مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۳ شماره ۳/ سال ۱۴۰۲/ صفحات ۱ تا۲۱
DOI:10.22034/FR.2023.54920.1861

بررسی تاثیر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مختلف بر کیفیت و پایداری رنگدانه‌های آنتوسیانین غنی‌سازی شده شاه‌توت

مرجان مقیمی[۱]، منا خرازی*[۲]، مهدی هاشمی[۳] و نوشین نوشیروانی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۸

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲] پژوهشگر پسا دکتری، گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
[۳] استاد، گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
[۴] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده فنی و منابع طبیعی تویسرکان، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
* مسئول مکاتبه: Email: kharazi.mona@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: آنتوسیانین‌ها مهمترین رنگدانه‌های فلاونوئیدی هستند که به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، به حفظ سلامتی انسان کمک می‌کنند. این ترکیبات غیرسمی و محلول در آب بوده و با داشتن رنگ‌های جذاب و درخشان قرمز، آبی و ارغوانی، جایگزین‌های مناسبی برای رنگ‌های شیمیایی مضر می‌باشند. میوه شاه‌توت یکی از منابع غنی آنتوسیانین در طبیعت است. وجود رنگ ارغوانی تیره در کنار مواد مغذی فراوان، سبب شده آنتوسیانین‌های موجود در شاه‌توت به‌عنوان رنگ خوراکی سالم و مؤثر در صنایع غذایی مورد توجه قرار گیرد. با این وجود شرایط فیزیکی و شیمیایی نامطلوب می‌تواند باعث فساد و تغییر رنگ در رنگدانه‌های طبیعی این میوه شود. **هدف:** هدف از این پژوهش بررسی دقیق خواص آنتوسیانین‌های میوه شاه‌توت و شناخت عوامل موثر در ماندگاری و تخریب آن‌ها به منظور یافتن روش‌های محافظتی مناسب و متعاقبا به‌کارگیری آنتوسیانین‌ها در صنایع غذایی می‌باشد. **روش کار:** در این پژوهش پس از استخراج و غنی‌سازی آنتوسیانین موجود در میوه شاه‌توت و تعیین خواص آن، به بررسی اثر پارامترهای مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند درجه حرارت و نور، وجود آنزیم‌ها، تغییر pH، حضور اکسیژن و اضافه کردن افزودنی‌های مجاز خوراکی بر کیفیت و پایداری رنگدانه‌های آن پرداخته شد و راه‌های بهینه سازی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج نشان دهنده حضور سیانیدین ۳-گلیکوزید به‌عنوان آنتوسیانین غالب در شاه‌توت بود. نور، درجه حرارت، دور شدن از pH طبیعی نمونه‌ها و حضور اکسیژن باعث کاهش پایداری آنتوسیانین به میزان ۵۶/۵ تا ۸۸/۲ ٪ می‌گردد. اضافه کردن افزودنی‌های مجاز خوراکی نظیر گاز کربنیک، سیتریک اسید، گلوکز، سوربیتول و گاز ازت موجب پایداری بیشتر رنگدانه‌ها می‌گردد به طوری که نمونه‌ها در محیط تاریک و نور غیرمستقیم رنگ خود را به ترتیب تا میزان ۹۸/۸ و ۹۳/۶ ٪ حفظ می‌نمایند.

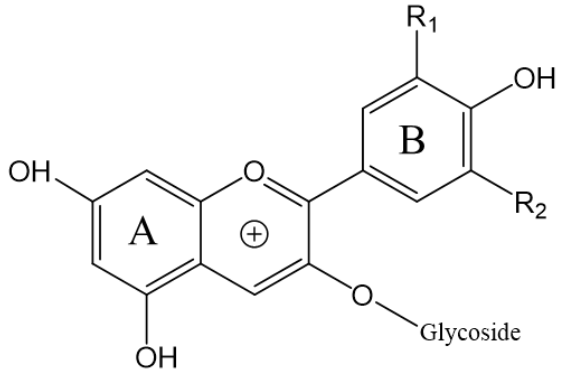
واژگان کلیدی: آنتوسیانین، شاه‌توت، عوامل پایداری، رنگدانه‌های طبیعی

مقدمه

آنتوسیانین‌ها از مهمترین رنگدانه‌های طبیعی هستند که رنگ‌های قرمز، آبی و ارغوانی میوه‌ها، سبزی‌ها و گل‌ها را ایجاد می‌کنند (لی و همکاران ۲۰۰۵؛ هاگتون و همکاران ۲۰۲۱). این ترکیبات غیرسمی و محلول در آب بوده و به‌عنوان رنگ‌های غذایی و ترکیبات دارویی استفاده می‌شوند (باچرت و همکاران ۲۰۰۵). آنتوسیانین‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و به دلیل دارا بودن گیرنده‌های رادیکال آزاد اثرات ضد سرطانی و ضد التهابی داشته و به سلامت قلب و عروق، تقویت بینایی و کاهش سطح تری گلیسیریدها و اسیدهای چرب آزاد کمک می‌کنند (چاندراسخار و همکاران ۲۰۱۲؛ ساندوال رامیرز و همکاران ۲۰۱۸).

آنتوسیانین‌ها، آنتوسیانیدین‌های گلیکوزیدی و آسیل گلیکوزیدی قابل حل در آب هستند (باچرت و همکاران ۲۰۰۵؛ چاندراسخار و همکاران ۲۰۱۲) که از دسته مشتقات گلیکولیزه پلی هیدروکسی و پلی متوکسی کاتیون فلاویلیوم بوده و از زیرگروه‌های فلاونوئیدها محسوب می‌شوند (لی و همکاران ۲۰۰۵). آنتوسیانین‌ها فراوانترین ترکیبات رنگی در بین فلاونوئیدها هستند به طوری که تاکنون حدود ٥٤٠ نوع آنتوسیانین از منابع مختلف گیاهی شناسایی شده است (آندرسون و جوردهیم ۲۰۰٦). سیانیدین، پلاروگونیدین، دلفینیدین، پتونیدین، پئونیدین و مالویدین از جمله مهمترین و فراوان‌ترین آنتوسیانین‌ها می‌باشند (کلیفورد ۲۰۰۰؛ فنگ ۲۰۱۵). ساختار شیمیایی انواع آنتوسیانین‌ها در شکل (۱) نمایش داده شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، قسمت اصلی آنتوسیانین‌ها بخش آنتوسیانیدین یا آگلیکون آن‌ها می‌باشد که شامل پیوندهای دو گانه مزدوج است. آنتوسیانیدین شامل حلقه آروماتیک A است که به حلقه هتروسیکلیک دارای اکسیژن متصل شده و این حلقه نیز با پیوند کربن- کربن به حلقه آروماتیک B پیوند خورده است (کاستاندا اواندو و همکاران ۲۰۰۹).



Name	R_1	R_2
Pelargonidin	–H	–H
Cyanidin	–OH	–H
Peonidin	$–OCH_3$	–H
Delphinidn	–OH	–OH
Petunidin	$–OCH_3$	–OH
Malvidin	$–OCH_3$	$–OCH_3$

شکل ۱- ساختار کلی انواع آنتوسیانین‌ها (متئوس و دی فریتاس ۲۰۰۸).

Figure 1- The structure of all types of anthocyanins

به دلیل کمبود الکترون، این بخش بسیار واکنش‌پذیر است. انجام واکنش‌های شیمیایی با تخریب آنتوسیانین‌ها و تغییر رنگ نامطلوب ماده غذایی همراه است (نتزل و همکاران ۲۰۰۲؛ هاگتون و همکاران ۲۰۲۱). هنگامی که آنتوسیانیدین با یک قند گلیکولیزه می‌شود، به آن آنتوسیانین گفته می‌شود (کاستاندا اواندو و همکاران ۲۰۰۹). مولکول آنتوسیانین شامل سه قسمت اصلی ۱- پایه آگلیکون، ۲- قند و ۳- یک گروه از اسیدهای آسیله است. پایه آگلیکون به خودی خود بسیار ناپایدار است ولی چسبیدن قند به آن یعنی گلیکولیزه شدن، باعث افزایش پایداری می‌شود (متئوس و دی فریتاس ۲۰۰۸). برحسب تعداد مولکول‌های قند موجود، آنتوسیانین‌ها به سه دسته مونوگلیکوزیدها، دی‌گلیکوزیدها و تری‌گلیکوزیدها تقسیم می‌شوند (متئوس و دی فریتاس ۲۰۰۸). به دلیل گلیکولیزه شدن هیدروکسیل آزاد، دی‌گلیکوزیدها بسیار پایدارتر از مونوگلیکوزیدها می‌باشند؛ هرچند به دلیل حضور مولکول قند اضافه در ساختمانشان، تمایل بیشتری به واکنش‌های قهوه‌ای شدن دارند (کو و مان ۲۰۰۸).

امروزه بیشتر مواد غذایی مورد استفاده حاوی رنگ می‌باشند. متاسفانه اغلب رنگ‌های استفاده شده در صنایع غذایی منبع شیمیایی داشته و به‌عنوان عوامل سرطان‌زا، آلرژی‌زا و ایجاد کننده اختلالات گوارشی شناخته می‌شوند (امین و همکاران ۲۰۱۰؛ خرازی و صاین ۲۰۲۲). به همین دلیل گرایش به استفاده از رنگ‌های طبیعی روز به روز در حال افزایش است. آنتوسیانین‌ها با داشتن رنگ‌های جذاب و درخشان و همچنین دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی، جایگزین‌های مناسبی برای رنگ‌های شیمیایی مضر می‌باشند (بونو و همکاران ۲۰۱۲).

میوه شاه‌توت[1] یکی از منابع غنی آنتوسیانین‌ها در طبیعت بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارد تا جایی که طبق گزارش انجمن تغذیه آمریکا، دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بین ٤٠ نوع میوه مختلف است (فلگینس و همکاران ۲۰۰۲). این امر به دلیل وجود میزان بالای آنتوسیانین در رنگ ارغوانی تیره آن بوده و "درجه ظرفیت جذب رادیکال‌های آزاد" را به‌عنوان شاخص اندازه‌گیری تاثیر مواد غذایی در پیشگیری از سرطان، به رقم ٥٣٥٠ در هر صد گرم شاه‌توت می‌رساند (ون البی و لویس ١٩٨٦). این میوه منبع خوبی از ویتامین‌های A، B، C ، E و K و نیز آهن، پتاسیم، منگنز، منیزیم، نیاسین، ریبوفلاوین، فولیک اسید، گلوکز و تانن می‌باشد (گندوگدو و همکاران ۲۰۱۱). با فراوری درست عصاره شاه‌توت، می‌توان از آنتوسیانین‌های آن نه تنها به‌عنوان رنگ طبیعی بلکه به‌عنوان شیرین کننده‌ای بی ضرر و ماده‌ای با خواص ریز مغذی عالی در صنایع غذایی گوناگون استفاده نمود.

