View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی

عنوان:

تهیه رنگدانه طبیعی خوراکی بتا کاروتن از گونه آزولا (*Azolla filiculoides*)

مجری:
مینا سیف زاده

شماره ثبت
۵۱۷۳۵

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی

عنوان طرح/پروژه : تهیه رنگدانه طبیعی خوراکی بتا کاروتن از گونه آزولا (*Azolla filiculoides*)
کد مصوب: ۹۳۱۱۹ – ۱۲ – ۱۲ - ۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : مینا سیف زاده
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : مینا سیف زاده
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : یزدان مرادی، علی اصغر خانی پور، جواد دقیق روحی، قربان زارع گشتی، معصومه رهنما سنگاچینی، فرشته خدابنده، فریدون رفیع پور، مجتبی زارعی عبدالرضا محمدی، منصور صدریان
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) :-
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) :-
محل اجرا : استان گیلان
تاریخ شروع :۹۳/۴/۱
مدت اجرا :۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۶
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : تهیه رنگدانه طبیعی خوراکی بتا کاروتن از گونه آزولا (*Azolla filiculoides*)

کد مصوب :

شماره ثبت (فروست) : ۵۱۷۳۵ تاریخ : ۹۶/۳/۱۰

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم مینا سیف‌زاده دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ۹۵/۱۲/۲۲ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۳
۱-۱- تاریخچه رنگ مواد غذایی ۵
۱-۲- انواع رنگ‌ها ۶
۱-۳- کاروتنوئید ۷
۱-۴- آزولا ۱۱
۱-۵- بیان مسئله ۱۳
۱-۶- ضرورت اجرای پروژه ۱۳
۱-۷- پیشینیه تحقیق ۱۵
۱-۷-۱- بررسی پژوهش های داخل کشور ۱۵
۱-۷-۲- بررسی پژوهش های خارج کشور ۱۶
۱-۸- فرضیات یا سؤالات تحقیق ۱۶
۱-۹- اهداف پروژه ۱۷
۲- مواد و روشها ۱۸
۲-۱- تجهیزات ۱۸
۲-۲- مواد مصرفی ۱۸
۲-۳- محل اجرای تحقیق ۱۹
۲-۴- روش تحقیق ۱۹
۲-۴-۱- تهیه بتا کاروتن از آزولا به روش حلال آلی ۲۰
۲-۴-۲- تهیه بتاکاروتن از آزولا به روش هیدرولیز قلیایی ۲۱
۲-۴-۳- روش تهیه محلول استاندارد ۳ میکروگرم/میلی لیتر بتا کاروتن ۲۲
۲-۴-۴- انجام آزمایشات برای بتا کاروتن استخراج شده به روش حلال آلی و هیدرولیز قلیایی ۲۲
۲-۵- نمونه شاهد ۲۲
۲-۶- آنالیز آماری ۲۵
۳- نتایج ۲۶
۴- بحث و نتیجه گیری ۲۸
پیشنهادها ۳۲
منابع ۳۴
چکیده انگلیسی ۳۹

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute –Inland Waters Aquaculture Research Center

---

Project Title: Development of technology to extract beta-carotene natural colors from Azolla *(Azolla filiculoides*)
Approved Number: 2 – 12 – 12 – 93119
Author: Mina Seifzadeh
Project Researcher: Mina Seifzadeh
Collaborator(s)*:* Moradi, Y., Khanipour, A.S., Daghigh Rohi, J., Zareh Gashti, Gh., Rahnama, M., Khodabandeh, F., Rafiepour, F., Zarei, M., Mohammadi, A., Sadrian, M.
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution: Guilan province
Date of Beginning : 2014
Period of execution : 2 Years
Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Inland Waters Aquaculture Research Center

Project Title:

Development of technology to extract beta-carotene natural colors from Azolla *(Azolla filiculoides*)

Project Researcher:

Mina Seifzadeh

Register NO.
51735

چکیده

این پروژه با هدف تعیین وزن ماده خشک در یک کیلو گرم گونه وحشی آزولای تالاب انزلی، تعیین میزان کمی و کیفی رنگدانه های طبیعی گونه وحشی آزولای تالاب انزلی، تعیین مقادیر و در صد خلوص رنگدانه بتا کاروتن از *Azolla filiculodes* تالاب انزلی، مقایسه با نوع طبیعی و بررسی ارزش اقتصادی رنگدانه های تهیه شده از آزولا انجام شد. برای اجرای این پروژه هشت تیمار در نظر گرفته شد. تیمارها شامل آزولای تالاب انزلی در فصول بهار، تابستان، پائیز و زمستان هستند. تیمارها به دو روش حلال های آل و هیدرولیز قلیایی عمل آوری شدند. تیمارها به مدت یک سال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. کیفیت تیمارها با استفاده ازآزمایشات شیمیایی شامل آزمایشات تعیین راندمان تولید وزن ماده خشک آزولا در یک کیلوگرم، بررسی کمی و کیفی ماده های رنگی وزن ماده خشک،روش رنگ سنجی (hunter lap)، تعیین میزان و درصد خلوص ماده رنگی بتا کاروتن از طریق(HPLC)، بررسی ترکیبات بتا کاروتن طبیعی با روش اسپکتروفتومتری، بررسی حلالیت بتا کاروتن طبیعی و تعیین مدت زمان ماندگاری بتا کاروتن طبیعی در نقطه صفر و بعد از زمان یک سال به روش استاندارد ملی ایرانبررسی شد. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سایر تست ها در صورت نیاز شامل توکی جهت مقایسه نمونه های آزمایشی با یکدیگر و نمونه شاهد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در روش هیدرولیز قلیایی از آزولای فصل بهار مقدار ۱۱۸۵۳ mg/kg، آزولای فصل تابستان ۹۹۳۵mg/kg، آزولای فصل پائیز ۱۱۲۵۶ mg/kg و آزولای فصل زمستان ۱۱۲۴۵mg/kg استخراج شد. در روش حلال آلی از آزولای فصل بهار مقدار ۸۳۴۷ mg/kg، آزولای فصل تابستان ۶۶۴۸ mg/kg، آزولای فصل پائیز ۷۵۴۳ mg/kg و آزولای فصل زمستان ۷۵۳۹mg/kg استخراج شد. مقدار بتا کاروتن استخراج شده به روش حلال آلی و هیدرولیز قلیایی در فصل تابستان در مقایسه با سایر فصول کاهش معنی دار نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار بتا کاروتن در فصل بهار در مقایسه با سایر فصول افزایش معنی دار نشان داد(P<۰/۰۵). این فاکتور(حلال آلی و هیدرولیز قلیایی) در فصول پائیز و زمستان تفاوت معنی دار نشان نداد(P>۰/۰۵). در مقادیر استخراج بتا کاروتن در روش حلال آلی در مقایسه با هیدرولیز قلیایی در فصول بهار، تابستان پائیز و زمستان تفاوت معنی دار مشاهده شد(P<۰/۰۵). در نتایج آزمایشات شامل تعیین درصد خلوص، غلظت، رنگ سنجی، ترکیبات ویتامینه و حلالیت بتا کاروتن در تیمارهای حلال آلی در مقایسه با هیدرولیز قلیایی کاهش معنی دار مشاهده شد(P<۰/۰۵). طی مدت زمان ماندگاری یک ساله در دمای ۵ درجه سلسیوس این فاکتورها در تیمارهای هیدرولیز قلیایی و حلال آلی تفاوت معنی دار نشان ندادند(P<۰/۰۵). با توجه به این که برای برداشت آزولا از تالاب انزلی نیاز به تجهیزات خاصی نمی باشد و از حیث زمانی مقدار زیادی از آزولا را در مدت زمان کوتاه می توان برداشت کرد و همچنین برای استخراج بتا کاروتن از آزولای تالاب انزلی نیز نیاز به تجهیزات خاصی نمی باشد، فاقد ارزش اقتصادی بودن ماده اولیه، عدم نیاز به شرایط بخصوصی برای پرورش، دو برابر شدن آزولا

طی سه روز، غنی بودن آزولا از بتا کاروتن، استحصال مقدار زیاد بتا کاروتن از مقدار اندک ماده اولیه، هزینه مواد شیمیایی، کارگر، سوخت، تجهیزات آزمایشگاهی مورد نیاز و هزینه وارد کردن بسته های کوچک بتا کاروتن به داخل کشور هزینه تولید بتا کاروتن از حیث اقتصادی در مقایسه با هزینه بتا کاروتن وارداتی شرکت سیگما مقرون به صرفه می باشد.

