نوربیکیسین دانه آناتو) تحت شرایط مختلف آزمون در جدول ۲ مشاهده می گردد.

فاکتورها، قابل برآورد هستند [۱۱]. 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. در مرحله ارزیابی پایداری رنگ، تغییرات شاخص ها طی زمان نگهداری، با مقایسه میانگین ها در آزمون چند دامنه ای دانکن سنجیده شد.

Table 2 Experimental conditions from the CCD and the experimental results for color extraction from Anatto seeds and their responses (Yield, Color purity and yield of bixin/norbixin)

No	solvent	Solvent/Solid ratio	Time (h)	Temperature(°C)	Yield (%)	Purity (%)	Bixin/norbixin Yield
1	-1	1	2	25	0.78	7.45	0.06
2	1	1	2	25	3.54	2.37	0.08
3	-1	5	2	25	1.93	18.66	0.36
4	1	5	2	25	9.49	2.36	0.19
5	-1	1	6	25	0.76	7.61	0.06
6	1	1	6	25	1.56	1.57	0.02
7	-1	5	6	25	1.79	17.57	0.31
8	1	5	6	25	12.12	2.88	0.34
9	-1	1	2	65	0.99	12.23	0.12
10	1	1	2	65	1.33	2.33	0.03
11	-1	5	2	65	1.92	12.22	0.23
12	1	5	2	65	17.88	2.04	0.36
13	-1	1	6	65	0.68	11.31	0.08
14	1	1	6	65	3.18	0.03	0.00
15	-1	5	6	65	2.34	26.5	0.62
16	1	5	6	65	11.84	0.28	0.03
17	-1	3	4	45	0.8	7.04	0.06
18	1	3	4	45	6.97	3.36	0.23
19	0	1	4	45	1.12	5.73	0.06
20	0	5	4	45	11.93	4.98	0.59
21	0	3	2	45	4.91	9.03	0.44
22	0	3	6	45	1.55	6.13	0.09
23	0	3	4	25	5.18	9.07	0.47
24	0	3	4	65	5.71	2.9	0.17
25	0	3	4	45	6.105	5.69	0.54
26	0	3	4	45	4.745	7.54	0.47
27	0	3	4	45	6.135	7.79	0.58

* In solvent type, -1: Acetone, +1: NaOH and 0: 50% Acetone and 50% NaOH

بود که بیانگر آن است که ۹۱/۵٪ تغییر در پاسخها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. به عبارت دیگر، تنها ۸/۵٪ تغییرات کل توسط مدل، قابل پیش بینی و توضیح نمی باشد. ضریب تبیین اصلاحی ($R^2_{adj} = 0.82$) به ضریب تبیین نزدیک است

نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای بازده رنگی دانه آناتو در جدول شماره ۳، نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن بود که مدل درجه دوم برای بازده رنگی کل معنی دار بود و ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای آن ۰/۹۱۵

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 رنگ را پیش بینی می کند.

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 [۱۲]. مطابق جدول ۴، عدم

Table 3. Analysis of variance of different models for yield of Annatto

Source	Std. Dev	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	press
Linear	2.66	0.7001	0.6456	0.4905	264.17
2FI	1.93	0.8852	0.8135	0.5134	
<u>Quadratic</u>	<u>1.91</u>	<u>0.9154</u>	<u>0.8166</u>	0.4190	<u>Suggested</u>
Cubic	1.84	0.9739	0.8302	-4.7358	

در شکل ۱ نمونه ای از عصاره تغلیظ شده و رنگ پودری استخراج شده نشان داده شده است.



Fig 1 Left to right: annatto seeds, annatto extract, annatto natural color

Table 4 Analysis of variance and significance of regression coefficient for yield of Annatto (Quadratic model)

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob >F
Model	474.63	14	9.27	33.90	0.0002
X ₁ -solvent	173.72	1	173.72	47.51	< 0.0001
X ₂ -solvent/solid ratio	182.40	1	182.40	49.88	< 0.0001
X ₃ -Time	2.68	1	2.68	0.73	0.4084
X ₄ -Temperature	4.22	1	4.22	1.16	0.3036
X ₁ ²	2.91	1	2.91	0.79	0.3902
X ₂ ²	6.39	1	6.39	1.75	0.2107
X ₃ ²	7.59	1	7.59	2.08	0.1752
X ₄ ²	0.63	1	0.63	0.17	0.6843
X ₁ X ₂ ²	85.33	1	85.33	23.33	0.0004
X ₁ X ₃ ³	0.76	1	0.76	0.21	0.6564
X ₁ X ₄ ⁴	2.93	1	2.93	0.80	0.3881
X ₂ X ₃	0.45	1	0.45	0.12	0.7331
X ₂ X ₄	5.19	1	5.19	1.42	0.2567
X ₃ X ₄	1.31	1	1.31	0.36	0.5613
Residual	43.88	12	3.66	-	-
<u>Lack of Fit</u>	42.62	10	4.26	6.76	<u>0.1356</u>
Pure Error	1.26	2	0.63	-	-
Cor Total	518.52	26	-	-	-