با این وجود هسته آنتوسیانین‌ها به دلیل کمبود الکترون بسیار ناپایدار بوده و واکنش پذیری زیادی دارد. این واکنش‌ها باعث تخریب آنتوسیانین‌ها و تغییر رنگ رنگدانه آن‌ها می‌شود (بونو و همکاران ۲۰۱۲؛ هاگتون و همکاران ۲۰۲۱) که ممکن است کاربرد آنتوسیانین‌ها را به‌عنوان رنگدانه‌های غذایی محدود کند. بر این اساس شناخت عوامل موثر در تخریب آنتوسیانین‌ها و یافتن روش‌های محافظتی، نقشی اساسی در حفظ آنتوسیانین‌ها و متعاقبا به‌کارگیری آن‌ها در صنایع غذایی خواهد داشت. از جمله مهمترین عوامل تاثیرگذار بر پایداری آنتوسیانین‌ها می‌توان به دما، نور، حضور آنزیم‌ها، تغییر pH، وجود یون‌های فلزی، اکسیژن، آسکوربیک اسید، دی اکسید گوگرد، قندها و فرآورده‌های تجزیه‌ای آن‌ها، ساختمان و غلظت آنتوسیانین‌ها و واکنش‌های کوپیگمنتیشن[2] یا درون پوشانی اشاره نمود (ریس و سیسنروس زوالس ۲۰۰۷).

بر این اساس پژوهش‌های بسیاری در رابطه با استخراج آنتوسیانین‌ها از میوه‌ها و سبزیجات و بررسی پایداری و خواص آن‌ها در برابر عوامل گوناگون انجام شده است (صاین و همکاران ۲۰۲۲). در این رابطه پایداری آنتوسیانین‌ها در برابر نور و دما در چندین مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده که افزایش دما و شدت نور از مهمترین عوامل تخریب کننده آنتوسیانین‌ها می‌باشند. به‌عنوان مثال آنتوسیانین موجود در رنگ‌های استخراجی از تفاله انگور در محیط تاریک و نور مستقیم به ترتیب ٤١٦ روز و ١٩٧ روز پایدار می‌ماند (فرانسیس و مارکاکیس ١٩٨٩). در تحقیقی دیگر که بر روی سرکه انجام شد، مشخص گردید که دی‌گلیکوزیدهای آسیله شده بیشترین و منوگلیکوزیدها کمترین مقاومت به تجزیه شدن در برابر نور را دارند و دی‌گلیکوزیدهای غیر آسیله بینابین آن‌ها قرار می‌گیرند (لاله و همکاران ٢٠٠٦؛ دی روسو و مرکادانته ٢٠٠٧؛ روبها و همکاران ٢٠١١). همچنین تخریب حرارتی آنتوسیانین‌های کلم قرمز، آلبالو، انار، انگور و توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفته است (سیمیرگلو و همکاران ١٩٩٤؛ دیربی و همکاران ٢٠٠١؛ ریس و سیسنروس زوالس ٢٠٠٧). نتایج نشان داده که در دمای

[1] Morus Nigra

[2] Copgmentation

۳ درجه سانتی‌گراد طول عمر آنتوسیانین‌ها ۱۰۵۳٦ روز بوده و با افزایش دما تا ۸ درجه سانتی‌گراد به ۸۰ روز کاهش می‌یابد. به‌علاوه حضور اکسیژن نیز باعث تخریب آنتوسیانین‌ها می‌شود (ریمون و همکاران ۲۰۰۰؛ نوشیروانی و فصیحی ۱٤۰۱). بسته‌بندی تحت خلأ و استفاده از گاز ازت، اثر تخریب اکسیژن را به حداقل رسانده و باعث ثبات این رنگدانه می‌شود (وانگ و همکاران ۲۰۰٤). در سایر پژوهش‌ها تأثیر pH بر پایداری آنتوسیانین موجود در چهار گونه زرشک، موز و هویج سیاه بررسی گردید (لاله و همکاران ۲۰۰٦؛ تورکر و اردوگدو ۲۰۰٦؛ روبها و همکاران ۲۰۱۱). نتایج نشان داد که آنتوسیانین‌ها در محیط‌های اسیدی مقاومت بیشتری نسبت به محیط‌های قلیایی وخنثی دارند. حضور افزودنی‌های مختلف مانند قندها بر پایداری آنتوسیانین‌ها اثرگذار است. این تاثیر به ساختار، غلظت و نوع قند بستگی دارد. بر این اساس در برخی تحقیقات انجام شده، قندها باعث تخریب آنتوسیانین‌ها شده‌اند (دی روسو و مرکادانته ۲۰۰۷). در تحقیقی دیگر با اندازه‌گیری شاخص تجزیه[1] (DI)، نیمه عمر و انرژی فعال سازی تجزیه آنتوسیانین‌ها نشان داده شد که ساکارز[2] یک حفاظت کننده خوب برای آنتوسیانین‌ها می‌باشد (تسایی و همکاران ۲۰۰٤). در این مطالعه مشخص شد که انرژی فعال سازی تجزیه آنتوسیانین برای غلظت‌های ۲۰، ٤۰ و ٦۰ درصد ساکارز به ترتیب برابر با ۱٤/۷۸، ۱۷/۳۲ و ۱۸/۲۱ کیلو کالری بر مول می‌باشد. در پژوهشی دیگر گزارش گردید که قندها با مهار واکنش‌های آنزیمی، آنتوسیانین‌ها را در طول ذخیره سازی محافظت کرده و از قهوه‌ای شدن و شکل‌گیری رنگدانه‌های پلیمری جلوگیری می‌کنند (هاگتون و همکاران ۲۰۲۱). همچنین کاهش فعالیت آب توسط قندها از تخریب آنتوسیانین‌ها جلوگیری می‌نماید (دی آنسوس و همکاران ۱۹۹۹).

با در نظر گرفتن مطالب ذکر شده در مورد اهمیت آنتوسیانین‌ها و نیز با توجه به ناپایداری و حساسیت آن‌ها، یافتن مواد و روش‌هایی که به پایداری بیشتر آنتوسیانین‌ها کمک کند، ضروری به نظر می‌رسد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد متاسفانه تا به امروز تحقیق جامعی بر روی استخراج، غنی‌سازی، ماندگاری، شرایط نگهداری و فرآیند بسته‌بندی آنتوسیانین‌های میوه شاه‌توت انجام نشده و هیچ کاربرد صنعتی برای مواد فراوری شده این میوه در صنایع غذایی گزارش نگردیده است. بر این اساس در این پژوهش پس از استخراج و غنی‌سازی آنتوسیانین موجود در میوه شاه‌توت و تعیین خواص آن، به بررسی اثر پارامترهای مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند درجه حرارت، نور، وجود آنزیم‌ها، تغییر pH، حضور اکسیژن و اضافه کردن افزودنی‌های مجاز خوراکی بر کیفیت و پایداری این رنگدانه‌ها پرداخته شده و راه‌های بهینه سازی آن‌ها مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی استفاده شده به منظور استخراج آنتوسیانین‌های شاه‌توت و آزمایش‌های تکمیلی، همگی با خلوص تجزیه‌ای تهیه شده و بدون خالص سازی بیشتر به کار گرفته شدند. برای تنظیم pH از هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید با غلظت ۰/۱ نرمال استفاده گردید. به منظور ساخت محلول‌های آبی و رقیق سازی، از آب دیونیزه با هدایت الکتریکی کمتر از ۰/۰۷ میکروثانیه بر سانتی‌متر استفاده شد. خلوص و شرکت سازنده مواد مورد استفاده در جدول (۱) آورده شده است.

آماده سازی نمونه‌های شاه‌توت: شاه‌توت‌ها به میزان ۵ کیلوگرم از مجموعه باغ‌های کن تهران تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور دستیابی به یکنواختی

[1] Decomposition Index

[2] Sucrose

قابل قبول، میوه‌های رسیده و سالم جدا و سایر میوه‌ها حذف شدند. نمونه‌های باقی‌مانده شسته و توزین شده و تا زمان استخراج و آزمایش‌های تکمیلی در شیشه‌های در بسته درون فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- خلوص و شرکت سازنده مواد اولیه استفاده شده

Table 1- Purity and manufacturer of used raw materials

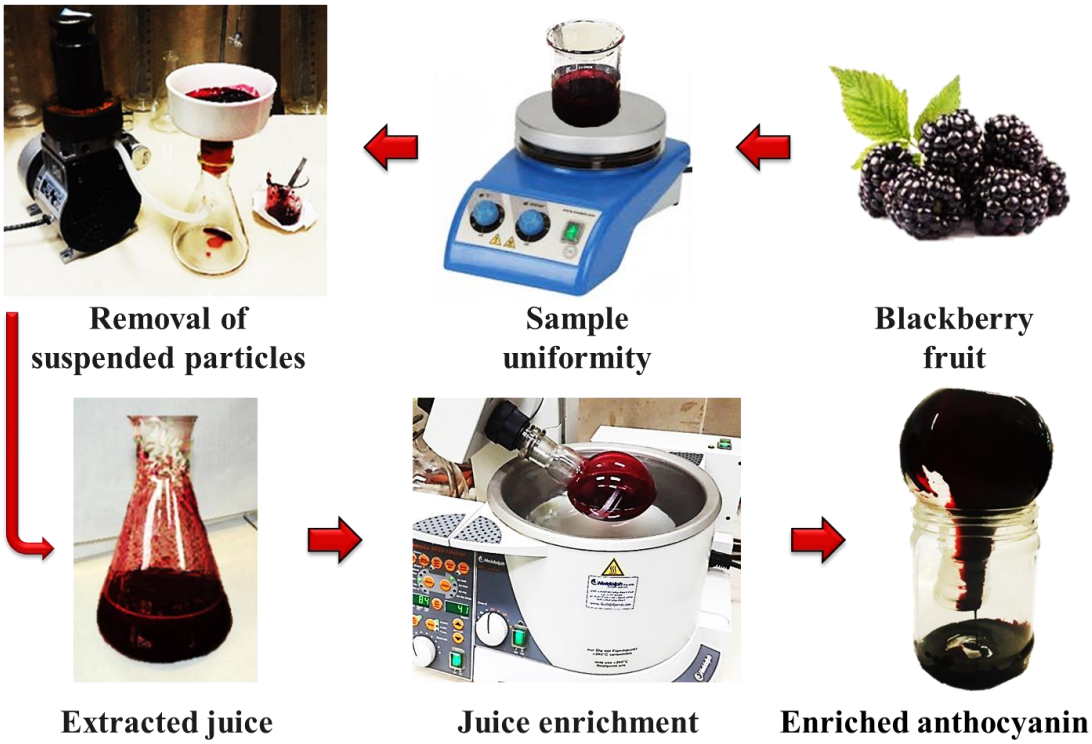
Material	**Manufacturer**	Purity
Ethanol	Merck (Germany)	> 0.99
Phenolphthalein	Biochem (India)	> 0.98
Toluene	Merck	> 0.99
Citric acid	Merck	> 0.99
Sodium carbonate	Merck	-
Hydrochloric acid	Merck	0.37
Sodium hydroxide	Merck	> 0.99
Glucose	Merck	-
Sorbitol	Merck	-

استخراج و غنی‌سازی آنتوسیانین

جهت استخراج آنتوسیانین موجود در میوه شاه‌توت، ابتدا نمونه‌ها از فریزر خارج شده و پس از بر طرف شدن یخ‌زدگی در دمای اتاق، ۵۰ گرم از میوه شاه‌توت به وسیله ترازوی دیجیتال (مدل EB4300D) با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و به منظور یکنواختی، با استفاده از مخلوط‌کن به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. در ادامه ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول اتانول ۰/۱ درصد اسیدی (اتانول + هیدروکلریک اسید) به‌عنوان حلال استخراجی به آن اضافه و به مدت ۱ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. جهت حذف ذرات ریز معلق، محلول حاصل با استفاده از قیف بوخنر تحت خلأ و کاغذ صافی وات من شماره ۱ صاف گردید. به منظور غنی‌سازی عصاره‌ی به‌دست آمده و همچنین حذف حلال استخراجی، نمونه‌ها به بالن مخصوص دستگاه روتاری (Heidolph آلمان) منتقل و به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا حلال آن‌ها به طور کامل تبخیر شود. پس از عبور عصاره از لوله‌ها و کندانس شدن، عصاره غنی‌سازی شده که تقریبا آنتوسیانین‌های خالص شاه‌توت می‌باشد، در بالن مخصوص جمع آوری شد (چیریبوگا و فرانسیس ۱۹۷۰؛ سیلوا و همکاران ۲۰۱۷). آنتوسیانین‌های غنی‌سازی شده با این روش تا زمان استفاده برای شناسایی ترکیبات مورد نظر، درون شیشه‌های کوچک قهوه‌ای رنگ و داخل یخچال نگه داشته شدند. مراحل غنی‌سازی آنتوسیانین‌های میوه شاه‌توت در شکل (۲) نشان داده شده است.