همانطور که در جدول شماره ۵ مشاهده شد در نمونه تهیه شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با نمونه سنتتیک ساخت کارخانه سیگما از حیث آزمایشات شیمیایی شامل رنگ سنجی، درصد خلوص، ترکیبات ویتامینه و حلالیت تفاوت معنی دار مشاهده نشد($P<۰/۰۵$). در نمونه تهیه شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با نمونه سنتتیک ساخت کارخانه سیگما از حیث آزمایشات شیمیایی شامل رنگ سنجی، درصد خلوص، ترکیبات ویتامینه و حلالیت تفاوت معنی دار مشاهده شد ($P>۰/۰۵$).

با توجه به وجود تفاوت معنی دار بین مقدار بتا کاروتن استخراج شده به روش های هیدرولیز قلیایی و حلال آلی، و عدم وجود تفاوت معنی دار بین خلوص، حلالیت و آزمایشات شیمایی بتا کاروتن استخراج شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با شاهد، وجو تفاوت معنی دار بین مقدار بتاکاروتن استخراج شده از آزولای تالاب انزلی در فصل بهار در مقایسه با سایر فصول سال و کاهش رشد گیاهان در فصول پائیز و زمستان آزولای فصل بهار تالاب انزلی و روش هیدرولیز قلیایی برای استخراج بتا کاروتن از آزولای تالاب انزلی پیشنهاد می شود.

کلمات کلیدی: آزولای وحشی (*Azolla filiculodes*) ، رنگدانه های طبیعی، خلوص بتا کاروتن، رنگ سنجی، HPLC، افزودنی

۱ – مقدمه

یکی از خصوصیات کیفی مواد غذایی رنگ آن هست که امروزه نقش مهمی در کیفیت مواد غذایی دارد. چنانچه محصول غذایی از رنگ مناسب که یکی از خصوصیات ظاهری است برخوردار نباشد با کاهش شدید ارزش عرضه مواجه خواهد شد. سایر خصصیات کیفی مانند عطر، طعم، بافت و غیره پارامترهایی هستند که پس از مصرف محصوص غذایی و احیانا پس از یک بار خریدن و مصرف کردن آن مورد قضاوت قرار می گیرد. رنگ عامل موثر در جلب نظر و انتخاب ماده غذایی هست و وجود آن در تشخیص سریع پذیرش نهایی هر فرآورده غذایی موثر می باشد، زیرا رنگ باعث جذابیت ماد غذایی می گردد. اهمیت سلامت افزودنی های غذایی و مدارکی که مدعی ست بعضی از رنگ های مصنوعی ممکن است برای سلامتی انسان مضر باشند لزوم توجه بیشتر به استفاده از رنگ های طبیعی بجای رنگ ای مصنوعی را یادآور شده است (خانی پور و همکاران، ۱۳۸۸).

بتا کاروتن یک رنگدانه طبیعی با طیف رنگی زرد تا قرمز است و به سهولت در بسیاری از گیاهان سبز و برخی از جلبک ها و ریزسازوارهای فتوسنتز کننده یافت می شود. این ماده اولین بار در سال ۱۸۳۱ توسط Wakenro از گیاه هویچ استخراج شد. امروزه بتا کاروتن به عنوان یک رنگ طبیعی به طور وسیعی در فرآورده های غذایی، لوازم آرایشی، غذای دام و طیور مورد استفاده قرار می گیرد. به علاوه این ماده هم یک آنتی اکسیدان قوی بوده و هم به عنوان پیش ساز ویتامین A در انسان و حیوانات به کار می رود. وجود خواص و فواید فراوان علاقمندی زیادی جهت تولید صنعتی این ماده فراهم کرده است. بتا کاروتن در بسیاری از گیاهان از جمله آزولا موجود بوده و بتا کاروتن موجود در گیاهان از نوع طبیعی می باشد. این نوع بتا کاروتن تجزیه پذیر بوده و همچنین فاقد آلودگی می باشد. افزودنی‌های غذایی از قبیل رنگ‌دهنده‌های طبیعی مواد مفیدی هستد که امروزه از آنها به منظور بهبود کیفیت، ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و رفع مشکلات فناوری تولید مواد غذایی استفاده می‌شود. رنگ غذایی یا افزودنی رنگ را می توان به عنوان هر نوع رنگ، پیگمان یا ماده ای که سبب بهبود کیفیت و ظاهر غذاهای عمل آوری شده یا تازه می شود، تعریف کرد. تجربه ثابت نموده است که مصرف کنندگان به رنگ مواد غذایی حساس بوده و رنگ با کیفیت و ویژگی‌های حسی رابطه‌ی مستقیم دارد.با توجه به این که مصرف کننده ابتدا کیفیت هر نوع ماده غذایی را به وسیله‌ی رنگ آن ارزیابی می‌نماید، رنگ را می توان به عنوان فاکتوری که نشان دهنده کیفیت موادغذایی بوده و کیفیت خوب و یا بد مواد غذایی را نشان می‌دهد، مطرح کرد.به موازات طعم و مزه، شکل و اندازه این فاکتور یکی از مهم‌ترین خصوصیات حسی مواد غذایی را تشکیل می‌دهد.بنابراین رنگ یکی از بهترین مشخصه‌های کیفی ماده‌ی غذایی بودهودر افزودنیهای مواد غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ترکیبات رنگی طبیعیاز منابع گیاهی مانند میوه‌ها، سبزی‌ها، دانه‌ها و ریشه‌های گیاهان استخراج می شود. این رنگها، رنگ های گیاهی نیز نامیده شده اند. ما در غذاهای روزانه مقادیر زیادی از رنگ‌دانه‌های طبیعی به خصوص آنتوسیانین، کاروتنوئید و کلروفیل را مصرف

می‌کنیم. اما، جذب این مواد از طریق موادغذایی فرآیند شده با رنگ‌های طبیعی حائز اهمیت است. با توجه به امنیت و در دسترسی عموم رنگ های غذایی در موادر غیر غذایی مانند دارویی، لوازم آرایشی و دستگاههای پزشکی نیز استفاده می شوند (Branen, 2001).

رنگهای مصنوعی مواد رنگی هستند که در نتیجه سنتز مواد آلی به دست می آیند و دامنه کاربرد آنها نا محدود بوده و در صنایع مختلفی مانند غذایی و غیره کاربرد دارند.با نظر به اهمیت روزافزون این ترکیبات و مصرف بالای افزودنی‌ها در واحدهای صنعتی جهان تحقیقات زیادی در مورد استفاده از این رنگ ها انجام شد. نتایج این تحقیقات نشان داد که رنگ های سنتتیک فاقد ارزش غذاییبوده و بسیاری از رنگهای مصنوعی از نظر مصرف در غذای انسان قابل قبول نبوده و عامل ایجاد کننده اختلالاتی ازقبیل آسم، کهیر، واکنش های آنافیلاکتیک، اختلال در خواب، ایجاد فشارخون،آلرژی، کاهش سطح ویتامین‌ها، سرطان زایی، اختلالات کبدی، تومور های بدخیم، اختلال در فرآیند های مغزی مانند قدرت یادگیری و رفتار به ویژه در کودکان و نوجوانان، کاهش ضریب هوشی کودکان و بروز پیش فعالی در کودکان هستند. علاوه بر این، این رنگ ها سبب تجمع مواد سنتتیک در مواد غذایی، عوارض ناشی از انتقال آن به انسان و تاثیر آن بر سلامت انسان و تضعیف سیستم ایمنیمی باشند. با توجه به مشکلات فراوان حاصل از مصرف رنگ های مصنوعی، اخیراً محدودیت‌های بسیاری از جانب سازمان‌های بین المللی و انستیتوهای تحقیقاتی در مورد استفاده از این رنگ‌ها وضع شده است. لذا درسطح جهانی مطالعه و جستجو برای یافتن پیگمان‌های طبیعی مناسب به‌عنوان رنگ افزودنی آغاز شد. پیگمان‌های طبیعی اثرات سوء ذکر شده برای رنگ‌های مصنوعی را نداشته و در تحقیقات مختلف تاثیرات مثبت آنها بر سلامت عمومی به کرار مورد تائید قرار گرفته است(Caivano and Buera, 2012).