of solvent type and S/S on the yield during Annatto extraction

همانطور که در معادله (۱) مشاهده می شود، بزرگترین ضریب خطی مربوط به نسبت حلال به ماده جامد می باشد (۳/۱۸) و در نتیجه افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بیشترین اثر مستقیم را بر بازده استخراج داشته است. در این پژوهش دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نشان نداد. پژوهش ها در مورد استخراج رنگدانه های طبیعی دیگر نیز شرایط مشابهی را گزارش نموده است از جمله واسموند و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که زمان استخراج در تاثیری بر بازده استخراج رنگ طبیعی کلروفیل ندارد [۱۳]. همچنین صابریان و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند که نسبت حلال به ماده جامد مهمترین عامل معنی دار و اثرگذار بر بازده کلروفیل استخراجی با روش متداول بود؛ اگرچه زمان استخراج، تاثیر معنی داری بر بازده نداشت [۱۴].

۳-۲- بررسی اثر متغیرها در استخراج رنگ آناتو

با روش ماسراسیون براساس خلوص رنگ

مقادیر پاسخ (خلوص رنگ) تحت شرایط مختلف آزمون در جدول ۲ مشاهده می گردد. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) چند مدل رگرسیونی برای خلوص رنگ در جدول شماره ۵ نشان داده شده است.

معادله (۱) برای پاسخ های پیش بینی شده بازده وزنی استخراج رنگ آناتو به صورت کدگذاری شده بدست آمد:

$$\text{Yield (\%)} = 5.19 + 3.11 X_1 + 3.18 X_2 - 0.39 X_3 + 0.48 X_4 - 1.06 X_1^2 + 1.58 X_2^2 - 1.72 X_3^2 + 0.50 X_4^2 + 2.31 X_1 X_2 - 0.22 X_1 X_3 + 0.43 X_1 X_4 - 0.17 X_2 X_3 + 0.57 X_2 X_4 - 0.29 X_3 X_4 \quad (1)$$

در این رابطه X_1 ، X_2 ، X_3 و X_4 به ترتیب کدهای نوع حلال، نسبت حلال/ماده جامد، زمان و دمای استخراج می باشند. معنی داری هر پارامتر با شاخص P مشخص گردید. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود. اثر خطی متغیرهای X_1 ، X_2 و اثر متقابل $X_1 X_2$ به طور قابل توجهی بازده وزنی استخراج رنگ آناتو را تحت تاثیر قرار داد ($p < 0.05$). به طوری که با تغییر نوع حلال از استون به سود و افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بازده افزایش یافته است که این مساله در شکل ۲ نیز قابل مشاهده است.

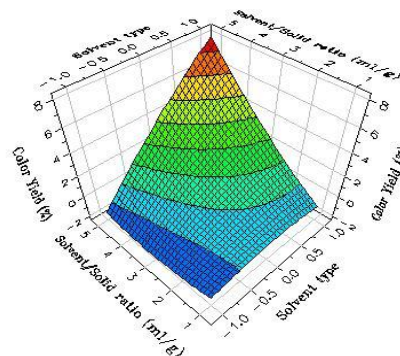


Fig 2 Response surface plot of the interaction effect

Table 5 Analysis of variance of different models for color purity of Annatto

Source	Std. Dev	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	press	
Linear	3.73	0.6867	0.6297	0.4854	502.58	
2FI	3.27	0.8253	0.7161	0.2714	711.57	
<u>Quadratic</u>	<u>3.51</u>	<u>0.8484</u>	<u>0.6716</u>	<u>0.0563</u>	<u>921.64</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	2.54	0.9735	0.8279	-4.5428	5413.26	

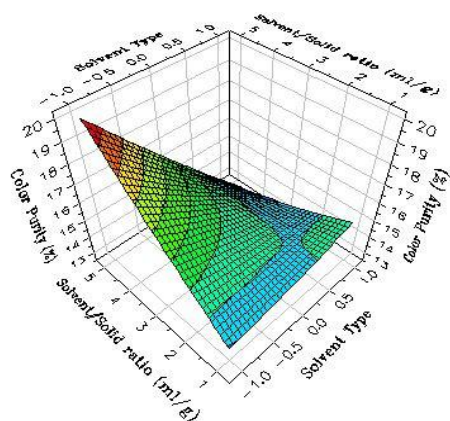
برازش (Lack-of-fit) بیانگر عدم موفقیت مدل جهت نشان دادن داده ها در تقاطعی که در دامنه مدل رگرسیونی وجود ندارند، می باشد [۱۲].