اندازه‌گیری خواص فیزیکی و شیمیایی آنتوسیانین استخراج شده

اندازه‌گیری درصد ماده‌ی خشک، رطوبت و مواد جامد محلول: بوته چینی حاوی ۵ گرم میوه شاه‌توت تازه با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شده و به مدت ۲ ساعت در اتوکلاو (ریحان طب) در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و تحت خلأ قرار داده شد. سپس نمونه خشک شده در دسیکاتور سرد شده و پس از توزین مجدد، درصد ماده‌ی خشک محاسبه گردید. به منظور اندازه‌گیری رطوبت، به ۱۰ گرم میوه شاه‌توت تازه ۲۰۰ میلی‌لیتر تولوئن به‌عنوان حلال اضافه شد و به بالن دستگاه تقطیر منتقل گردید. در اثر حرارت، حلال و آب محتوی نمونه هر دو تبخیر و سپس تقطیر شده و در انتها، درون ظرف مدرج جمع آوری شدند. با توجه به بیشتر بودن وزن مخصوص آب نسبت به حلال، آب در پایین و حلال در قسمت بالا قرار گرفتند. براین اساس عدد مقابل سطح آب، مقدار آب موجود در نمونه را مشخص می‌کند. مواد جامد محلول در عصاره‌ی استخراج شده، به وسیله رفرکتومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری گردید.



شکل ۲- مراحل غنی‌سازی آنتوسیانین‌های میوه شاه‌توت

Figure 2- Enrichment stages of anthocyanins of blackberry fruit

اندازه‌گیری درصد خشک شدن عصاره‌ی شاه‌توت توسط تونل باد: ۱۵۰ گرم میوه شاه‌توت تازه در هاون چینی کوبیده شد. عصاره‌ی به‌دست آمده با استفاده از صافی صاف شده و به ظرف مخصوص منتقل گردید. نمونه‌ها با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شده و به مدت ۷ ساعت در تونل باد قرار گرفتند. پس از اطمینان از خشک شدن کامل نمونه‌ها، وزن نهایی آن‌ها اندازه‌گیری و درصد خشک شدن با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید:

رابطه (۱)

$$\text{درصد خشک شدن} = \frac{\text{وزن نهایی نمونه} - \text{وزن اولیه نمونه}}{\text{وزن اولیه نمونه}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری اسیدیته و pH به منظور جلوگیری از ایجاد خطا در تیتراسیون به دلیل غلظت بالا، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره غنی‌سازی شده شاه‌توت با استفاده از آب دیونیزه تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد. به ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آماده شده، ۱ میلی‌لیتر محلول فنل فتالئین به‌عنوان شناساگر اضافه و با استفاده از سدیم هیدروکسید استاندارد با غلظت ۰/۱ نرمال تیتر گردید. با معادل در نظر گرفتن ۱ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال با ۰/۰۰۶۷ گرم مالیک اسید، اسیدیته شاه‌توت طبق رابطه (۲) محاسبه گردید (بولتون ۱۹۸۰):

رابطه (۲)

$$\text{اسیدیته کل} = \frac{۰/۰۰۶۷ \times ۰/۱ \text{ نرمال سدیم هیدروکسید} \times \text{میلی‌لیتر}}{\text{وزن نمونه}}$$

همچنین ۱۰ میلی‌لیتر عصاره غنی‌سازی شده شاه‌توت با استفاده از آب دیونیزه تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شده و با استفاده از دستگاه pH متر (Metrohm مدل Corning سوییس)، pH آن اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین کل در عصاره غنی‌سازی شده: به منظور جلوگیری از ایجاد خطا به دلیل غلظت بالا، ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره غنی‌سازی شده شاه‌توت با استفاده

از آب دیونیزه تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد. برای جداسازی مواد جامد معلق، نمونه‌های آماده شده به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به وسیله دستگاه سانتریفیوژ[1] (Eppendorf)، سانتریفیوژ شدند. برای اطمینان از شفاف بودن و عدم وجود کدورت، میزان جذبی محلول‌های سانتریفیوژ شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Hach امریکا) در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که هیچ گونه جذبی را نشان نداد.

در مرحله بعد میزان آنتوسیانین کل عصاره غنی‌سازی شده با استفاده از روش اختلاف pH اندازه گیری گردید (لی و همکاران ۲۰۰۵). برای این منظور pH نمونه‌ها با استفاده از محلول هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید غلیظ در مقادیر pH = ۱ و pH = ٤/٥ تنظیم و پس از ۲۰ دقیقه، جذب هریک از محلول ها در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. در نهایت با داشتن میزان جذب در pHهای فوق، مقدار جذب و غلظت آنتوسیانین کل در عصاره غنی‌سازی شده برحسب میلی‌گرم بر لیتر معادل سیانیدین ۳-گلیکوزید از روابط (۳) و (٤) محاسبه گردید:

رابطه (۳)

$$Absorbance = (A_{520nm} - A_{700nm})\text{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})\text{pH4.5}$$

رابطه (٤)

$$Concentration = \frac{A}{\varepsilon L}.10^{3}.MW.DF$$

که A مقدار جذب محاسبه شده از رابطه (۳)، ε ضریب جذب مولی سیانیدین ۳-گلیکوزید و برابر با ۲۹٦۰۰ لیتر بر مول، MW وزن مولکولی سیانیدین ۳-گلیکوزید و برابر با ٤٤۹/۲ گرم بر مول، L طول سل اسپکتروفوتومتر و برابر با ۱ سانتی‌متر و 10^{3} ضریب تبدیل گرم به میلی‌گرم می‌باشند. همچنین DF فاکتور رقت و در این پژوهش برابر با ۵ است.

شناسایی آنتوسیانین‌های موجود در شاه‌توت: به منظور تجزیه و تحلیل آنتوسیانین‌های موجود در عصاره غنی شده، از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[2] (HPLC) استفاده گردید. به این منظور از از دستگاه کروماتوگرافی (Waters آمریکا) مجهز به آشکارساز UV/Vis و ستون C_{18} (2.1 mm×100 mm; particle size: 1.7 µm) استفاده شد. حلال‌های آب حاوی ۱/۰ درصد فرمیک اسید (A) و استونیتریل (B) فاز متحرک را تشکیل می‌دادند. برنامه‌ی شست وشوی گرادیانی کروماتوگرافی به صورت ۰ تا ۲۰ دقیقه با ۲۰ درصد B، ۲۰ تا ۲۵ دقیقه با ٤۰ درصد B، ۲۵ تا ۳۰ دقیقه با ٦۰ درصد B، ۳۵ دقیقه با ۹۰ درصد B و ٤۰ دقیقه با ۵ درصد B، در سرعت جریان ثابت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، تنظیم شدند. بعد از اسکن آشکارسازدر طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر، کروماتوگرام‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر بدست آمدند (علی‌قورچی و همکاران ۲۰۱۳). همچنین حجم تزریقی به دستگاه ۱۰ میکرولیتر بود.

به‌علاوه از روش طیف سنجی جذبی مرئی-ماورای بنفش (UV/Vis) و مقایسه حداکثر جذب جهت شناسایی نوع آنتوسیانین‌های موجود در شاه‌توت استفاده گردید. به این منظور ابتدا برای جداسازی مواد جامد معلق، عصاره غنی‌سازی شده شاه‌توت به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول سانتریفیوژ شده تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رقیق شده و طیف جذبی مرئی-ماورای بنفش (UV/Vis) آن در محدوده طول موجی ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر ثبت و نوع آنتوسیانین‌ها با مقایسه پیک نمونه با استاندارد متناظرشان شناسایی گردید.

بررسی پایداری رنگدانه‌های آنتوسیانین استخراج شده

اندازه‌گیری پایداری در برابر نور و درجه حرارت: ۱۵۰ گرم میوه شاه‌توت تازه در هاون چینی کوبیده شده و

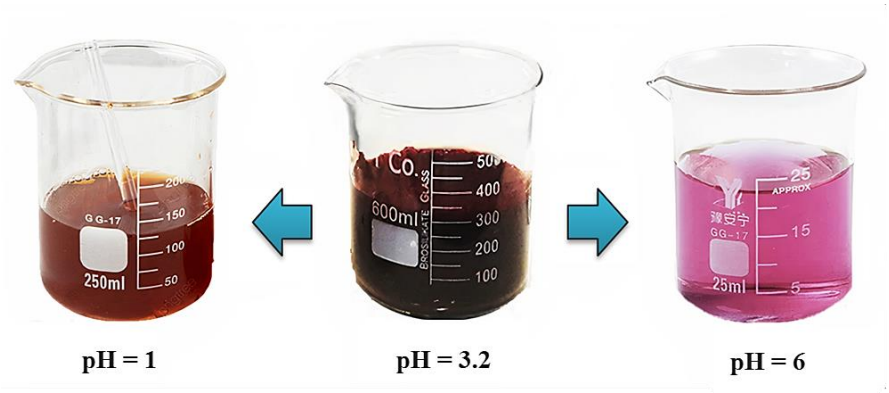
[1] Centrifuge

[2] High Performance Liquid Chromatography

عصاره‌ی به‌دست آمده با استفاده از صافی صاف گردید. حجم‌های مساوی (۱۰ میلی‌لیتر) از نمونه به‌دست آمده در لوله‌های آزمایش ریخته شده و به مدت چهار هفته در مجاورت نور مستقیم، نور غیر مستقیم، محیط تاریک و یخچال قرار گرفتند. همچنین برای بررسی اثر دما، نمونه‌ها در یخچال، دمای محیط و دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند.