از اهداف افزایش رنگ به یک فرآورده‌ی غذایی می توان به مواردی مانندبرگرداندن رنگ اصلی به فرآورده، اطمینان از یکنواختی رنگ، تشدید رنگ‌های طبیعی غذاها، جذاب نمودن ظاهر مواد غذایی، حفظ ارزش غذایی، کیفیت و طعم و مزه مواد غذایی هنگام ذخیره ، دادن هویت به ماده‌ی غذایی، حفاظت از ویتامین‌های حساس به نور، معرفی رنگ های تزئینی به سایر غذاها و افزایش کیفیت حسی مواد غذایی بی رنگ اشاره کرد. استفاده وسیع از رنگ ها در مواد غذایی به دلیل جذابیت و بازار پسندی ، تحریک اشتهای مصرف کنندگان و ترغیب آنها به خرید و جبران رنگ از دست رفته در زمان نگهداری یا فرآیند غذا از دیر باز مورد توجه بسیاری از تولید کنندگان مواد غذایی بوده است (Hutchings, 2003) .

این پروژه با اهداف تعیین وزن ماده خشک در یک کیلو گرم گونه وحشی آزولای تالاب انزلی، تعیین میزان کمی و کیفی رنگدانه های طبیعی گونه وحشی آزولای تالاب انزلی، تعیین مقادیر و در صد خلوص رنگدانه بتا کاروتن از

گونه وحشی آزولای تالاب انزلی، مقایسه با نوع طبیعی از کارخانه sigma و بررسی ارزش اقتصادی رنگدانه های تهیه شده از آزولا اجرا شد.

۱-۱- تاریخچه رنگ مواد غذایی

قرن‌هاست که رنگ‌ها به اشکال مختلف به موادغذایی اضافه می‌شوند. طبق اسناد تاریخی حدود ۱۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در شهرهای مصر سازندگان شیرینی عصاره‌های طبیعی را برای بهبود ظاهر محصولات خود مورد استفاده قرار می‌دادند.

به دنبال انقلاب صنعتی، موادغذایی فرآیند شده و صنایع غذایی نیز به سرعت توسعه یافت و افزودن رنگ از طریق ترکیبات معدنی و فلزی به منظور پنهان کردن کیفیت پایین موادغذایی مورد استفاده قرار گرفت. در سال ۱۸۵۶ اولین رنگ سنتتیک توسط آقای William Heury Perkin تولید شد. رنگ‌های شیمیایی به سادگی و ارزانی تولید می‌شد و از نظر خواص رنگ‌آمیزی مقدار کمی از آنها مورد نیاز بود، آنها به سادگی مخلوط می‌شدند و برای از بین بردن طعم نامطلوب مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. با افزایش سریع استفاده از رنگ‌های شیمیایی اثرات آنها بر کیفیت مواد غذایی و سلامتی مصرف‌کنندگان مورد توجه قرار گرفت و این امر منجر به وضع قوانین زیادی در سراسر جهان در مورد استفاده از آنها شد، توسعه قابل توجه استفاده از رنگ‌ها و تجارت گسترده آنها از یک طرف و کاهش اعتماد مصرف‌کنندگان نسبت به صنایع غذایی به دلیل ترس از اثرات افزودنی‌ها بر سلامتی آنها از طرف دیگر به گسترش استفاده از رنگ‌های طبیعی در ۲۵ سال اخیر منجر شده است (Farzianpour, 2013) .

رنگ‌های طبیعی از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی دارای انواع متفاوتی هستند. از معایب رنگ های طبیعی حساسیت نسبت به اکسیداسیون، تغییر PH، نور، حلالیت ذاتی، پایداری کم، مشکلات در مصرف و هزینه بالاتر در مقایسه با رنگ های سنتتیک را می توان نام برد.طی سال‌های اخیر، روی رنگ‌دانه‌های طبیعی تحقیقات زیادی صورت گرفته و بهبودهای زیادی در زمینه پایداری و حلالیت آنها به وجود آمده است. افزودنی‌های مورد استفاده در فرمولاسیون رنگ‌های طبیعی می‌توانند دارای اثری مهم و قابل توجه بر پایداری رنگ‌ها و سهولت استفاده و درجه رنگ باشند.بیشتر پیشرفت‌های اخیر در استفاده از رنگ‌های طبیعی به منظور جلب توجه بیشتر مصرف‌کنندگان و کاهش حساسیت‌های منفی آنها نسبت به موادغذایی فرایند شده است. امروزه صنایع غذایی دارای طیفی گسترده از رنگ‌های طبیعی برای استفاده در فرایند تولید بوده و برای درنظر گرفتن علایق مصرف‌کنندگان در مورد افزودنی‌های مورد استفاده در فرمولاسیون رنگ‌ها در رقابتی دائم هستند.علایق مصرف‌کنندگان، تغییرات اجتماعی و پیشرفت‌های تکنولوژیکی منجر به توسعه استفاده از موادغذایی فرآیند شده و در نتیجه گسترش بازار رنگ‌های مورد استفاده در آنها شده است. به دلیل افزایش علاقه‌مندی مصرف‌کنندگان موادغذایی نسبت به موادغذایی طبیعی از

جمله رنگ‌ها پیش‌بینی می‌شود که استفاده از این مواد طی سال‌های آینده به طور متوسط حدود ۵ تا ۱۰ درصد افزایش یابد درحالی که میزان افزایش استفاده از رنگ‌های سنتتیک حدود ۳ تا ۵ درصد پیش‌بینی می‌شود (Davies, 1976).

در ایران در سال‌های اول دهه ۱۳۶۰ بدلیل استفاده از رنگ‌های غیر مجاز در اغلب فرآورده‌های غذایی، ابتدا مصرف رنگ ممنوع اعلام گردید، ولی با توجه به استفاده گسترده از انواع رنگ‌ها در فرآورده‌های غذایی مختلف این ممنوعیت موثر واقع نگردید و مشکلات بسیاری را بوجود آورد. در حال حاضر در صنایع غذایی مختلف موجود در کشور از رنگ‌های مصنوعی وارداتی جهت تولید محصولات مختلف استفاده می‌شود.

۲-۱- انواع رنگ‌ها

رنگ‌دانه‌های موجود در ماده‌ی غذایی به ۲گروه طبیعی و سنتتیک تقسیم می‌شوند(Jalilevand, 2009).