نتایج حاکی از آن بود که مدل کوادراتیک (درجه دوم) برای خلوص رنگ آناتو معنی دار بود و ضریب تبیین (R^2) محاسبه شده برای آن ۰/۸۴۸ بود که بیانگر آن است که ۸۴/۸٪ تغییر در پاسخ ها توسط مدل برازش شده قابل تبیین است. آزمون عدم

Table 6 Analysis of variance and significance of regression coefficient for color purity of Annatto (Quadratic model)

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob >F
Model	828.61	14	59.19	4.80	0.0049
X ₁ -solvent	593.63	1	593.63	48.12	< 0.0001
X ₂ -solvent/solid ratio	75.48	1	75.48	6.12	0.0293
X ₃ -Time	1.50	1	1.50	0.12	0.7336
X ₄ -Temperature	5.000E-003	1	5.000E-003	4.053E-004	0.9843
X ₁ ²	0.34	1	0.34	0.028	0.8702
X ₂ ²	0.11	1	0.11	9.258E-003	0.9249
X ₃ ²	10.43	1	10.43	0.85	0.3759
X ₄ ²	0.45	1	0.45	0.037	0.8514
X ₁ X ₂	76.96	1	76.96	6.24	0.0280
X ₁ X ₃	17.58	1	17.58	1.42	0.2557
X ₁ X ₄	14.96	1	14.96	1.21	0.2924
X ₂ X ₃	15.62	1	15.62	1.27	0.2824
X ₂ X ₄	3.36	1	3.36	0.27	0.6113
X ₃ X ₄	6.90	1	6.90	0.27	0.4688
Residual	148.02	12	12.34	0.56	-
Lack of Fit	145.39	10	14.54	-	0.0858
Pure Error	2.63	2	1.32	11.05	-
Cor Total	976.63	26	-	-	-

خطی مربوط به نوع حلال می باشد (۵/۷۴) و در نتیجه نوع حلال بیشترین اثر مستقیم را بر بازده استخراج داشته است. در این پژوهش دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر خلوص نشان نداد.

**Fig 3** Response surface plot of the interactional effect of solvent type and S/S on the color purity during Annatto extraction

چودری و همکاران (۲۰۱۰) برای استخراج رنگ آناتو حلال های مختلف شامل اتانول ۹۵٪ (به روش استخراج سرد)، اتانول ۹۵٪ (به روش استخراج داغ)، اسید استیک ۱٪، اسید استیک ۱۰٪ و اسید استیک ۱۰۰٪ و محلول سود ۵٪ و ۲۵٪ درصد را مورد

مطابق جدول ۶، عدم برازش معنی دار نبود. بنابراین همه نتایج حاکی از این بودند که مدل رگرسیونی درجه دوم تحت شرایط مختلف حلال و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی خلوص رنگ آناتو را پیش بینی می کند.

معادله (۲) برای پاسخ های پیش بینی شده خلوص رنگ آناتو به صورت کدگذاری شده بدست آمد:

$$\begin{aligned} \text{Purity (\%)} = & 6.05 - 5.74 X_1 + 2.05 X_2 - 0.29 X_3 + 0.017 X_4 \\ & - 0.37 X_1^2 - 0.21 X_2^2 + 2.01 X_3^2 + 0.42 X_4^2 - 2.19 X_1 X_2 \\ & - 1.05 X_1 X_3 - 0.97 X_1 X_4 + 0.99 X_2 X_3 - 0.46 X_2 X_4 \\ & + 0.66 X_3 X_4 \end{aligned} \quad (2)$$

در این رابطه X_1 ، X_2 ، X_3 و X_4 به ترتیب کدهای نوع حلال، نسبت حلال/ماده جامد، زمان و دمای استخراج می باشند. معنی داری هر پارامتر با شاخص P مشخص گردید. همانطور که در جدول ۶ مشاهده می شود. اثر خطی متغیرهای X_1 ، X_2 و اثر متقابل $X_1 X_2$ به طور قابل توجهی خلوص رنگ آناتو را تحت تاثیر قرار داده است ($p < 0.05$). به طوری که با تغییر نوع حلال از استون به سود و افزایش نسبت حلال به ماده جامد، خلوص افزایش یافته است که این مساله در شکل ۳ نیز قابل مشاهده است.