اندازه‌گیری پایداری عصاره آنزیم بری شده شاه‌توت: به منظور غیر فعال شدن آنزیم‌ها، عصاره غنی‌سازی شده به مدت سه دقیقه در ۸۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد (عمل آنزیم بری). حجم‌های مساوی (۱۰ میلی‌لیتر) از نمونه آماده شده در لوله‌های آزمایش ریخته شده و به مدت چهار هفته در مجاورت نور مستقیم، محیط تاریک و یخچال قرار گرفتند.

اندازه‌گیری پایداری در pH های مختلف: به منظور اندازه‌گیری اثر pH بر پایداری آنتوسیانین‌های موجود در شاه‌توت، pH عصاره غنی‌سازی شده با استفاده از محلول‌های هیدروکلریک اسید و کربنات سدیم در مقادیر pH = ١ تا pH = ٦ تنظیم شده و به همراه نمونه شاهد (pH = ٣/٢) به مدت چهار هفته در محیط تاریک قرار داده شدند و سپس طیف جذبی مرئی-ماورای بنفش (UV/Vis) آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در محدوده طیفی ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر ثبت شد. تصویر نمونه‌های آماده شده در pH طبیعی و بیشتر و کمتر از آن در شکل (۳) نشان داده شده است.



شکل ۳- نمونه‌های آماده شده در pH طبیعی و بیشتر و کمتر از آن

Figure 3- Samples prepared at normal pH and more and less than that

اندازه‌گیری پایداری در حضور و عدم حضور اکسیژن: حجم‌های مساوی (۱۰ میلی‌لیتر) از عصاره غنی‌سازی شده در دو لوله آزمایش ریخته شدند. لوله آزمایش اول به مدت ۳۰ دقیقه توسط پمپ هوا، هوادهی شد و هوای لوله آزمایش دوم تخلیه و با گاز ازت پر گردید. پس از آماده سازی، نمونه‌ها به مدت چهار هفته در محیط تاریک قرار داده شدند.

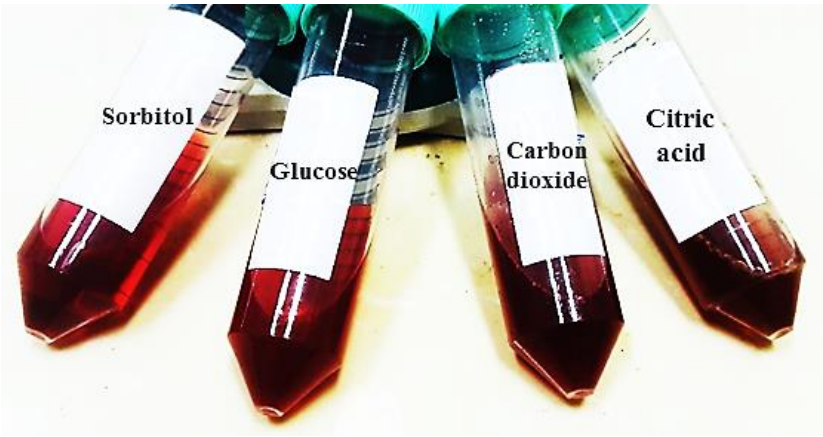
اندازه‌گیری پایداری در حضور افزودنی‌های مجاز خوراکی: حجم‌های مساوی (۵ میلی‌لیتر) از عصاره غنی‌سازی شده در ده لوله فالکون ریخته شده و به هرکدام یک افزودنی مجاز خوراکی شامل ۱ گرم سوربیتول، ۱ گرم گلوکز، ۵ میلی‌لیتر گاز کربنیک با خلوص بیش از ۹۹/۹ درصد و ۵ میلی‌لیتر سیتریک اسید ۰/۰۱ مولار اضافه گردید. همچنین به منظور مقایسه صحیح، یک نمونه خالص به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد. لازم به توضیح است که

سوربیتول یک قند الکلی با درجه شیرینی نصف ساکارز می‌باشد و به‌عنوان شیرین کننده در غذاهای افراد دیابتی و مواد کنسروی استفاده می‌شود (گابای ۱۹۷۳). برای هر افزودنی اضافه شده و همچنین نمونه شاهد، نیمی از

نمونه‌ها در مجاورت نور مستقیم و نیم دیگر در محیط تاریک قرار داده شده و پس از دو هفته نتایج ثبت گردیدند. تصویر نمونه‌های آماده شده در شکل (٤) نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مختلف بر اساس میانگین سه تکرار ± انحراف معیار گزارش شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٥ ٪ و توسط طرح کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذیرفت.



شکل ۴- آماده سازی نمونه‌ها در حضور افزودنی‌های مجاز خوراکی.

Figure 4- Preparation of samples in the presence of permitted food additives.

نتایج و بحث

بررسی نتایج استخراج آنتوسیانین

آنتوسیانین‌ها در حلال‌های قطبی محلول هستند به همین جهت برای استخراج آن‌ها از گیاهان، از متانول یا اتانول که شامل مقداری هیدروکلریک اسید یا فرمیک اسید است، استفاده می‌شود (متیویر و همکاران ۱۹۸۰). حلال‌های اسیدی با تخریب دیواره سلول‌های بافت گیاهی، باعث سهولت انحلال رنگدانه و در نتیجه افزایش بازده استخراج می‌شوند. به‌علاوه اسید به پایداری رنگدانه کمک می‌کند (متیویر و همکاران ۱۹۸۰). با این حال باید به این نکته توجه نمود که باقی مانده حلال‌های آلی مثل متانول و استن در غذا، استفاده از آن‌ها را در صنایع غذایی محدود می‌کند. بنابراین انتخاب مناسب حلال استخراجی و بهینه سازی عملکرد آن، نقشی اساسی در حفظ آنتوسیانین‌ها و به‌کارگیری آن‌ها در صنایع غذایی به همراه خواهد داشت. بهترین روش، روشی است که بیشترین میزان رنگ را با کمترین مقدار تخریب و ناخالصی استخراج نماید (سانتوس و همکاران ۲۰۲۲). براین اساس روش‌های گوناگون استخراج رنگ از میوه شاه‌توت شامل استفاده از حلال‌های متفاوت و دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت مشخص شد به‌کاربردن حلال‌های اتانول اسیدی و متانول اسیدی و سپس تبخیر حلال در خلأ و دمای پایین بهترین بازدهی را در استخراج رنگ از میوه شاه‌توت دارد. این نتایج نشان می‌دهند که هر چه ساختار حلال مشابهت و تناسب بیشتری با ساختمان رنگ استخراج شده داشته باشد، درصد استخراج بیشتر می‌شود. با در نظر گرفتن سمیت کمتر (واترهوس ۲۰۰۲)، محلول اتانول ۰/۱ درصد اسیدی (اتانول + هیدروکلریک اسید) به‌عنوان حلال استخراجی در نظر گرفته شد. به طور خلاصه در این پژوهش از

روش استخراج فاز مایع – جامد، جداسازی فاز استخراجی و تبخیر بعدی حلال استخراجی در خلأ و دماهای پایین ۳۰ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد به منظور استخراج آنتوسیانین استفاده گردید که به طور کامل در بخش‌های قبلی شرح داده شده است.

تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی آنتوسیانین استخراج شده

درصد ماده‌ی خشک، رطوبت و مواد جامد محلول: خواص فیزیکی و شیمیایی عصاره استخراج شده در جدول (۲) گزارش شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، درصد ماده خشک، رطوبت و مواد جامد محلول به ترتیب برابر با ۱۵، ۸۵ و ١٤/٥ درصد می‌باشند که نشان دهنده بالا بودن میزان رطوبت عصاره شاه‌توت است. مشخص نمودن درصد این مواد چه از نقطه نظر نگهداری صحیح آنتوسیانین استخراج شده و چه از نظر انتخاب روش مناسب غنی‌سازی و پودر کردن عصاره استخراجی از اهمیت بالایی برخوردار است.

درصد خشک شدن عصاره‌ی شاه‌توت توسط تونل باد: طبق نتایج آزمایش، وزن نمونه‌ها قبل و بعد از قرار گرفتن در تونل باد به ترتیب برابر با ١١٦/٢٠ و ٢٨/٥٤ گرم می‌باشد. بر این اساس و با استفاده از رابطه (۱)، درصد خشک شدن عصاره‌ی شاه‌توت در داخل تونل باد برابر با ۷۵ درصد به‌دست آمد (جدول ۲). پس از حل کردن پودر خشک شده و رقیق سازی، میزان رنگ با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین و مشخص شد که رنگ پودر خشک شده ثابت بوده و به همان شدت اولیه می‌باشد. بنابراین خشک کردن آب شاه‌توت به وسیله‌ی تونل باد در مقایسه با خشک کردن تحت خلأ مناسب‌تر بوده و رنگ به خوبی حفظ می‌شود. این ویژگی، پودر کردن و نگهداری طولانی مدت این رنگ را برای استفاده در صنایع امکان‌پذیر می‌سازد.

اسیدیته و pH عدد اسیدیته کل (برابر با ٦) و pH (برابر با ۳/۲)، نشان دهنده خاصیت اسیدی عصاره شاه‌توت می‌باشد که با توجه به وجود مالیک اسید به‌عنوان اسید غالب در میوه شاه‌توت (گاندوگدو و همکاران ۲۰۱۱)، کاملا مورد انتظار است. اسیدیته‌ی بالا و pH پایین شاه‌توت امکان استفاده از این رنگ به‌عنوان عامل اسیدی کننده یا خنثی کننده در محصولات با pH بالا را نیز فراهم می‌نماید.