۱-۲-۱- رنگ های طبیعی

رنگ‌های طبیعیدارای ۳ منشاء گیاهی، حیوانی و یا معدنی می‌باشند.رنگهای طبیعی ممکن است از منابع طبیعی مختلف مانند گیاهان، حیوانات، مواد معدنی، دانه ها ، میوه ها، جلبک، حشرات، علف، چمن، ریشه چغندر، زردچوبه و برخی منابع دیگر بدست آیند یا اینکه از طریق سنتز تهیه شوند. در گذشته این رنگ ها از مواد معدنی نظیر دی اکسید تیتانیوم و حیوانات (از نوعی حشره) تهیه می شد. بطور کلی افزودن این مواد، به مواد و محصولات غذایی کاملاً مجاز و آزاداست . به همین دلیل به آنها " رنگهای بی نیاز به تائید " می گویند.رنگ های طبیعی به عنوان بخشی از رژیمهای غذایی مثل کلروفیل در سبزیجات و آنتوسیانین در میوه ها و..... در برنامه غذایی روزانه انسان وجود دارند. رنگ های طبیعی قرمز، آبی و بنفش از ریشه چغندر قند، تمشک و کلم قرمز، سبز از کلروفیل گیاهان و نارنجی و زرد از گروه کاروتنوئیدهای یافت شده در زردآلو، هویج و گوجه فرنگی استخراج می شوند. این رنگ ها طعم و مزه مواد غذایی را تحت تاثیر قرار نمی دهند. از مهمترین رنگ های طبیعی کاروتنوئیدها را می توان نام برد. از انواع کاروتنوئیدها کاروتن، لیکوپن، بیکسین و آنتوسیانین ها قابل ذکر هستند. رنگ های طبیعی مشابه طبیعی داشته و چنانچه مواد اولیه مناسب و در دسترسی وجود نداشته باشد ساختمان شیمیایی رنگدانه‌های طبیعی شناسایی شده و بطور مصنوعی در صنعت تولید می‌گردد(Smith and Hong Shung, 2001).

۲-۲-۱- رنگ‌های سنتتیک (مصنوعی)

این رنگها در طبیعت وجود ندارند واز طریق سنتز ساخته می شوند. رنگهای مصنوعی موجود بطور معمول از نظر شیمیایی خیلی خالص بوده و از نظر قدرت رنگ آمیزی نیز استاندارد شده اند. قدرت رنگ آمیزی آنها به طور مستقیم متناسب با مقدار رنگ یمیایی موجود در آنهاست. رنگهای مصنوعی محلول در آب در سطح وسیعی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته و بطور معمول از نظر پایداری، سازگاری و اقتصادی مناسب می باشند(Branen, 2001).

نگرانیهای مصرف کنندگان از حیث مصرف رنگ مصنوعی سبب تمایل صاحبان صنایع غذایی به سمت ارتقاء مواد غذایی و جایگزینی رنگهای مصنوعی با رنگ های طبیعی شده است. با این وجود، رنگهای مصنوعی به دلایل قیمت پائین تر و ایجاد رنگشدیدویکنواختدر مواد غذایی و سهولت ترکیب شدن آن با سایر رنگ ها مورد توجه صاحبان صنایع هستند. پس ازتحقیق و بررسی اثرات مضراستفاده از رنگهای مصنوعی استفاده از این رنگ ها برای فرآوری مواد غذایی در بعضی از کشور ها رو به کاهش است. اما، تغییراز رنگهای مصنوعی به سمت رنگ های طبیعی روند کندی را طی می کند که به نظر می رسد تحت تاثیر هزینه نسبتا بالاتر تهیه رنگهای طبیعی در مقایسه با رنگ های مصنوعی باشد. رنگ‌های سنتزی مشابه طبیعی نداشته و در حقیقت ترکیبات شیمیایی هستند که در طبیعت وجود نداشته و با استفاده از روش‌های شیمیایی ساخته و سنتز می‌شوند. ساختمان شیمیایی آن‌ها پیچیده و گسترده بوده و به موازات آن نام‌های شیمیایی آن‌ها بسیار طویل و طولانی خواهد بود. از حروفF-D-C برای نام‌گذاری این رنگ ها استفاده می‌شود(Fمخففfood،Dمخففdrag و Cمخففcosmeticمی‌باشند). بنابراین دارا بودن این کد برای رنگ سنتتیک به مفهوم مجاز بودن استفاده از آن در غذا- دارو و مواد آرایشی- بهداشتی می‌باشد (Caivano and Buera, 2012).

۳-۱- کاروتنوئید

کاروتنوئیدها عضوی از تتراپرپنوئیدها هستند که رنگهای زرد، پرتقالی و قرمز جزء آنهاست. در گیاهان سبز کاروتنوئیدها جزئی از دستگاه فتوسنتزوهمراه کلروفیل هستند. اساساً رنگ سبز کلروفیل اجازه ظهور رنگ کاروتنوئیدی را نمی‌دهد اما با تجزیه کلروفیل رنگهای کاروتنوئید ظاهر می‌شود. نام کاروتنوئید از نام هویج مشتق گرفته شده است زیرا اولین بار در سال ۱۸۳۱ از این گیاه استخراج گردید. کاروتنوئیدها در حلالهای غیرقطبی ازجمله روغنها بسیار محلول بوده اما در آب نامحلول هستند . کاروتنوئیدها را می توان به سهولت به وسیله هگزان ، اتر و بنزن از بافتهای گیاهی جدا نمود. کاروتنوئیدها دارای ۴۰ کربن هستند که از ۸ واحد ایزوپرن تشکیل گردیده است. البته اخیراً ترکیباتی متعلق به این گروه یافت شده است که بیش از ۴۰ کربن دارند. این مواد فقط توسط

گیاهان سنتز و تولید می شوند اما طبیعتاً از طریق مصرف مواد گیاهی به عالم حیوانی وارد می‌گردند و در آنجا تغییر شکل می یابند یا ذخیره می شوند مثل زرده تخم مرغ که توسط کاروتنوئیدها رنگین شده است (Edge et al, 1997; Kim et al, 1997) .

کاروتنوئیدها رنگ دانه های محلول در چربی هستند که بطور عمده در گیاهان ، جلبکها ، باکتریهای فتوسنتز کننده یافت می شوند. همچنین درتعدادی از باکتریهای غیر فتو سنتز کننده، مخمر و قارچها ممکن است دربرابر تخریب فوری و اکسیژن یک عملکرد حفاظتی داشته باشند. همانطوریکه انتظار می رود جانوران قادربه سنتز کاروتنوئیدها نیستند، و کاروتنوئیدها را از طریق رژیم غذایی خود دریافت می کنند. درجانوران کاروتنوئیدها درآماده سازی و رنگ پذیری درخشان ، تهیه آنتی اکسیدانها و همینطور می توانند یک منبع غنی از ویتامین A باشند.کاروتنوئیدها مسئول تغییر رنگهای زرد، نارنجی و قرمز دربرگها، گیاهان، میوه ها، گلها و رنگهای پرهای زینتی بسیاری از پرندگان ، حشرات، رنگ صورتی در فلامینگو و ماهی قزل آلا و سخت پوستانی نظیر خرچنگ دریایی می باشند. کاروتنوئیدها پیچیده ترین طبقه از رنگهای مواد غذایی طبیعی با حدود ۷۵۰ ساختار متفاوت در طبیعت هستند و کاروتنوئیدهای مشتق شده از یک زنجیره ۴۰ کربنه پلی ئن شناخته شده اند. این زنجیره ممکن است با یک حلقه پایان یافته وبا گروههای واکنشگر با اکسیژن تکمیل شده باشند. رنگ کاروتنوئیدها ناشی از حضور یک سیستم از پیوند های مضاعف کنژوگه می باشد. هرچه تعداد این نوع پیوند در مولکول بیشتر باشد باندهای جذب اصلی به ناحیه ای با طول موج بیشتر انتقال یافته در نتیجه رنگ قرمز تر می شود(Tsukida et al, 1982).

حداقل هفت پیوند مضاعف کنژوگه لازم است تا یک رنگ زرد محسوس ظاهر شود.پیوندهای دوگانه در کاروتنوئید های مواد غذایی ازنوع ترانس هستند. قویترین رنگ مربوط به زمانی است که تمام پیوندها ازنوع ترانس باشد هرچه برتعداد پیوندهای سیس اضافه شود رنگ تدریجاً روشن تر می‌گردد. عواملی که سبب تبدیل پیوند ترانس به سیس می شوند عبارتند از نور، حرارت و اسید. ایزومر های سیس نسبت به ترانس در طول موج های کوتاه تری جذب نور می‌کند و ضرایب خاموشی کمتر را نشان می دهند. ازنظر تئوری بتاکاروتن می تواند ۲۷۲ ایزومر فضایی داشته، اما درتشکیل این ساختمانهای ایزومری مختلف نوعی حالت ممانعت فضایی وجود دارد بطوریکه فقط تشکیل ۲۰ نوع ایزومر میسر می باشد، که درعمل تنها ۱۲ نوع مشاهده می شوند و اکثراً دارای یک یا دو پیوند سیس هستند (Winter, 2009) .