همانطور که در معادله (۲) مشاهده می شود، بزرگترین ضریب

طبیعی کورکومین نیز، نسبت حلال به ماده جامد، نسبت حلال‌ها به یکدیگر و زمان به ترتیب موثرترین فاکتورها بر استخراج رنگ طبیعی کورکومین گزارش شدند [۱۷].

۳-۳- بررسی اثر متغیرها در استخراج رنگ آناتو با روش ماسراسیون براساس بازده بیکسین/نوربیکسین

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم شاخص بازده بیکسین/نوربیکسین نشان داد که این مدل معنی دار نبوده و کیفیت مدل برای پیش بینی پایین می باشد ($R^2 = 63.8\%$) (جدول ۷).

استفاده قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که بین حلال‌های مورد استفاده محلول سود ۰/۲۵ درصد بهترین راندمان خلوص رنگ را نشان داده است که با نتایج تحقیق ما مطابقت دارد [۱۵]. چوین و همکاران (۲۰۱۲) دانه آناتو را با استفاده از حلال استون با نسبت‌های ۱:۱ و ۴:۱ ماده جامد به حلال تحت شرایط نور و تاریکی استخراج کردند. این محققان گزارش کردند که با کاهش نسبت دانه به حلال بازده استخراج به طور معنی دار کاهش می‌یابد. همچنین حذف نور تاثیر کمی بر افزایش راندمان استخراج داشته اما به طور معنی دار میزان ترکیبات فرار موجود در عصاره استونی آناتو را کاهش می‌دهد [۱۶].

در پژوهش بلوریان و همکاران (۱۳۹۰) بر روی استخراج رنگ

Table 7 Analysis of variance of different models for the yield of bixin/norbixin ratio

Source	Std. Dev	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	press
Linear	0.18	0.3565	0.2395	0.1074	0.97
2FI	0.20	0.4032	0.0302	-0.8690	2.02
Quadratic	0.18	0.6376	0.2148	-0.9027	2.06
Cubic	0.20	0.8456	-0.0033	-28.5141	31.95

شاخص خلوص نیز وزن بیکسین/نوربیکسین نسبت به رنگ استخراج شده مشخص می‌شود و نه نسبت به دانه آناتو. بنابراین از آنجا که در شاخص بازده بیکسین/نوربیکسین، وزن بیکسین/نوربیکسین نسبت به دانه آناتو بیان می‌شود، این شاخص جامع تر می‌باشد.

۳-۴- شرایط بهینه استخراج جهت بیشینه سازی بازده وزنی رنگ آناتو

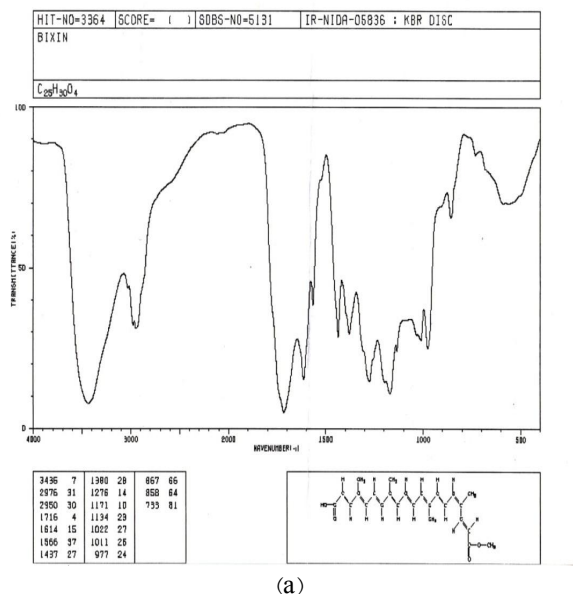
براساس نتایج مذکور، شرایط بهینه متغیرهای آزمون برای استخراج رنگ از دانه آناتو با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 پیش بینی شد. راندمان بیشینه تحت شرایط حلال هیدروکسید سدیم، دمای 67.41°C ، زمان ۲/۰۵ ساعت و نسبت حلال به ماده جامد ۵، معادل ۱۳/۳۱ پیش بینی گردید.