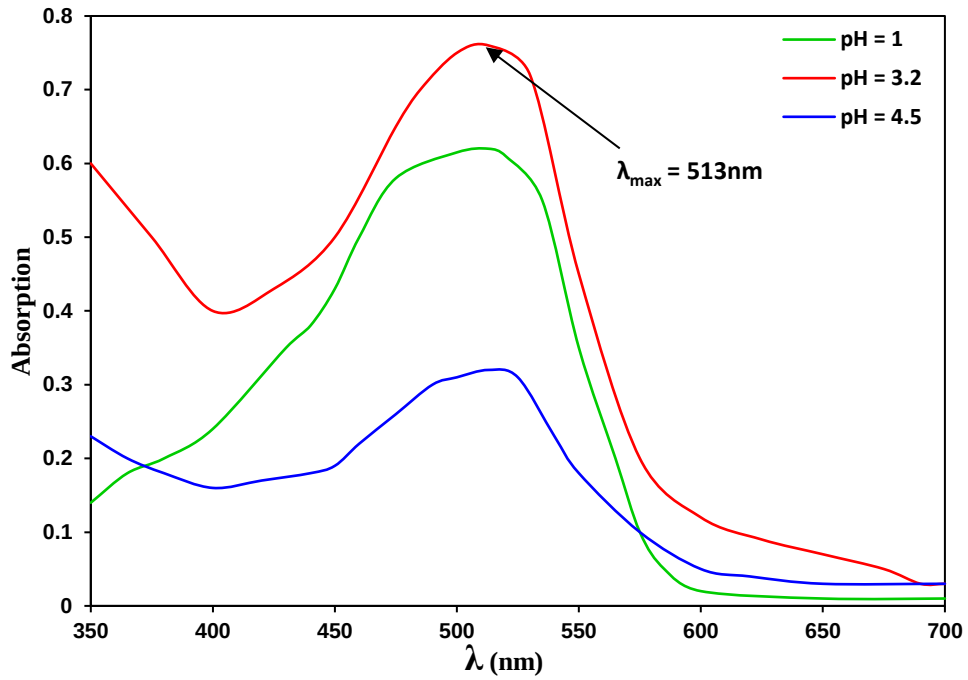
جدول ۲- خواص فیزیکی و شیمیایی آنتوسیانین استخراج شده از میوه شاه‌توت

Table 2- Physical and chemical properties of anthocyanins extracted from blackberry fruit

Physical and chemical property	Amount
Dry matter (%)	15 ± 0.8
Moisture content (%)	85 ± 3.2
Total soluble solid (%)	14.5 ± 1.1
Drying rate (%)	75 ± 2.8
Total acidity	6 ± 0.02
pH	3.2 ± 0.02
Total anthocyanin concentration (mg/L)	24.3 ± 1.7

آنتوسیانین کل در عصاره غنی‌سازی شده: به منظور محاسبه غلظت آنتوسیانین موجود در عصاره غنی‌سازی شده، طیف جذبی مرئی–ماورای بنفش (UV/Vis) نمونه‌ها در pH = ۱ و pH = ٤/٥ ثبت گردید (شکل ٥). بر اساس طیف های حاصله، بالاترین میزان جذب در pH = ۱ و pH = ٤/٥ به ترتیب برابر با ٠/٦٢ و ٠/٣٢ است. بر این اساس و با استفاده از روابط (۳) و (٤)، میزان جذب و آنتوسیانین کل در عصاره غنی‌سازی شده میوه‌ی شاه‌توت به ترتیب برابر با ٠/٣٢ و ٢٤/٣ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که میزان قابل توجهی است و نشان دهنده غنی‌سازی مناسب آنتوسیانین استخراج شده می‌باشد.

این نتایج همچنین نشان می‌دهد که هرچه از pH طبیعی محصول دور شویم، میزان جذب کاهش می‌یابد که به دلیل عدم پایداری آنتوسیانین‌ها با تغییر pH می‌باشد. بنابراین بالاترین غلظت آنتوسیانین و طبیعتا بالاترین مقدار جذب در pH طبیعی شاه‌توت (محدوده ۳ تا ۳/٥) وجود دارد.

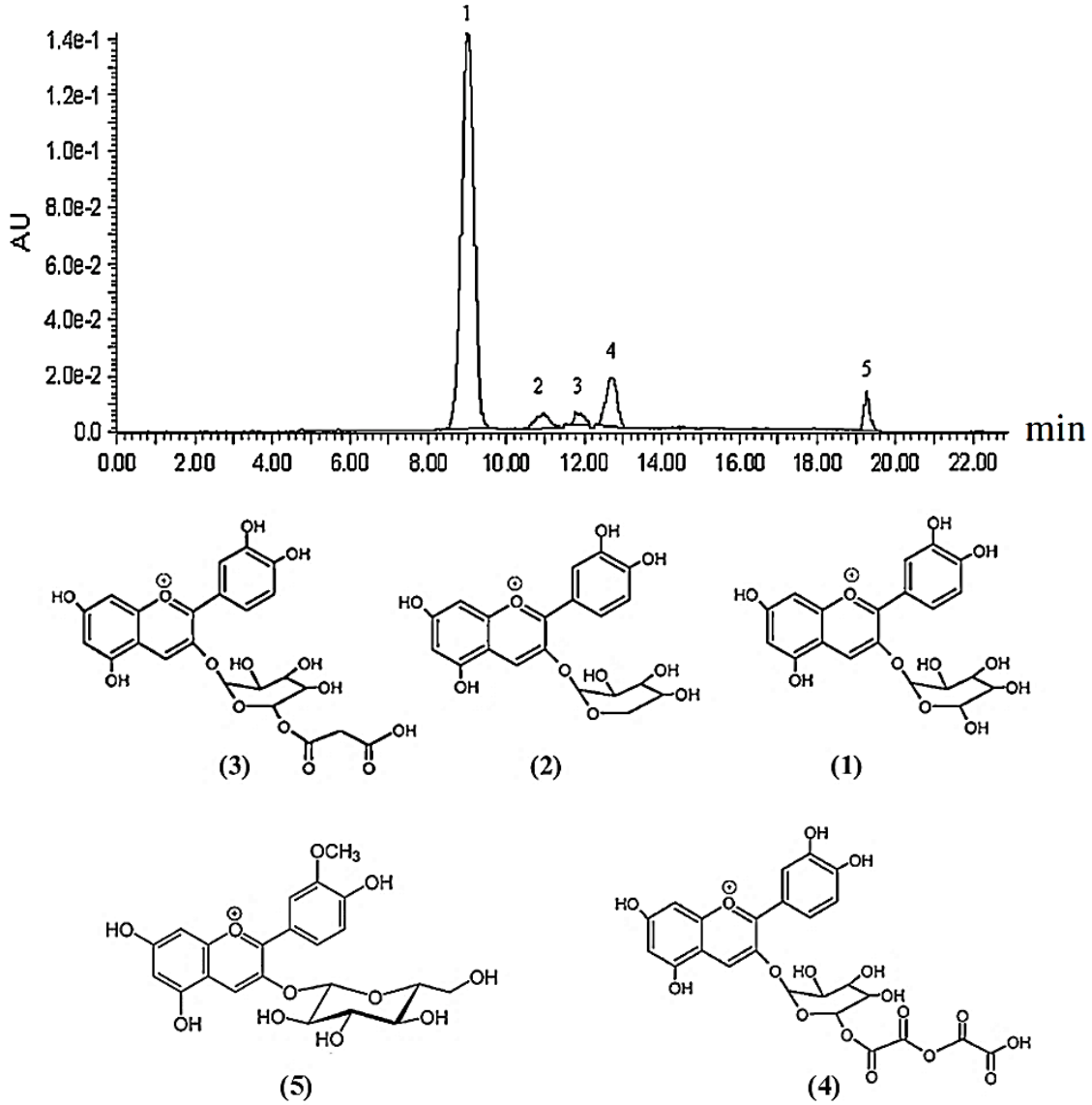


شکل ۵- میزان جذب آنتوسیانین شاه‌توت برحسب طول موج در pHهای مختلف (جذب در ناحیهٔ ۵۲۰ نانومتر شاخص آنتوسیانین‌ها می‌باشد)

Figure 5- The amount of absorption of blackberry anthocyanins in terms of wavelength at different pHs (absorption in the region of 520 nm is an indicator of anthocyanins)

شناسایی آنتوسیانین‌های موجود در شاه‌توت: بر اساس تجزیه و تحلیل کروماتوگرام HPLC به‌دست آمده، پنج آنتوسیانین در عصاره استخراج شده شاه‌توت شناسایی گردید که شامل یک قله اصلی و چهار قله جزئی می‌باشند (شکل ٦). همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان آنتوسیانین موجود در عصاره شاه‌توت مربوط به پیک ۱ است که سیگنال قوی را در زمان بازداری ۹ دقیقه نشان می‌دهد. با مقایسه با داده های گزارش شده قبلی (استینتزینگ و همکاران ۲۰۰٦؛ تیان و همکاران ۲۰۰٦)، مشخص گردید که این پیک مربوط به سیانیدین ۳-گلیکوزید[1] است. در پژوهش‌های دیگری که بر روی آنتوسیانین‌های استخراج شده از شاه‌توت انجام گرفته است نیز سیانیدین ۳-گلیکوزید به عنوان آنتوسیانین غالب در این میوه معرفی گردیده است (رزی و همکاران ۲۰۰۳؛ تیواری و همکاران ۲۰۰۵). به طور مشابه، سایر آنتوسیانین‌های شناسایی شده شامل سیانیدین ۳-او-آرابینوزید[2] (پیک (۲) با زمان بازداری ۱۱ دقیقه)، سیانیدین ۳-او-مالونیل گلیکوزید[3] (پیک (۳) با زمان بازداری ۱۱/۸ دقیقه)، سیانیدین ۳-او-دی اکسالیل گلیکوزید[4] (پیک (٤) با زمان بازداری ۱۲/۷ دقیقه) و پئونیدین ۳-او-گلیکوزید[5] (پیک (٥) با زمان بازداری ۱۹/۳ دقیقه)، می‌باشند. ساختارهای شناسایی شده در شکل (٦) نمایش داده شده‌اند. این نتایج نیز تا حد زیادی با نتایج حاصل در سایر پژوهش‌ها همخوانی دارد (وو و پریور ۲۰۰۵).

[1] Cyanidin-3-glucoside
[2] Cyanidin-3-O-arabinoside
[3] Cyanidin-3-O-malonyl-glucoside
[4] Cyanidin-3-O-dioxalyl-glucoside
[5] Peonidin-3-O-glucoside



شکل ۶- کروماتوگرام HPLC عصاره آنتوسیانین غنی شده در طول موج ۵۲۰ نانومتر و ساختارهای شیمیایی مختلف آنتوسیانین‌های شناسایی شده. (۱): سیانیدین ۳-گلیکوزید (۲): سیانیدین ۳-او-آرابینوزید (۳): سیانیدین ۳-او-مالونیل گلیکوزید (۴): سیانیدین ۳-او-دی اکسالیل گلیکوزید (۵): پئونیدین ۳-او-گلیکوزید.

Figure 6- HPLC chromatogram of enriched anthocyanin extract at 520 nm wavelength and different chemical structures of identified anthocyanins. (1): cyanidin 3-glycoside (2): cyanidin 3-O-arabinoside (3): cyanidin 3-O-malonyl glycoside (4): cyanidin 3-O-dioxalyl glycoside (5): peonidin 3-O- Glycoside.

همچنین بر اساس طیف جذبی مرئی-ماورای بنفش (UV/Vis) عصاره استخراج شده، حداکثر جذب در طول موج ۵۱۳ نانومتر می‌باشد (شکل ۵). با مقایسه نتایج به‌دست آمده با استانداردهای متناظر، سیانیدین ۳-گلیکوزید به‌عنوان آنتوسیانین غالب در عصاره استخراج شده از میوه شاه‌توت شناسایی گردید که تایید کننده و مطابق با نتایج حاصله از HPLC می‌باشد.