کاروتنوئیدها به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

۱ – کاروتن ها با فرمول شیمیایی C40H56که فقط ماهیت هیدرو کربنی دارند.

۲ – گزانتوفیلهابا فرمول شیمیایی C40H56O2 که مشتقات اکسیژنه شده این هیدروکربنها هستند.

اکسیژن در گزانتوفیل ها ممکن است بصورت گروههای هیدروکسیل، فتوکسیل، کربوکسیل و کتونی وجود داشته باشند . بیش از ۴۵۰ نوع کاروتنوئید مشخص شده که بیشتراز ۵۰ نوع آن در پرتقال مشاهده گردیده است .

گزانتوفیل ها یا در اصل فیلوگزانتین ها رنگیزه های زرد رنگی از گروه کاروتنوئید ها می‌باشند. ساختار مولکولی آنها برعکس ساختار کاروتن هااست، بعضی از اتمهای هیدروژن در آنها با گروههای هیدروکسیل تعویض شده اند و یا برخی از جفت اتمهای هیدروژن با اتمهای اکسیژن جابجا شده اند. گروهی از گزانتوفیل ها عبارتند از: لوتئین، زی گزانتین، آلفا کریپتوگزانتین، بتا کریپتو گزانتین. حیوانات نمی‌توانند گزانتوفیل تولید کنند بنابراین گزانتوفیل موجود در حیوانات (به عنوان مثال در چشم آنها) از غذای خورده شده جذب می‌شود یا رنگ زرد در زرده تخم مرغ نیز از گزانتوفیل خورده شده است(Alcaíno, 2008) .

گزانتوفیل ها فرم اکسیده شده کاروتن ها هستند که دارای گروههای هیدروکسیل اند و قطبی تراز کاروتن ها می باشند. در نهایت ساختار کاروتنوئید است که مشخص می‌کند کدام عملکرد بیولوژیکی بالقوه دررنگدانه ممکن است وجود داشته باشد، الگوی مشخص ازپیوند های تک و دوگانه درپیش زمینه پلی کاروتنوئید هاست که اجازه جذب زیاد انرژی از دیگر مولکولها رابهآنها می‌دهد، درحالیکه طبیعت خاص گروه انتهایی کاروتنوئید ها ممکن است موجب قطبیت آنها شود (Khanafari et al, 2007) .

در بدن انسان کاروتنوئیدها می‌توانند چندین وظیفه مهم را انجام دهند. طبق دانسته های موجود، نقش غذایی کاروتنوئید ها پرو ویتامین های و جلوگیری از کمبود این ویتامین دربدن است. فقدان این ویتامین دلیل بزرگ مرگ و میرهای نابهنگام ملل درحال توسعه خصوصاً درمیان بچه هاست (Ahmed et al, 2007).

کاروتنوئیدها به عنوان پیش ساز ویتامین A عمل کرده و ازکمبود آن جلوگیری می کنند. بتاکاروتن دراثر شکسته شدن وتقسیم شدن به دو نیمه مساوی، دو مولکول ویتامین A تولید نمی‌نمایند، اما ترکیبات دیگر نظیر کاروتن که فقط نیمی ازآنها ازنظرساختمانی شبیه بتاکاروتن می‌باشد، هرمولکول آن قادراست یک مولکول ازاین ویتامین راتولیدنماید. ویتامین A که چندین عملکرد حیاتی درانسان دارد می تواند دربدن ازکاروتنوئیدهای معینی بخصوص بتاکاروتن تولیدشود، بتا کاروتن رژیم غذایی ای از تعدادی میوه و سبزیجات مانند هویج، اسفناج، هلو، زردآلو و سیب زمینی بدست می‌آید. دیگر کاروتنوئید های پروویتامین A شامل کاروتن که در هویج، کدوتنبل و فلفل زرد و قرمز همچنین کریپتوگزانتین ها که در پرتقال، نارنگی ، هلو، شلیل و انبه هندی یافت می‌شوند(Qiu et al, 2008) .

کاروتنوئیدها همچنین نقش بالقوه ای در سلامتی انسان با فعالیتی نظیرآنتی اکسیدان های زیستی در حفاظت از سلولها و بافتها دربرابر اثرات زیانبار رادیکالهای آزاد اکسیژن دارند. لیکوپن کاروتنوئید هیدروکربنی که به گوجه فرنگی رنگ قرمز می‌دهد در خاموش کردن اثر مخرب و بالقوه اکسیژن یکتایی موثر است. لوتئین و زآگزانتین گزانتوفیل که درغلات وسبزیجات پر برگ مانند کلم پیچ و اسفناج یافت می‌شوند وظایفی مانند حفاظت آنتی

اکسیدان در ناحیه لکه زرد شبکیه چشم انسان دارند. آستاگزانتین، گزانتوفیلی که درماهی آزاد، میگو و دیگر غذاهای مرکب از جانوران دریایی یافت شده، یکی دیگر از گزانتوفیل های طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی قوی است(Golkhoh and Baratalab, 2007) .

از دیگر مزایای پزشکی کاروتنوئیدها،که احتمالا وابسته به خاصیت آنتی اکسیداتی آنها می باشد، بالا بردن قدرت سیستم ایمنی، محافظت از آفتاب زدگی و جلوگیری از پیشرفت بعضی از سرطان هاست. کاروتنوئیدها نیز به عنوان عوامل ضدسرطان، افزایش‌دهنده طول عمر و بازدارنده زخم معده و بیماری‌های قلبی –عروقی معرفی شده‌اند. بطوری‌که انسیتو ملی سرطان ایالات متحده امریکا مصرف غذاهای حاوی مقادیر زیاد کاروتنوئید را در رژیم غذایی روزانه توصیه نموده‌است(Khodaitan et al, 2007).

۱-۳-۱- رنگدانه کاروتن

کاروتن واژه عمومی است که برای هیدروکربن های پلی ان دارای ۴۰ اتم کربن (زیر گروه هیدروکربن های غیر اشباع) استفاده می شود. از نظر ساختاری تترا ترپنوئید و فاقد اکسیژن می باشد. توسط گیاهان سنتز شده در آمریکا، نیوزیلند، کانادا و اتحادیه اروپا به عنوان افزودنی غذایی پذیرفته شده است. از پیگمان های فتوسنتز کننده مهم بوده و به عنوان پیش نیاز سنتز رنگدانه های گزانتوفیلیمحسوب می شود (Khosravi Mashizi et al, 2012).

به رنگ زرد بوده و یکی از انواع کاروتنوئیدها هستند که بصورت محلول در چربی یا به اشکال ویژه در آب پراکنده شده و یا به صورت مصنوعی که مشابه نوع طبیعی در تجارت کاربرد دارد، وجود دارند. انواع کاروتن ها شامل آلفا کاروتن، بتا کاروتن، گاما کاروتن، فیتوئن و فیتوفلوئن می باشد. براساس قوانین اتحادیه اروپا، کاروتن گیاهی ممکن است ازگیاهان خوراکی مثل هویج، یونجه، ذرت همچنین دیگر محصولات طبیعی مثل عصاره جلبک دونالی(*Dunaliella*) و آزولا نیز یافت شود (Dietz et al, 1988) .