از آنجایی که شاخص بازده بیکسین/نوربیکسین حاصل از ضرب دو شاخص قبلی (بازده وزنی و خلوص رنگ) می‌باشد و از طرفی روند تغییر هرکدام از این شاخص‌ها با همدیگر کاملاً متفاوت است، بنابراین حاصلضرب نیز عددی متفاوت بوده که از روند مشخصی تبعیت نمی‌کند. مطابق جدول ۲، بیشترین خلوص (۲۶/۵٪) و بیشترین بازده بیکسین/نوربیکسین (۰/۶۲٪) یا ۰/۶۲ گرم به ازای ۱۰۰ گرم دانه آناتو) مربوط به نمونه ۱۵ (یعنی حلال استون و بیشترین نسبت حلال به ماده جامد، دما و زمان) می‌باشد اما بازده وزنی این نمونه بسیار پایین می‌باشد. در واقع این شاخص با هدف برطرف کردن نقص شاخص بازده وزنی و خلوص مطرح شد زیرا در شاخص بازده وزنی، همه ترکیبات استخراج شده، بیکسین و نوربیکسین نمی‌باشند بلکه ترکیبات دیگری نیز طی فرآیند استخراج، جداسازی شده‌اند. در

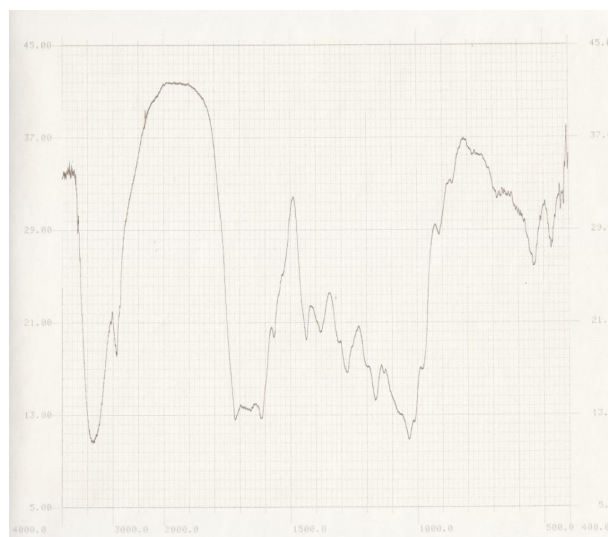
۳-۵- نتایج آزمون‌های تایید ساختار رنگ

استخراج شده

شکل ۴ طیف ¹H NMR ترسیم شده برای نمونه استخراج شده از دانه آناتو را نشان می‌دهد. ¹H NMR شامل کاربرد رزونانس مغناطیسی هسته با در نظر گرفتن اتم هیدروژن در مولکول برای تعیین ساختار مولکول می‌باشد که همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود با ساختار بیکیسین مطابقت دارد. مقایسه طیف IR بدست آمده از نمونه استخراج شده با طیف IR استاندارد، وجود بیکیسین را در ساختار نمونه تایید نمود (شکل ۵).



(a)



(b)

Fig 5 IR of standard sample (a), IR of extracted sample (b)

۳-۶- نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو به

صورت invitro

نتایج اندازه گیری تغییرات رنگی پودر آناتو طی نگهداری در ۳ تیمار نور- دمای محیط، تاریکی- دمای محیط و تاریکی- دمای یخچال در جدول ذیل آمده است.

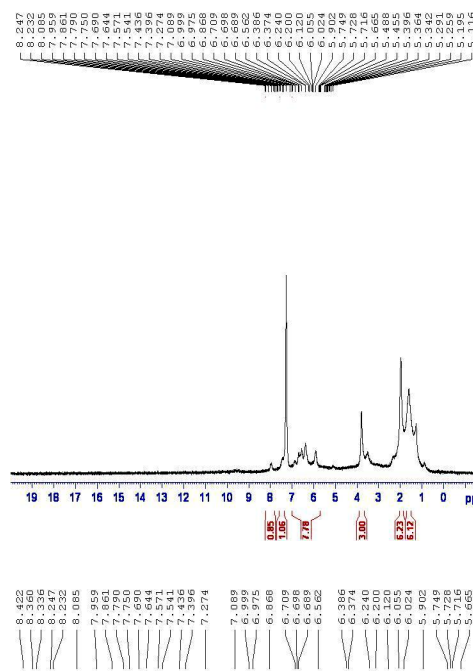


Fig 4 ¹H NMR spectrum of extracted color

Table 8 Effects of preservation conditions on color changes of annatto

Time (Week)	Storage condition	Color characteristics		
		L	a	b
0	Light- 25°C	15.96±0.035	9.91±0.05	4±0.05
	Dark- 25°C	15.96±0.035	9.91±0.05	4±0.05
	Dark- 4°C	15.96±0.035	9.91±0.05	4±0.05
2	Light- 25°C	16.12±0.23	11.6±0.3	5.99±0.11
	Dark- 25°C	15.65±0.1	11.31±0.08	5.94±0.06
	Dark- 4°C	14.85±0.3	11.84±0.31	6.139±0.3
4	Light- 25°C	16.53±0.41	12.18±0.37	6.86±0.22
	Dark- 25°C	16.14±0.37	11.59±0.29	6.32±0.16
	Dark- 4°C	14.65±0.19	11.43±0.13	5.85±0.08

کلروفورم طی دوره نگهداری می باشد [۱۸]. همچنین بالاس وای و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که کاهش معنی دار میزان بیكسین در اولتورزین آناتو، پودر آناتو و دانه آناتو نگهداری شده در شرایط نور اتاق در مقایسه با تیمارهای نگهداری شده در تاریکی مشاهده می شود [۱۹].