پایداری رنگدانه‌های آنتوسیانین استخراج شده

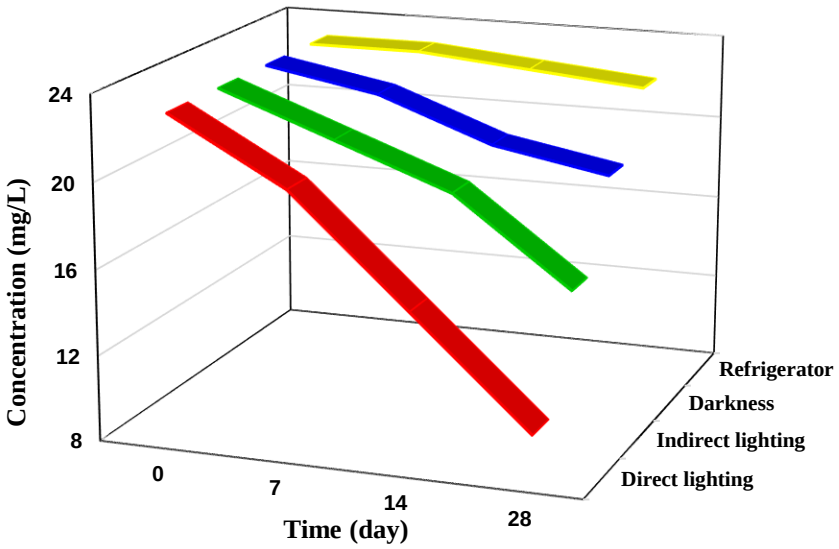
هسته آنتوسیانین‌ها به دلیل کمبود الکترون، واکنش پذیری بالایی دارد. این واکنش‌ها سبب تغییر رنگ این رنگدانه شده (هاگتون و همکاران ۲۰۲۱) و می‌تواند

کاربرد آنتوسیانین‌ها را به‌عنوان رنگ خوراکی در صنایع غذایی محدود نماید. بر این اساس نیاز است که رفتار آنتوسیانین‌ها در برابر عوامل تخریب کننده به خوبی مطالعه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد. از میان فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی گوناگون، نور، دما، آنزیم‌ها، pH، اکسیژن و همچنین اضافه کردن افزودنی‌های مجاز خوراکی مانند گلوکز، سوربیتول، گاز کربنیک، سیتریک اسید، گاز ازت و فرآورده‌های تجزیه‌ای آن‌ها اثرات بیشتری بر پایداری آنتوسیانین‌ها می‌گذارند (ریس و سیسنروس زوالس ۲۰۰۷). در این بخش پایداری رنگدانه‌های آنتوسیانین استخراج شده در برابر هر یک از این عوامل مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج به‌دست آمده به شرح زیر می‌باشند.

پایداری در برابر نور و درجه حرارت: نمودارهای تغییرات غلظت رنگدانه‌های آنتوسیانین با زمان در شرایط دمایی و نوری مختلف در شکل (۷) نمایش داده شده است. نتایج به‌دست آمده در مورد پایداری نمونه‌ها نشان می‌دهد که:

- نمونه در نور مستقیم کاملاً تغییر رنگ داده و تیره‌تر شده و کپک نیز رشد کرده است.
- نمونه در نور غیرمستقیم تغییر رنگ داده و تیره‌تر شده و کپک نیز رشد کرده است.
- نمونه در محیط تاریک تقریبا به رنگ خود باقی مانده و مقدار اندکی کپک رشد کرده است.
- نمونه در یخچال رنگ خود را حفظ کرده است و هیچ کپکی رشد نکرده است.

آزمایشات فوق نشان می‌دهد که نور تاثیر زیادی بر پایداری آنتوسیانین‌ها داشته و باعث تخریب آن‌ها تا میزان ۵۶/۵ ٪ می‌گردد. بر این اساس نمونه‌هایی که در نور مستقیم و نور غیر مستقیم قرار می‌گیرند تغییر رنگ می‌دهند ولی نمونه نگهداری شده در محیط تاریک تغییر رنگ محسوسی را نشان نمی‌دهد. علت این تغییر رنگ، تجزیه‌ی فوتوشیمیایی هیدروکسیل آزاد کربن شماره‌ی ۵ در ساختمان آنتوسیانین است. طبق تحقیقات جدید، با افزودن یک واحد گالیک اسید یا تانیک اسید، تاثیر نور بر تجزیه رنگ‌ها کاهش می‌یابد (لاله و همکاران ۲۰۰۶؛ روبها و همکاران ۲۰۱۱).



شکل ۷- تغییرات غلظت رنگدانه‌های آنتوسیانین با زمان در شرایط دمایی و نوری مختلف

Figure 7- Changes in the concentration of anthocyanin pigments with time in different temperature and light conditions

با مقایسه نمونه‌های نگهداری شده در دمای محیط و یخچال که هر دو در محیط تاریک قرار داشته‌اند مشاهده می‌شود که کاهش دما تاثیر چشمگیری بر رنگ نمونه‌ها ندارد اما از رشد کپک‌ها جلوگیری می‌کند. از سوی دیگر، دمای بالاتر از ٤٥ درجه سانتی‌گراد باعث تخریب آنتوسیانین‌ها و تغییر رنگ آن‌ها می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند بین افزایش دما و تخریب آنتوسیانین ارتباط نمایی وجود دارد (هلسترم و همکاران ۲۰۱۳). همچنین هاگتون و همکاران نشان دادند که تجزیه آنتوسیانین‌ها با حرارت در یک واکنش سه مرحله‌ای اتفاق می‌افتد: مرحله اول تشکیل کربونیل و هیدرولیز باندهای گلیکوزیدی، مرحله دوم باز شدن حلقه فلاویلیوم و تشکیل کالکول و مرحله سوم تشکیل دی کتون و تولید رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ (هاگتون و همکاران ۲۰۲۱).

پایداری عصاره‌ی آنزیم بری شده‌ی شاه‌توت: نتایج آزمایشات انجام شده نشان دادند که پس از گذشت چهار هفته:

- نمونه آنزیم بری شده در نور غیرمستقیم رنگ خود را حفظ کرده و کپک نیز رشد کرده است.
- نمونه آنزیم بری شده در محیط تاریک رنگ خود را حفظ کرده است و مقدار اندکی کپک رشد کرده است.
- نمونه آنزیم بری شده در یخچال رنگ خود را حفظ کرده است و هیچ کپکی رشد نکرده است.

این آزمایش نشان می‌دهد که آنزیم‌های طبیعی موجود در میوه‌ی شاه‌توت باعث تخریب آنتوسیانین‌ها می‌شوند و با غیر فعال کردن آن‌ها، رنگ محصول در نور غیر مستقیم به خوبی حفظ می‌گردد، در حالی که در بخش قبل مشاهده گردید که در نمونه‌های آنزیم بری نشده، نور غیر مستقیم باعث تخریب رنگ نمونه‌ها و تیره و فاسد شدن آن‌ها می‌شود. همچنین آنزیم بری به جلوگیری از رشد کپک‌ها کمک می‌کند.

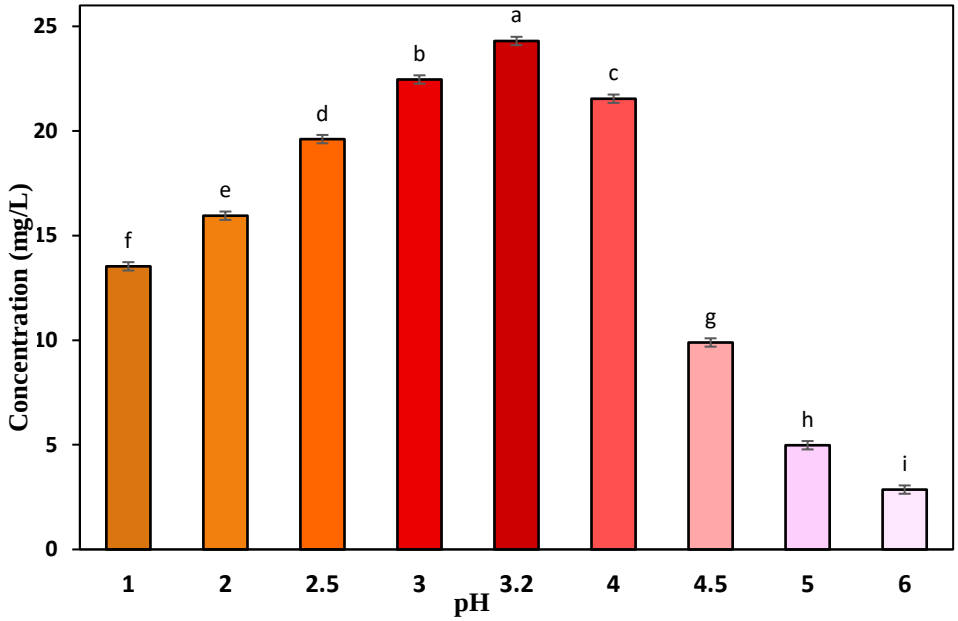
پایداری در pHهای مختلف: شکل (۸) نشان دهنده غلظت و شدت رنگ آنتوسیانین شاه‌توت در pHهای مختلف می‌باشد. مشاهده می‌شود که بالاترین غلظت آنتوسیانین و بیشترین شدت رنگ، در محدوده‌ی ٤-۳ = pH است که متناظر با pH طبیعی آنتوسیانین استخراج شده (۳/۲ = pH) می‌باشد. با افزایش pH (pH > ٤) رنگ نمونه به صورتی مایل به بنفش تغییر کرده و بعد از گذشت ۱۰ روز کاملا بی رنگ می‌شود. همان‌طور که در شکل (۸) نیز مشخص شده است، با افزایش pH غلظت آنتوسیانین به شدت کاهش یافته و در ٦ = pH غلظت آن به پایین‌ترین میزان خود می‌رسد. این امر نشان دهنده‌ی تخریب کامل آنتوسیانین با افزایش pH است که منجر به کاهش ۸۸/۲ ٪ شدت رنگ و بی رنگ شدن نمونه‌ها می‌گردد. از سوی دیگر با کاهش pH، رنگ نمونه‌ها به نارنجی مایل به قهوه‌ای تغییر می‌کند. با این وجود آنتوسیانین تحت شرایط اسیدی پایدارتر بوده و غلظت بالاتری دارد.

علت این تغییر رنگ ساختارهای شیمیایی مختلف آنتوسیانین در pHهای مختلف می‌باشد (شکل ۹). در pHهای اسیدی، آنتوسیانین به فرم کاتیون فلاویلیوم با رنگ قرمز تا قهوه‌ای و محلول در آب است. اما با افزایش pH به مشتقات کوینونوئید[1] و کالکون[2] تبدیل می‌شود که باعث از دست رفتن رنگ آن می‌گردد (هاگتون و همکاران ۲۰۲۱).

همچنین تغییرات غلظت آنتوسیانین در pHهای مختلف نشان می‌دهد که pH نه تنها بر رنگ آنتوسیانین اثر گذار است، بلکه بر پایداری آن نیز موثر بوده و آنتوسیانین در شرایط اسیدی مقاومت بیشتری نسبت به شرایط خنثی و قلیایی دارد (هاگتون و همکاران ۲۰۲۱).

[1] Quinonoid

[2] Calcone

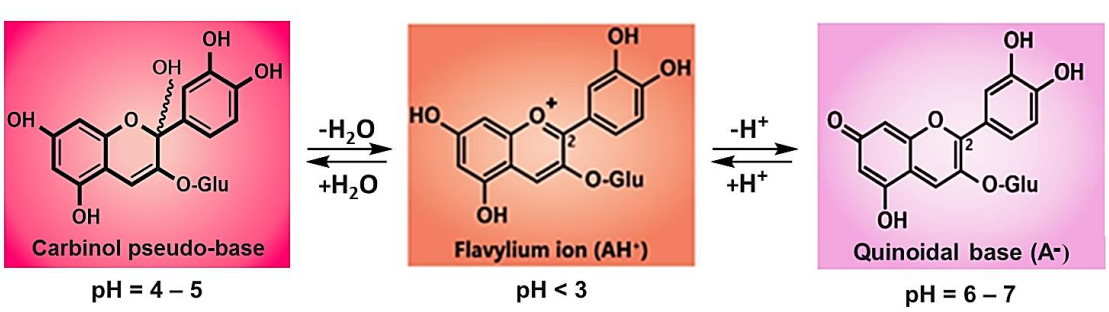


شکل ۸- غلظت و رنگ تقریبی آنتوسیانین شاه‌توت در pHهای مختلف

(حروف لاتین متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار ۰/۰۵ > P می‌باشند).