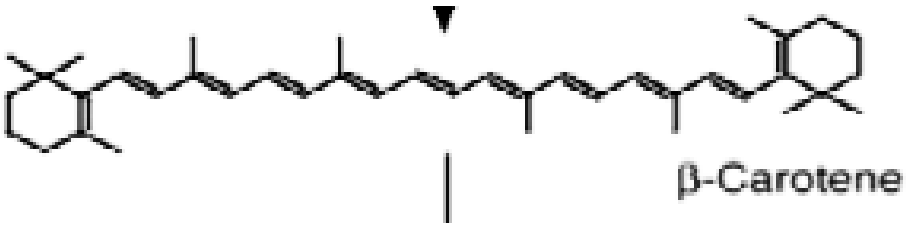
۲-۳-۱- رنگدانه بتا کاروتن

بتاکاروتن ترکیب غیر قطبی و یکی از مهمترین کاروتنوئید های پیش ساز ویتامین A است. کاروتن ها طیف وسیعی از رنگهای زرد تا پرتقالی را ایجاد می‌کنند. ازکاروتن‌ها علاوه بر اینکه به عنوان رنگ استفاده می‌شود، برای اهداف تغذیه ای و مکمل های غذایی به عنوان پرو ویتامین مثل مارگارین و کره کاربرد دارد. دردیگر فرآورده های غذایی مثل روغنها، پنیر، نوشابه های غیرالکلی، بستنی، ماست، دسرها، فرآورده های شکر و آردی قنادی، ژله ها و سس ها و فرآورده های گوشتی نیز بکار می‌رود. از نظر ساختاری ترکیب آلی آلکنی، از خانواده ترپن ها، دایمر ویتامین A و قابلیت تبدیل به ویتامین A را دارد. از گروه های رتینول تشکیل شده و در چربی و آب قابل حل هست. بتا کاروتن از

سال ۱۹۶۴ برای کاربرد در صنایع دارویی، غذایی و از سال ۱۹۷۷ برای کاربرد در لوازم آرایشی توسط FDA پذیرفته شده است. همچنین کاربرد بتا کاروتن استخراج شده از جلبک آب شور دانیلا سالینا در استرالیا محدو شده است (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۰).

ازنظر تئوری بتاکاروتن می تواند ۲۷۲ ایزومر فضایی داشته، اما درتشکیل این ساختمانهای ایزومری مختلف نوعی حالت ممانعت فضایی وجود دارد بطوریکه فقط تشکیل ۲۰ نوع ایزومر میسر می باشد. اما، درعمل تنها ۱۲ نوع مشاهده می شوند و اکثراً دارای یک یا دو پیوند سیس هستند (Higuera-Ciapara et al, 2006).

بتاکاروتن دراثر شکسته شدن وتقسیم شدن به دو نیمه مساوی، دو مولکول ویتامین A تولید نمی نمایند، اما ترکیبات دیگر نظیر کاروتن که فقط نیمی ازآنها ازنظرساختمانی شبیه بتاکاروتن میباشد، هرمولکول آن قادراست یک مولکول ازاین ویتامین راتولید نماید. الگوی مشخص پیوند های تک و دوگانه درپیش زمینه پلی کاروتنوئید ها اجازه جذب زیاد انرژی از سایر مولکولها رابه آنها می دهد، درحالیکه طبیعت خاص گروه انتهایی کاروتنوئید ها ممکن است موجب قطبیت آنها شود(Rymbai et al, 2011) .



شکل ۱ - ساختار شیمیایی بتا کاروتن

۴-۱- آزولا

آزولا یک ماده خام غنی از ۱۹ - ۳۰ درصد پروتئین، ۳ – ۶ درصد چربی، ۱۰ – ۲۰ درصد خاکستر، ۵۵ درصد اسید آمینه، ۱۰- ۲۰ درصد سلولز، ۱۰ – ۴ درصد نشاسته، ۳/۵ درصد هیدرات کربن و ۱۰ – ۷ درصد اسیدهای آمینه ضروری بر اساس وزن خشک هست. آزولا به دلیل توقف اشتها و افزایش مصرف انرژی به عنوان غذای رژیمی محسوب شده است. این گیاه علاوه بر این که از پروتئین غنی بوده دارای چربی و کلسترول کمی بوده، برای غذای ورزشکاران و بدن سازان به عنوان منبع عالی برای کنترل و کاهش وزن است. آزولا دارای موادی است که به بالانس افزایش و کاهش قند در بدن کمک می کند. این گیاه به عنوان مکمل غذایی پروتئینی و رژیمی برای اقشار مختلف جامعه و در تمام سنین کاربرد دارد. پودر تهیه شده از آزولا به عنوان چاشنی غذایی در تهیه انواع غذاها در

آشپزخانه ها نیز قابل استفاده است. علاوه بر این، ترکیب آزولا دارای ترکیب آنتی اکسیدانی بتا کاروتن می باشد. این خاصیت آزولا سبب می شود که این پودر علاوه بر جنبه غذایی و دارا بودن ارزش غذایی در صنعت غذایی ارزش دارویی نیز داشته باشد و در برنامه غذایی بیماران گنجانده شود(وارسته و رجبی اسلامی، ۱۳۹۱).

گیاهانی که در تالاب انزلی غوطه ور هستند، تولید کننده اکسیژن برای محیط آبی اند و محل مناسبی برای تخم گذاری جانوران ریزی هستند که ماهی ها از آن تغذیه می کنند، اما گیاه آزولا به دلیل رشد سریع، در فصل تابستان سطح تالاب را می پوشاند به نحوی که از نظر زیست محیطی باعث کاهش میزان نفوذ نور واکسیژن به داخل آب شده و باعث به مخاطره انداختن حیات آبزیان می شود. این در حالی است که پودر تولیدی از گیاه آزولادارای ارزش غذایی قابل توجهی بوده و می توان از آن برای مصارف مختلف انسانی استفاده نمود. بنابراین با تهیه پودر از آزولا علاوه بر جلوگیری از به مخاطره افتادن حیات آبزیان می توان از این گیاه فرآورده های با ارزش غذایی که می توانند برای بیماران، ورزشکاران و سایر اقشار جامعه مفید باشند، تهیه کرد (اسفیاء،۱۳۷۹).

گیاهان سبز (آزولا) به دلیل توانایی آن ها در سنتز تعداد زیادی از آمینواسیدها به عنوان ارزان ترین و غنی ترین منبع پروتئین ها می باشند. آزولا یک آنتی اکسیدان فیزیولوژیکی، غنی از اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین های گروه B، بتا کاروتن، مواد معدنی شامل کلسیم، فسفر، پتاسیم، آهن، مس، منیزیم و پیش ساز ویتامین A بوده فاقد میکوتوکسین، آفلاتوکسین، سموم اورگانوفسفره و اورگانوکلراید است. بوی آن ناچیز بوده و طعم آن شبیه به کاهو می باشد. آزولا از جمله غذاهای سالم و مغذی محسوب شده است. این گیاه به شکل سالاد قابل مصرف روزانه است. آزولا در بعضی از کشورها به شکل پودر شده و خشک شده عرضه می شود(اسفیاء، ۱۳۷۱).