۳-۷- نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی

نتایج ارزیابی پایداری رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی آب پنیر در جدول ۹ آمده است.

Table 9 Mean of CIE parameter changes in different condition during 2 months.

37°C			25°C			Storage condition	Time (week)
b	a	L	b	a	L		
29.25±0.05	16.85±0.11	52.11±0.24	29.25±0.05	16.85±0.11	52.11±0.24	light	0
29.25±0.05	16.85±0.11	52.11±0.24	29.25±0.05	16.85±0.11	52.11±0.24	Dark	
30.28±0.08	19.04±0.04	49.37±0.41	29.86±0.09	18.74±0.47	48.30±0.08	light	4
29.69±0.16	16.75±0.17	51.16±0.24	28.48±0.08	19.04±0.24	47.76±0.24	Dark	
29.06±0.17	18.80±0.14	49.31±0.53	30.57±0.22	15.15±0.38	52.32±0.45	light	8
28.80±0.138	14.92±0.255	48.38±0.3	28.93±0.20	19.15±0.26	47.46±0.58	Dark	

همچنین مشاهده شد که حضور و عدم حضور نور در محیط نگهداری سبب تفاوت معنی دار میزان روشنی، قرمزی و زردی نمونه ها می شود. نور از طریق تسریع اکسیداسیون باندهای دوگانه کونژوگه کاروتنوئیدها میزان رنگ را کاهش می دهد (غفور و چوئی، ۲۰۰۹ و زانگ و همکاران، ۲۰۱۰) [۲۰ و ۲۱]. با گذشت زمان نیز از میزان روشنی نمونه ها کاسته شده (رنگ نمونه ها تیره تر شدند)، میزان قرمزی افزایش و میزان زردی

بر اساس آنالیز واریانس انجام شده تنها تاثیر نور-دمای محیط بر تغییرات رنگی نمونه ها معنی دار بود و دو تیمار تاریکی-دمای محیط و تاریکی-دمای یخچال تاثیر معنی داری بر تغییرات ویژگی های رنگی نداشتند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که موثرترین عامل در تغییرات رنگ پودر آناتو عامل نور می باشد که در صورت حذف آن با استفاده از بسته بندی های مناسب می توان کیفیت پودر رنگ های استخراجی را تا حدود زیادی حفظ نمود. تاثیر نور بر تجزیه بیكسین در مطالعات مختلفی نشان داده شده است از جمله نجار و همکاران (۱۹۸۸) نشان دادند که نور مهمترین عامل مخرب در بین عوامل مختلف همچون هوا، آنتی اکسیدان ها و پراکسیدان ها بر پایداری بیكسین در محلول

مطابق جدول ۴-۱۳، اثرات مستقل و متقابل همه متغیرهای محیطی شامل شرایط نور و تاریکی، دمای نگهداری و زمان نگهداری بر تغییرات میزان روشنی (پارامتر L) و تغییرات میزان قرمزی نمونه ها (پارامتر a) نمونه ها معنی دار بود ($p \leq 0.05$). تنها اثر مستقل دمای نگهداری بر فاکتور b معنی دار نبوده ($p > 0.05$) و نمونه های نگهداری شده در دمای محیط و دمای ۳۷ درجه میزان زردی مشابهی داشتند.

کاهش نشان داد. نسبت حلال به ماده جامد ۵ استخراج نمود. افزایش نسبت حلال به ماده جامد، بیشترین اثر مستقیم را بر بازده استخراج داشته و دما و زمان استخراج تاثیر معنی داری بر بازده استخراج نشان ندادند. مدل رگرسیونی درجه دوم تحت شرایط مختلف حلال و نسبت حلال به ماده جامد به خوبی خلوص رنگ آناتو را طی استخراج پیش بینی می کند. همچنین موثرترین عامل در تغییرات رنگ پودر آناتو، عامل نور تشخیص داده شد که در صورت حذف آن با استفاده از بسته بندی های مناسب می توان کیفیت پودر رنگ های استخراجی را تا حدود زیادی حفظ نمود. نتایج مشابهی در خصوص پایداری پودر رنگ آناتو در سیستم مدل غذایی پودر آب پنیر مشاهده شد.