Figure 8- Concentration and approximate color of blackberry anthocyanin at different pH

(Different letters indicate significance difference P < 0.05).



شکل ۹- ساختارهای شیمیایی مختلف آنتوسیانین در pHهای مختلف و رنگ تقریبی آن (هاگتون و همکاران ۲۰۲۱).

Figure 9- Different chemical structures of anthocyanin at different pH and its approximate color

پایداری در حضور و عدم حضور اکسیژن: نتایج آزمایشات انجام شده نشان دهنده حساسیت بالای آنتوسیانین به اکسیژن می‌باشد. در نمونه‌ی هوادهی شده تنها پس از گذشت یک ساعت تغییر رنگ محسوسی از رنگ طبیعی به رنگ‌های تیره‌تر مشاهده شد اما در نمونه حاوی گاز ازت، نه تنها رنگ به خوبی حفظ شد، بلکه اثری از رشد کپک نیز مشاهده نگردید. سایر تحقیقات انجام شده نیز اکسیژن را از مهمترین عوامل تخریب آنتوسیانین‌ها بیان کرده‌اند (وانگ و همکاران ۲۰۰٤). بسته‌بندی محصولات تحت خلأ و یا استفاده از گاز ازت اثر تخریب اکسیژن را در تغییر رنگ آنتوسیانین به حداقل رسانده و باعث ثبات این رنگدانه می‌شود (وانگ و همکاران ۲۰۰٤).

پایداری در حضور افزودنی‌های مجاز خوراکی: نتایج به‌دست آمده برای نمونه‌های حاوی افزودنی‌های مجاز خوراکی و همچنین نمونه شاهد، در محیط تاریک و نور غیر مستقیم، پس از گذشت دو هفته به شرح زیر می‌باشند:

- نمونه‌های نگهداری شده در محیط تاریک: تمامی نمونه‌ها رنگ خود را حفظ کرده بودند. در نمونه‌های

حاوی سوربیتول، گلوکز، گاز کربنیک و همچنین نمونه شاهد کپک رشد کرده بود، اما در نمونه‌ی حاوی سیتریک اسید هیچ گونه کپکی مشاهده نشد.

- نمونه‌های نگهداری شده در نور غیرمستقیم: تمامی نمونه‌ها به جز نمونه شاهد رنگ خود را به خوبی حفظ کرده بودند. در نمونه‌های حاوی سوربیتول، گلوکز، گاز کربنیک و همچنین نمونه شاهد کپک رشد کرده بود اما در نمونه‌ی حاوی سیتریک اسید علائمی از رشد کپک مشاهده نشد.

بر این اساس افزودن سوربیتول، گلوکز، گاز کربنیک و سیتریک اسید نقش بسیار مثبتی در پایداری رنگی عصاره‌ها داشته به طوری که با افزودن این مواد، نمونه‌ها هم در محیط تاریک و هم در نور غیرمستقیم رنگ خود را به ترتیب تا میزان ۹۸/۸ و ۹۳/٦ ٪ حفظ می‌نمایند. این امر در حفظ رنگ محصولات نقش مهم و بسزایی ایفا می‌کند. با این وجود برای جلوگیری از رشد کپک‌ها، استفاده از سوربیتول، گلوکز وگاز کربنیک به تنهایی مؤثر نبوده و به منظور کاهش و مهار کپک‌ها نیاز به استفاده از سایر مواد مجاز خوراکی مانند سیتریک اسید می‌باشد.

نتیجه‌گیری

آنتوسیانین‌ها مهمترین ترکیبات رنگی در بین فلاونوئیدها بوده و با توجه به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا و اثرات مفید بر حفظ سلامتی انسان، جایگزین‌های مناسبی برای رنگ‌های شیمیایی مضر می‌باشند. در این پژوهش پس از استخراج و غنی‌سازی رنگدانه‌های آنتوسیانین موجود در میوه شاه‌توت و تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی آن، به بررسی اثر عوامل تاثیرگذار بر پایداری و ماندگاری آنتوسیانین‌ها شامل درجه حرارت، نور، وجود آنزیم‌ها، تغییر pH، حضور اکسیژن و اضافه کردن افزودنی‌های مجاز خوراکی پرداخته شد و راه‌های بهینه سازی آن‌ها مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفت. با انجام آزمایشات مختلف مشخص گردید که استفاده از محلول اتانول اسیدی، بالاترین راندمان استخراج رنگ با کمترین میزان تخریب را فراهم می‌نماید.

بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی آنتوسیانین استخراج شده میزان ۱۵ ٪ ماده‌ی خشک، ۸۵ ٪ رطوبت و ۱٤/۵ ٪ مواد جامد محلول را نشان داد و رنگ استخراج شده بر اساس pH = ۳/۲ دارای خاصیت اسیدی بود. بر اساس تجزیه و تحلیل کروماتوگرام HPLC به‌دست آمده، پنج آنتوسیانین در عصاره استخراج شده شاه‌توت شناسایی شدند که سیانیدین ۳-گلیکوزید گونه غالب بود. میزان جذب و آنتوسیانین کل در عصاره غنی‌سازی شده میوه‌ی شاه‌توت به ترتیب مقادیر قابل توجه ۰/۳۲ و ۲٤/۳ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که نشان دهنده غنی‌سازی مناسب آنتوسیانین استخراج شده می‌باشد. همچنین مشخص شد که با استفاده از تونل باد امکان خشک کردن و پودر کردن رنگ استخراج شده بدون کاهش کیفیت وجود دارد.

با بررسی پایداری رنگدانه‌های آنتوسیانین غنی‌سازی شده مشخص شد که نور و درجه حرارت دو عامل مهم در پایداری آنتوسیانین‌های شاه‌توت می‌باشند و با حذف نور و کاهش درجه حرارت می‌توان پایداری آنتوسیانین‌ها را تا حد زیادی افزایش داد. آنزیم‌های طبیعی موجود در میوه‌ی شاه‌توت باعث تخریب ساختمان شیمیایی سیانیدین‌ها می‌شوند و با غیرفعال کردن آن‌ها، رنگ محصول به خوبی حفظ می‌شود. همچنین آنزیم بری به جلوگیری از رشد کپک‌ها کمک می‌نماید. بالاترین غلظت آنتوسیانین و بیشترین شدت رنگ، در محدوده‌ی ٤-۳ = pH به‌دست آمد که متناظر با pH طبیعی محلول استخراج شده (pH = ۳/۲) می‌باشد و هرچه از pH طبیعی محصول فاصله گرفته شود، غلظت آنتوسیانین کاهش می‌یابد. با این وجود آنتوسیانین تحت شرایط اسیدی پایدارتر بوده و غلظت بالاتری دارد. همچنین اکسیژن باعث تخریب آنتوسیانین می‌شود و استفاده از گاز ازت نه تنها از تخریب رنگ به وسیله اکسیژن جلوگیری می‌کند، بلکه

مانع از رشد کپک نیز می‌گردد. با اضافه کردن افزودنی‌های مجاز خوراکی سوربیتول، گلوکز، گاز کربنیک و سیتریک اسید پایداری رنگی عصاره‌ها افزایش می‌یابد به طوری که با افزودن این مواد، نمونه‌ها هم در محیط تاریک و هم در نور غیرمستقیم رنگ خود را به ترتیب تا میزان ۹۸/۸ و ۹۳/٦ ٪ حفظ می‌نمایند. همچنین سیتریک اسید مانع از رشد کپک‌ها نیز می‌گردد. در نهایت باتوجه به کیفیت و شدت رنگ آنتوسیانین غنی‌سازی شده حاصل در این پژوهش، امکان استفاده از آن در صنایع غذایی وجود دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و دانشگاه بوعلی سینا برای حمایت از اجرای این پروژه سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

نوشیروانی ن و فصیحی ه، ۱٤۰۱، اثر پوشش‌های فعال بر پایه کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس‌های مرزه و زنجبیل در عمر انبارمانی و برخی ویژگی‌های پس از برداشت خیار تازه. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۲ (۲)، ۱۲۳-۱۳۸. doi: https://doi.org/ 10.22034/FR.2022.49563.1817

Alighourchi H, Barzegar M, Sahari M and Abbasi S, 2013. Effect of sonication on anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant capacity of pomegranate juices. International Food Research Journal 20(4): 1703-1709.

Amin K, Hameid IIHA and Abd Elsttar A, 2010. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. Food and Chemical Toxicology 48(10): 2994-2999. doi: https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.039

Andersen Ø and Jordheim M, 2006. The Anthocyanins in Flavonoids Chemistry. Biochemistry and Applications (pp. 471-552): CRC Press.

Boulton R, 1980. The relationships between total acidity, titratable acidity and pH in wine. American Journal of Enology and Viticulture 31(1): 76-80.

Buchert J, Koponen JM, Suutarinen M, Mustranta A, Lille M, Törrönen R and Poutanen K, 2005. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. Journal of the Science of Food and Agriculture 85(15): 2548-2556. doi: https://doi.org/10.1002/jsfa.2284

Bueno JM, Sáez-Plaza P, Ramos-Escudero F, Jiménez AM, Fett R and Asuero AG, 2012. Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: chemical structure, color, and intake of anthocyanins. Critical Reviews in Analytical Chemistry 42(2): 126-151. doi: https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632314

Castañeda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA and Galán-Vidal CA, 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry 113(4): 859-871. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001

Cemeroglu B, Velioglu S and Isik S, 1994. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. Journal of Food Science 59(6): 1216-1218. doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb14680.x

Chandrasekhar J, Madhusudhan M and Raghavarao K, 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. Food and Bioproducts Processing 90(4): 615-623. doi: https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.004

Chiriboga C and Francis FJ, 1970. An anthocyanin recovery system from cranberry pomace. Journal of the American Society for Horticultural Science 95(2): 233-236. doi: https://doi.org/10.21273/JASHS.95.2.233

Clifford MN, 2000. Anthocyanins–nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture 80(7): 1063-1072. doi: https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80

de Ancos B, Gonzalez E and Cano MP, 1999. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A 208(1): 33-38. doi: https://doi.org/10.1007/s002170050371

de Rosso VV and Mercadante AZ, 2007. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. Innovative Food Science and Emerging Technologies 8(3): 347-352. doi: https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.008

Dyrby M, Westergaard N and Stapelfeldt H, 2001. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. Food Chemistry 72(4): 431-437. doi: https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00251-X

Fang J, 2015. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. Nutrition 31(11-12): 1301-1306. doi: https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.04.015

Felgines C, Texier O, Besson C, Fraisse D, Lamaison JL and Rémésy C, 2002. Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. The Journal of Nutrition 132(6): 1249-1253. doi: https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1249

Francis FJ and Markakis PC, 1989. Food colorants: anthocyanins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 28(4): 273-314. doi: https://doi.org/10.1080/10408398909527503

Gabbay KH, 1973. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. New England Journal of Medicine 288(16): 831-836. doi: https://doi.org/10.1056/NEJM197304192881609

Gundogdu M, Muradoglu F, Sensoy RG and Yilmaz H, 2011. Determination of fruit chemical properties of Morus nigra L., Morus alba L. and Morus rubra L. by HPLC. Scientia Horticulturae 132, 37-41. doi: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.035

Hellström J, Mattila P and Karjalainen R, 2013. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. Journal of Food Composition and Analysis 31(1): 12-19. doi: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.010

Houghton A, Appelhagen I and Martin C, 2021. Natural blues: Structure meets function in anthocyanins. Plants 10(4): 726-748. doi: https://doi.org/10.3390/plants10040726

Kharazi M and Saien J. 2022**.** Mechanism responsible altering in interfacial tension and emulsification of the crude oil-water system with nano gemini surface active ionic liquids, salts and pH. Journal of Petroleum Science and Engineering 219: 111090. doi: https://doi.org/10.1016/j.petrol.2022.111090.