شکل ۲- آزولا

۵-۱- بیان مسئله

تهیه بتا کاروتن طبیعی از آزولا به عنوان رنگ خوراکی طبیعی جهت کاربرد در صنعت غذایی و جایگزینی آن به جای ترکیبات سنتتیک به دلیل این که فاقد اثرات سمی و زیان آور برای سلامتی انسان است حائز اهمیت می باشد. علاوه بر این، کاربرد این رنگ در مواد غذایی به دلیل تاثیر آن بر حفظ سلامتی انسان مانند افزایش ایمنی، خواص آنتی اکسیدانی، منبع مهم و امن پیش ویتامین A، خواص ضد سرطانی و خورنده گی رادیکال های آزاد در دنیا مطرح می باشد. تولید رنگ ها بطور سنتتیک از سال ۱۹۶۰ برای عرضه در صنعت غذایی شروع شده است(Smith and Hong – Shung, 2001). ترکیب بتا کاروتن در سرخس آب شیرین مانند آزولا *filiculoides* وجود دارند. هم اکنون در بسیاری از نقاط ایران مردم از غذاهای غلاتی بخصوص برنج در برنامه غذایی روزانه استفاده می کنند. با توجه به این که برنج فاقد ویتامین A می باشد در کشورهایی که برنج غذای اصلی آن هاست (مخصوصاً شمال ایران) مردم از نظر این ویتامین دارای کمبود هستند که اثرات متعددی روی بچه های کوچک و زنان حامله دارد(.Silverman, 1999). با توجه به نقش های متعدد ویتامین A در سیستم بینایی و ایمنی انسان و این که ویتامین A یک میکرونوترینت ضروری برای بدن بوده که در داخل بدن انسان قابل سنتز نبوده و غنی سازی غذاها با این ویتامین از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد و هنوز در جهان کاربرد ندارد کارد غذاهای غنی سازی شده با ترکیبات ارزان قیمت و غنی از پیش ساز ویتامین A مانند بتا کاروتن در برنامه عذایی انسان از ضروریات است(Hopkins, 2006). غذاها و تنقلات حاوی ترکیبات بتا کاروتن به عنوان غذاهای عملگرا نیز مطرح هستند(غذاهای عملگرا محصولات غذایی با شعارهای سلامت‌بخش هستندکه مزایای فیزیولوژیک خاصی از خود نشان می‌دهند و علاوه بر خواص تغذیه‌ای پایه، سبب ایجاد تغییرات مثبت مانند کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های سخت و مزمن می‌شوند). (Silverman, 1999)

با توجه به این که تنقلات، شیرینی ها، چاشنی ها و غذاهای اصلی عمل آوری شده با رنگ های خوراکی در اقشار و سنین مختلف جامعه به صورت روزانه و در فواصل زمانی کم مورد استفاده وسیع قرار می گیرند و بر اساس مضرات ناشی از مصرف ترکیبات سنتتیک بر بدن انسان جایگزینی این ترکیبات با رنگ های سنتتیک در کارخانجات صنایع غذایی اعم از بستنی، نوشابه، کره، پفک، چیپس و غیره از موارد کاربرد این رنگ ها می باشد.

۶-۱- ضرورت اجرای پروژه

اهمیت و ضرورت اجرای طرح :افزودنی‌های غذایی از قبیل رنگ‌دهنده‌های طبیعی مواد مفیدی هستد که امروزه از آنها به منظور بهبود کیفیت، ارتقاء ارزش تغذیه‌ای و رفع مشکلات تکنولوژیکی تولید مواد غذایی استفاده می‌شود(Branen et al.,2001). با توجه به تاثیر مستقیم رنگ بر کیفیت مواد غذایی می توان رنگ را به عنوان یکی از

مهمترین مشخصه های کیفی مواد غذایی در نظر گرفت. توجه به نقش بسیار مهم رنگ های غذایی در بالا بردن مقبولیت مواد غذایی، جلب اشتها و نظر مصرف کننده، هویت دادن به ماده غذایی (مثلا رنگ نارنجی در نوشابه پرتقالی یا رنگ سبز در ژله طالبی)، رنگ دادن به محصولات بی رنگ مثل پاستیل و پفک (تنقلات مورد مصرف در کودکان) و تزیین ماده غذایی (مثل رنگهای مصرفی در قنادی) رنگ ها به غذا از زمان های باستان انجام افزوده می شد(Caivano and Buera, 2012). در گذشته این رنگ ها از مواد معدنی نظیر دی اکسید تیتانیوم و حیوانات (از نوعی حشره) تهیه می شد(Hutchings, 2003). اما هم اکنون با نظر به اهمیت روزافزون این ترکیبات و مصرف بالای افزودنی‌ها در واحدهای صنعتی کشور و به دلایل متعددی مانند کاهش ضریب هوشی و بروز پیش فعالی در کودکان، تجمع مواد سنتتیک در مواد غذایی، عوارض ناشی از انتقال آن به انسان و تاثیر آن بر سلامت انسان ، فاقد ارزش غذایی بودن رنگ های سنتتیک در مقایسه با رنگ های طبیعی و افزایش تقاضا برای مصرف رنگ های طبیعی، کارخانجات مواد غذایی به استفاده از رنگ های طبیعی روی آورده اند(Chawla, 2002). اما در کشور ایران تا کنون از رنگ های خوراکی طبیعی در کارخانجات صنایع غذایی استفاده نشده است.

در سراسر دنیا طی چند سال اخیر یازار رنگ های غذایی طبیعی ۱۰ تا ۱۵ درصد رشد داشته است که به دلیل علاقه مصرف کنندگان به محصولات طبیعی است(.MacDougall. 2002) در حال حاضر بیش از ۹۰ درصد از بتا کاروتن در بازار دنیا بوسیله سنتز شیمیایی با استفاده از مواد خام مشتق شده از پترولیوم سنتز می شوند. تولید بتا کاروتن از گلوکز نیز معمول است(Branen et al, 2001). پیگمان آزولا شامل بتا کاروتن به عنوان یک رنگ غذایی طبیعی استفاده می شود.با توجه به منبع تولید آزولا و رویش این گیاه بطور طبیعی و بدون صرف هزینه جهت تولید در دریا و تکثیر سر یع آن، مقرون به صرفه نبودن جمع آوری فیزیکی این گیاه ازحیث اقتصادی ، عدم وجود اثرات شیمیایی مخرب توسط این گیاه،کاربرد گسترده آن به عنوان کود سبز یا کود بیولوژیکی در مزارع برنج و غنی بودن آن از رنگ خوراکی بتا کاروتن می توان از این گیاه برای تهیه فرآورده های بیولوژیک و با ارزش افزوده مانند رنگدانه بتا کاروتن جهت کاربرد در صنعت غذایی استفاده کرد(Smith and Hong – Shung, 2001). بر اساس تحقیقات انجام شده سالانه مقداری برابر با ۶۷۰ تن در هکتار آزولا در تالاب انزلی تولید می شود. در حال حاضر با توجه به شرایط جوی و دمایی تالاب انزلی تنها گونه وحشی آزولای تالاب انزلی گونه *filiculoides* است (اسفیاء، ۱۳۷۱).

با توجه به بررسی های انجام شده سالانه به ارزش اقتصادی ۴۱۸/۴۴۵/۵ دلار بتا کاروتن مصنوعی در سال ۹۰ وارد کشور شده که تولید بتا کاروتن در کشور علاوه بر خودکفایی، موجب عدم خروج ارز از کشور و ایجاد اشتغال در کشور خواهد شد. میانگین واردات بتا کاروتن و میزان مصرف سالانه بتا کاروتن مصنوعی کشور ۳۰۷۰۳ تن در سال ۱۳۸۹ بوده که با توجه به مصرف داخلی و میزان تولید میزان کمبود بتا کاروتن تا پایان برنامه پنجم (سال ۹۲) معادل ۳۳۸ تن می باشد(اتاق بازرگانی ، صنایع ، معادن و کشاورزی. ۱۳۹۱).

۷-۱- پیشینیه تحقیق

۱-۷-۱- بررسی پژوهش های داخل کشور

در کشور ایران در مورد تهیه بتا کاروتن توسط زارع و کیانی راد در سال ۱۳۸۳ از کپک *Blakeslea trispora* به روش تخمیر، رضوی و همکاران در سال ۱۳۸۴با استفاده از مخمر*Sporobolomyces ruberrimus H110* بوسیله روشهای مختلف فیزیکی و شیمیایی، بایگان و همکاران در سال ۱۳۸۸ در جلبک دونالیلا سالینا با استفاده از تغییر شرایط کشت و مقدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ به روش صابونی کردن از جلبک ریز سلولی دونالیلا سالینا تحقیق شده است.