۵- منابع

- [1] Nigg, J.T.1, Lewis, K., Edinger, T., Falk, M. 2012. Meta-analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 51(1):86-97.
- [2] Li, j., Zhang, L. & Liu, Y. 2013. Optimization of extraction of natural pigment from purple sweet potato by response surface methodology and its stability. *Journal of Chemistry*, 5 -10.
- [3] Preston, H.D., & Rickard, M. D. 1980. Extraction and chemistry of annatto. *Food Chemistry*, 5:47-56.
- [4] Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P. G., Rao, D. G., 2003. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.), *Journal of Food Science and Technology*;40:2:131-141.
- [5] Henry, B.S., (1996). Natural food colours, in *Natural Food Colorants*. G.A.F. Hendry and J.D. Houghton, Eds. Chapman & Hall, New York. pp: 40-79 .
- [6] Lauro, G.J. 1991. A primer on natural Colors. *Cereal Foods World*, 36: 949-953.
- [7] Alves de Lima, R.O., Azevedo, L., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F. 2003. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 189-

در مجموع می توان نتیجه گرفت در نمونه های نگهداری شده در تاریکی رنگ نمونه ها درخشانتر (روشنی بیشتر و زردتر) می باشد که لزوم نگهداری رنگ استخراج شده در شرایط بسته بندی غیرقابل نفوذ به نور را نشان می دهد. همچنین مطالعات بیشتر به منظور تعیین عمر ماندگاری این رنگ ها ضروری می باشد.

در پژوهش های دیگری نیز پایداری رنگ آناتو مورد مطالعه قرار گرفته است. از جمله پایداری رنگ محلول های آناتو تجاری با در معرض قرار دادن آنها در برابر دماهای ۹۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵۰ دقیقه توسط فرایر و همکاران (۱۹۹۹) مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه میزان روشنی، قرمزی و غلظت نوربیکسین تعیین شد. بر طبق گزارش این محققان طی حرارت دیدن میزان زردی افزایش و میزان قرمزی کاهش می یابد که ناشی از تخریب بیکسین می باشد. بررسی سینتیک واکنش نشان داده است که تخریب ویژگی های رنگی از واکنش درجه اول تبعیت کرده و تخریب نوربیکسین با واکنش های درجه دوم برازش می شود [۲۲].

رائو و همکاران (۲۰۰۴) نیز پایداری رنگ آناتو را در سیستم مدل غذایی تحت شرایط پخت متفاوت مورد بررسی قرار دادند. آنها نیز گزارش کردند که بیکسین در دماهای پایین پایداری مناسبی داشته اما دماهای بالا سبب تخریب ساختار آن می شود.

۴- نتیجه گیری کلی

در آینده نزدیک کاربرد رنگ های طبیعی در محصولات غذایی با آگاهی بیشتر مصرف کنندگان و افزایش محدودیت های قانونی برای استفاده از رنگ های سنتزی افزایش می یابد. لذا تولید، تعیین شرایط کاربرد و بررسی پایداری رنگ های طبیعی در سیستم های مدل غذایی مختلف ضروریست. با توجه به اهمیت سلامت بخشی رنگ های طبیعی و وجود منابع طبیعی بالقوه فراوان برای استخراج این نوع رنگ ها، استخراج و کاربرد رنگ های طبیعی در محصولات غذایی مختلف قدمی ارزشمند در ارتقاء سطح سلامت عمومی جامعه خواهد بود. بر اساس یافته های این پژوهش، رنگ آناتو را می توان تحت شرایط بهینه حلال هیدروکسید سدیم، دمای 41/46 °C، زمان ۲/۰۵ ساعت و