Kharazi M and Saien J. 2022**.** Upgrading the properties of crude oil–water system for eor with simultaneous effects of a homologous series of nano gemini surface active ionic liquids, electrolytes and pH. ACS Omega 7: 40042-40053 doi: https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04741.

Ku C and Mun S, 2008. Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja, Rubus coreanus Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. Bioresource Technology 99(17): 8325-8330. doi: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.013

Laleh G, Frydoonfar H, Heidary R, Jameei R and Zare S, 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four Berberis species. Pakistan Journal of Nutrition 5(1): 90-92.

Lee J, Durst RW and Wrolstad RE, 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. Journal of AOAC International 88(5): 1269-1278. doi: https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269

Mateus N and de Freitas V, 2008. Anthocyanins as food colorants. In Anthocyanins (pp. 284-304): Springer.

Metivier R, Francis F and Clydesdale F, 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. Journal of Food Science 45(4): 1099-1100. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.01.016

Netzel M, Strass G, Kaul C, Bitsch I, Dietrich H and Bitsch R, 2002. In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. Food Research International 35(2-3): 213-216. doi: https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00186-7

Remón S, Ferrer A, Marquina P, Burgos J and Oria R, 2000. Use of modified atmospheres to prolong the postharvest life of Burlat cherries at two different degrees of ripeness. Journal of the Science of Food and Agriculture 80(10): 1545-1552. doi: https://doi.org/10.1002/1097-0010(200008)80

Reyes LF and Cisneros-Zevallos L, 2007. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple-and red-flesh potatoes (Solanum tuberosum L.). Food Chemistry 100(3): 885-894. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.002

Roobha JJ, Saravanakumar M, Aravindhan K and Devi PS, 2011. The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in Musa acuminata bract. Research in Plant Biology 1(5): 5-12.

Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovese T, Morabito D, Dugo G, Sautebin L, Caputi AP and Cuzzocrea S, 2003. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. Free Radical Research 37(8): 891-900. doi: https://doi.org/10.1080/1071576031000112690

Saien J, Kharazi M, Pino V and Pacheco-Fernández I, 2022. Trends Offered by Ionic Liquid-Based Surfactants: Applications in Stabilization, Separation Processes, and within the Petroleum Industry. Separation & Purification Reviews 1–29. https://doi.org/10.1080/15422119.2022.2052094

Sandoval-Ramírez BA, Catalán U, Fernández-Castillejo S, Rubió L, Macià A and Solà R, 2018. Anthocyanin tissue bioavailability in animals: possible implications for human health. A systematic review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66(44): 11531-11543. doi: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04014

Santos SSD, Magalhães FDS, Paraíso CM, Ogawa CYL, Sato F, Santos Junior ODO, Visentainer JV, Madrona GS and Reis MHM, 2022. Enhanced conditions for anthocyanin extraction from blackberry pomace under ultrasound irradiation. Journal of Food Process Engineering 14077. doi: https://doi.org/10.1111/jfpe.14077

Silva S, Costa EM, Calhau C, Morais RM and Pintado ME, 2017. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(14): 3072-3083. doi: https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087963

Stintzing FC, Trichterborn J and Carle R, 2006. Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. Food Chemistry 94(2): 296-309. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.018

Tian Q, Giusti MM, Stoner GD and Schwartz SJ, 2006. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (Rubus occidentalis) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry Food Chemistry. 94(3): 465-468. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.020

Tiwari BK, O'Donnell CP and Cullen PJ, 2009. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. Journal of Food Engineering 93(2): 166-171. doi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.027

Tsai PJ, Hsieh YY and Huang TC, 2004. Effect of sugar on anthocyanin degradation and water mobility in a roselle anthocyanin model system using 17O NMR. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(10): 3097-3099. doi: https://doi.org/10.1021/jf0306587

Türker N and Erdogˇdu F, 2006. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocynanin pigments of black carrot (Daucus carota var. L.): Journal of Food Engineering 76(4): 579-583. doi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.005

Von Elbe G and Lewis B, 1986. Free-radical reactions in glow and explosion of carbon monoxide oxygen mixtures. Combustion and Flame 63(1-2): 135-150. doi: https://doi.org/10.1016/0010-2180(86)90116-1

Wang Y, Lau M, Tang J and Mao R, 2004. Kinetics of chemical marker M-1 formation in whey protein gels for developing sterilization processes based on dielectric heating. Journal of Food Engineering 64(1): 111-118. doi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.09.019

Waterhouse A, 2002. Current protocols in food analytical chemistry/Ed. Wrolstad RE.

Wu X and Prior RL, 2005. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(7): 2589-2599. doi: https://doi.org/10.1021/jf048068b

Journal of Food Research, 2023,33(3):1-21
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI:10.22034/FR.2023.54920.1861

Investigating the effect of different physical and chemical parameters on the quality and stability of blackberry-enriched anthocyanin pigments

M Moghimi[1], M Kharazi[2]*, M Hashemi[3] and N Noshirvani[4]

Received: January 14, 2023 Accepted: February 27, 2023
[1]MSc Student, Department of Chemical Engineering, Science and Reasearch Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Postdoc. Researcher, Department of Applied Chemistry, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran
[3] Proffesor, Department of Analytical Chemistry, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Tuyserkan Faculty of Engineering and Natural Resources, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
*Corresponding author: E mail: kharazi.mona@yahoo.com

Introduction: Anthocyanins are the most important flavonoid pigments which have health benefits for concumers due to their high antioxidant activity. These compounds are non-toxic and water-soluble, and with attractive and bright colors of red, blue, and purple, are good alternatives to harmful chemical dyes. Blackberry fruit is one of the rich sources of anthocyanins in nature. Blackberry anthocyanins have been considered as healthy and effective food colors in the food industry due to the presence of dark purple color along with abundant nutrients. However, unfavorable physical and chemical conditions may cause spoilage and color changes in the natural pigments of this fruit.
Blackberry fruit is a good source of vitamins A, B, C, E and K as well as iron, potassium, manganese, magnesium, niacin, riboflavin, folic acid, glucose and tannin. The presence of many nutrients along with high antioxidant activity has made this fruit to be considered as a suitable source for meeting the daily need for various micronutrients. Based on this, with the correct processing of blackberry extract, its anthocyanins can be used not only as a natural color but also as a harmless sweetener and a substance with excellent micronutrient properties in various food industries. The purpose of this study is a comprehensive study on the degradation factors of blackberry anthocyanins to find appropriate protection methods, and their subsequent use in the food industry.
Material and methods: In this research, various methods of extracting color from blackberry fruit were investigated, including the use of different solvents and different temperatures, and finally it was determined to use acidic ethanol and acidic methanol solvents and then evaporate the solvent in a vacuum and low temperature. It has the best efficiency in extracting color from blackberry fruit. These results show that the more the structure of the solvent is similar to the structure of the extracted pigment, the higher the percentage of extraction. Considering less toxicity, 0.1% acidic ethanol solution (ethanol + hydrochloric acid) was considered as the extraction solvent. In summary, liquid-solid phase extraction method, extractive phase separation and subsequent evaporation of the extraction solvent in vacuum and low temperatures of 30 to 40°C were used to extract anthocyanin. After extracting and enriching the anthocyanins of blackberry fruit and determining its properties, the

effect of various physical and chemical parameters such as temperature, light, presence of enzymes, different pHs, presence of oxygen, and the addition of authorized food additives on the quality and stability of this pigment was investigated and ways of optimization them were evaluated.
Results and discussion: By performing various tests, it was found that the use of acidic ethanol solution provides the highest color extraction efficiency with the lowest amount of degradation. Examining the physical and chemical properties of the extracted anthocyanin showed the presence of 15% dry matter, 85% moisture and 14.5% soluble solids. Also, the extracted color has acidic properties. Based on the obtained HPLC chromatogram analysis, five anthocyanins were identified in the blackberry extract, and cyanidin 3-glycoside was the dominant type of blackberry color anthocyanin. The amount of absorption and total anthocyanin in the enriched extract of blackberry fruit was found to be 0.32 and 24.3 mg/liter, respectively, which is a significant amount and indicates the appropriate enrichment of the extracted anthocyanin. It was also found that by using the wind tunnel it is possible to dry and powder the paint without reducing the quality. Investigating the stability of enriched anthocyanin pigments showed that light and temperature are two important factors in the stability of blackberry anthocyanins, and by removing light and reducing temperature, the stability of anthocyanins can be increased to a great extent. . The natural enzymes present in the blackberry fruit destroy the chemical structure of cyanidins, and by deactivating them, the color of the product is well preserved. Also, the enzyme helps to prevent the growth of molds. The highest concentration of anthocyanin and the highest color intensity were obtained in the range of pH = 3-4, which corresponds to the natural pH of the extracted solution (pH = 3.2) and the further away from the natural pH of the product, the concentration anthocyanin decreases. However, anthocyanin is more stable under acidic conditions and has a higher concentration. Oxygen also destroys anthocyanins. However, the use of nitrogen gas not only prevents the destruction of pigment by oxygen, but also prevents the growth of mold. By adding food additives such as sorbitol, glucose, carbon dioxide and citric acid, the color stability of the extracts increases and citric acid prevents the growth of molds. Finally, according to the quality and intensity of the enriched anthocyanin color obtained in this research, it is possible to use it in the food industry.
Conclusion: The results demonstrated that cyanidin-3-glycoside is the main anthocyanin in blackberry fruit. Light, temperature, changing pH, and the presence of oxygen reduce the stability of anthocyanins by 56.5 to 88.2%. On the other hand, the addition of authorized food additives such as carbon dioxide, citric acid, glucose, sorbitol, and nitrogen gas helped stabilize the pigments. Thus, the samples retained their color up to 98.8, and 93.6%. in darkness, and indirect light, respectively.

Keywords: Anthocyanin, Blackberry, Stability factors, Natural pigments