- pigments from natural source *Bixa orellana* Linn. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 10; (4): 7-22.
- [16] Chuyen, H.V., Hoi, N. T.N. & Eun, J.B. 2012. Improvement of bixin extraction yield and extraction quality from annatto seed by modification and combination of different extraction methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 47:1333-1338.
- [17] Bolourian, Sh., Khalilian, S., and Khalilian, M. 2013. Extraction of curcumin from *Curcuma longa*: Optimization condition of extraction with ultrasound waves by RSM, *EJFPP*, 5(2), 75-89.
- [18] Najar, S.V., Bobbio, F.O. & Bobbio, P.A. 1988. Effects of light, air, anti-oxidants and pro-oxidants on annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chemistry*, 29: 283-289.
- [19] Balaswamy, K., Prabhakara Rao, P.G., Satyanarayana, A. & Rao, D.G. 2006. Stability of bixin in annatto oleoresin and dye powder during storage. *LWT*, 39: 952-956.
- [20] Ghafoor, K., 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.
- [21] Zhang, L.L., Xu, M., Wang, Y.M., Wu, D.M., Chen, J.H. 2010. Optimizing ultrasonic Ellagic Acid extraction conditions from infructescence of *Platycarya strobilacea* using response surface methodology, *Molecules*, 15:7923-7932.
- [22] Ferreira, J.M., Sousa, D.F., Dantas, M.B., Fonseca, S.G.C., Menezes, D.B., Martins, A.M.C., deQueiroz, M.G.R., 2013. Effects of *Bixa orellana* L. Seeds on Hyperlipidemia, *Phytother. Res.*, 27:144-147.
- 192.
- [8] Ramamoorthy, S., Palackan, M.G., Maimoon, L., Geetha, T., Bhakta, D., Balamurugan, P., and Rajanarayanan, S. 2011. Evaluation of Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Properties of Some Food Dye. *Food Science and Biotechnology*, 20(1): 7-13.
- [9] Tibodeau, J.D., Isham, C.R., Bible, K.C. 2010. Annatto Constituent Cis-Bixin Has Selective Antimyeloma Effects Mediated by Oxidative Stress and Associated with Inhibition of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(7): 987-997.
- [10] Iranian National Standardization Organization (INSO) (14410). Food additives - Permitted food colors - Annatto extracts (bixin) - Test methods (2011).
- [11] Hill, W.J. and Hunter, W.G. 1966. A review of response methodology: A literature survey, *Technometrics*, 8 (4): 571-590.
- [12] 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.
- [13] Wasmund N, Topp I, Schories D. 2006. Optimising the storage and extraction of chlorophyll samples. *Oceanologia*; 48:125-144.
- [14] – Saberian, H. Hosseini, F. Bolourian, Sh. 2016 The effect of ultrasonic method on the extraction of chlorophyll food color from the leaves of Shatot tree. *Scientific Quarterly of New Technologies in the Food Industry*; 4(16):67-76.
- [15] Chowdhury, A. I., Molla, A. I., Sarker, M., Rana, A. A., Ray, S. K., Nur, H. P., Karim, m. m. 2010. Preparation of edible grade dye and



Optimization of annatto dye extraction in semi-industrial scale and evaluation of its stability in laboratory scale and food model system

Hosseini, F. ^{1*}, Saberian, H. ², Bolourian, Sh. ³, Afshari, M. ⁴

1. Assistant professor, Department of Food Additives, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Khorasan Razavi, Iran.
2. Assistant professor, Technical center for agriculture, ACECR, Isfahan University of technology branch, Isfahan, Iran.
3. Associate professor, Department of Food Additives, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Khorasan Razavi, Iran.
4. Chief Executive Officer, Golchin-e Toos Natural Additive knowledge-based company (Afzooneh).

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 09/ 22

Accepted 2022/ 11/ 23

Keywords:

Annatto extraction,
Optimization,
Color yield,
Color Purity,
L*.

DOI: 10.22034/FSCT.19.132.135

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.132.10.3

*Corresponding Author E-Mail:
f.hoseini@acecr.ac.ir

ABSTRACT

In this research, the effects of solvent type, solvent to seed ratio, temperature and time of extraction on the yield, the color purity and the yield of bixin/norbixin of annatto were studied. Central Composite Design with 4 parameters including of solvent type (acetone, NaOH and acetone-NaOH), solvent to seed ratio (1:1 to 5:1 ml/g), time (2-6 h) and temperature of extraction (25-65 °C) in three levels (-1, 0 and +1) was employed. The results indicated that the quadratic model was significant for the yield of annatto and $R^2 = 0.915$, indicating that 91.5 % of the change in the responses could be predicted by the fitted model. In addition, the temperature and time of extraction had no any significant effect on the extraction yield. The maximum yield was predicted by NaOH under the 46.41 °C, 2.05 h and solvent to seed ratio of 5:1, which was 13.31 %. The quadratic model was significant for the color purity of annatto and $R^2 = 0.848$. By changing the solvent from acetone to NaOH and increasing the solvent to seed ratio, the color purity increased. Furthermore, bixin/ norbixin yield, which is the weight ratio of bixin or norbixin to annatto seed, was determined and calculates as a comprehensive response. The most effective factor in the color change of annatto powder was determined as light and if it removed, using suitable packaging, it would be possible to maintain the best quality of the powder. Similar results were obtained regarding the stability of annatto dye in the whey powder.