زارع و کیانی راد در سال ۱۳۸۳ بتا کاروتن را از کپک *Blakeslea trispora* به روش تخمیر تهیه کردند. او جهت تولید بتا کاروتن در محیط کشت تولید به صورت توام از دو سویه مثبت و منفی در فرمانتور ۱۵ لیتری همزن دار و فرمانتور ۷۵ لیتری ایرلیفت دار کشت داد. و همزمان با دوزهای مختلف در فرمانتور همزن دار و شرایط هوادهی مختلف در هر دو فرمانتور مورد بررسی قرار داد. او نتیجه گرفت که رشد و تولید بتا کاروتن بوسیله این کپک یک فرآیند کاملاً وابسته به میزان هوای محیط است. در فرمانتورهای هم زن دار با افزایش میزان هوادهی و تا حد مشخصی با افزایش دور هم زن از ۱۰۰ تا ۴۰۰ دور در دقیقه میزان تولید بتا کاروتن تا حد ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت. هم چنین فرمانتورهای ایرلیفت از قابلیت بهتری در زمینه هوادهی محیط کشت و در نتیجه تولید بتا کاروتن بوسیله این کپک برخوردار است.

رضوی و همکاران در سال ۱۳۸۴ تهیه کاروتنوئیدها از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus H110* را تحقیق کردند. او در این تحقیق، استخراج کاروتنوئید ها از یک سوش مخمر جدید*Sporobolomyces ruberrimus H110* توسط روشهای مختلف فیزیکی و شیمیایی مورد بررسی و تحقیق قرار داد. او ار غلظت های مختلف اسید کلرید ریک (۰/۲ و ۰/۵ نرمال) در دو حرارت 55^oC و 75^oCو همچنین از حلالDMSO جزء روش های استخراج شیمیایی استفاده کرد. اعمال روش سونیکاسیون و سایشی با استفاده از گلوله های ریز شیشه ای از روشهای فیزیکی استخراج در این پژوهش بود. در بین تمامی روش های بکار رفته شده، روش استفاده از حلال شیمیاییDMSO و روش سایشی جزء موثرترین روشهای اعمال شده بودند که از نظر مقایسه، روش سایشی با استفاده از دستگاه سایشی گلوله ای دارای راندمانی حدود 30% بالاتر از روشDMSO بود. از دیگر مزایای این روش، عدم استفاده از حلال های سمی آلی و در نتیجه بهداشتی بودن محصول استخراج شده می باشد.

بایگان و همکاران در سال ۱۳۸۸ تولید بتا کاروتن را در جلبک دونالیلا سالینا تحقیق کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که کشت جلبک *Dunaliella salina* در محیط مایع، منجر به تغییر رنگ جلبک از سبز به نارنجی می شود که نشان دهنده تولید این رنگدانه مهم طبیعی در داخل این جلبک می باشد. همچنین افزایش زمان کشت جلبک تا ۲۸

روز، افزایش تولید بتا کاروتن را به دنبال دارد و با افزایش غلظت جیوه از صفر تا µ M50 در محیط کشت جلبک و اعمال شرایط تنش زا، میزان تولید بتا کاروتن افزایش یافت. افزایش تولید بتاکاروتن با تغییر رنگ جلبک از سبز به نارنجی در اثر غلظت های مختلف کلرید جیوه در محیط کشت نمایان شد.

مقدسی و همکاران در سال ۱۳۹۰ میزان بتا کاروتن را در عصاره اتانولی جلبک دونالیلا سالینا بررسی کرد. او عصاره را با استفاده از HPLC آنالیز کرد. او در این سنجش از استاندارد بتا کاروتن با کد c4582 استفاده کرد.

۲-۷-۱- بررسی پژوهش های خارج کشور

برای تهیه بتا کاروتن از آزولا در سایر کشورها توسط Lejeune و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از حلال، Venugopalو همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از حلال و Mostafa و همکاران در سال ۲۰۱۲ به روش Tee، تحقیق شده است.

Lejeune و همکاران در سال ۲۰۰۰ تاثیر متد خشک کردن و زمان ذخیره را روی آزولا تحت دو نوع شرایط پرورشی (خواب و گلخانه ای) تحقیق کرد. روی مواد تازه مقدار کاروتن محدوده ای از ۲۰۶ تا ۶۱۹ mg/kg در وزن خشک(dm) بود. مقدار کاروتن در هنگام خشک کردن با آون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در یک نسبت ثابت ۶٪ h^{-1} کاهش وزن خشک کاهش یافته، کاهش مقدار کاروتن به ۴۵ ، ۷۱و ۸۶٪ رسید) آزولای خشک شده به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس بعد از چهار ماه ذخیره پائین ترین مقدار کاروتن را داشت (کاهش به مقدار ۶۹٪ به نسبت ثابت ۱ درصد روزانه از ۲۵۹ تا ۷۹ mg/kg در وزن خشک). نتایج نشان داد که آزولا یک منبع قوی از پرووِیتامین A است. *Azolla filiculoides* بهترین منبع بتا کاروتن و *Azolla Mexicana* فقیرترین منبع بتا کاروتن بود. او برای بررسی کیفیت بتا کاروتن استخراج شده از اسپکتروفتونتر در طول موج ۴۶۰ نانومتر استفاده کرد

Venugopal و همکاران در سال ۲۰۰۶ بتا کاروتن را از *Azolla anabaena* استخراج کرد. او کاروتنوئید را با استفاده از ذوب و انجماد متناوب در استن ۸۵٪ استخراج کرد. آن ها برای بررسی کیفیت فرآورده از رنگ سنجی با اسپکتروفتومتر، پروتئین، کربوهیدرات ها، کلروفرم(Ch1)، PBS و ARA استفاده کردند.

Mostafa و همکاران در سال ۲۰۱۲ بتا کاروتن را از *Azolla caroliniana* با استفاده از متد Tee با تغییرات کمی که در آن داده شد استخراج کرد. جهت بررسی کیفیت بتا کاروتن به دست آمده از HPLC استفاده شد.

۸-۱- فرضیات یا سؤالات تحقیق

H صفر: رنگدانه طبیعی بتا کاروتن از آزولا قابلیت رقابت با بتا کاروتن طبیعی با نشاء sigma را دار.

H یک: رنگدانه طبیعی بتا کاروتن از آزولا قابلیت رقابت با بتا کاروتن طبیعی با نشاء sigma را ندارد.

۹-۱- اهداف پروژه

تعیین وزن ماده خشک در یک کیلو گرم گونه وحشی آزولای تالاب انزلی

تعیین میزان کمی و کیفی رنگدانه های طبیعی گونه وحشی آزولای تالاب انزلی

تعیین مقادیر و در صد خلوص رنگدانه بتا کاروتن از گونه وحشی آزولای تالاب انزلی

بررسی ارزش اقتصادی رنگدانه های تهیه شده از آزولا

۲ - مواد و روش ها

۲-۱- تجهیزات

جدول ۱: لوازم و تجهیزات غیر مصرفی استفاده شده برای انجام آزمایشات

دستگاه	کارخانه/کشور سازنده
Hunter lap (اسپکتروفتومتر انعکاسی)	تکست فلش/ آمریکا
HPLC	آمریکاShimadzu Model:SCL-10Avp/
اسپکتروفتومتر	Jenway 6715 UV/Vis/آمریکا
اتویا آون خشک کن	Memertآلمان
ترازوی آزمایشگاهی دقیق با دقت ۰/۰۰۱ گرم	AND آلمان
هیتر	/ چین Dragon lab
دستگاه سوکسله	Behr-AK5 آلمان
کوره	Fine tech کره
کجلدال	Gerhardt- behr آلمان
آسیاب برقی	مولینکس فرانسه
pH متر	AZ تایوان

۲-۲- مواد مصرفی

جدول ۲: مواد شیمیایی استفاده شده برای استخراج بتاکاروتن

ماده شیمیایی	کد/کارخانه/کشور سازنده
بتا کاروتن سنتتیک	c4582/ سیگما/ آمریکا
آسکوربات سدیم	۵۰۰۰۷۶/ مرک/ آلمان
پترولیوم اتر	۱۰۱۷۶۹ / مرک / آلمان
نشاسته	۱۰۱۲۵۲/ مرک/ آلمان
یدور پتاسیم	۱۰۵۰۴۳/ مرک/ آلمان
اسید بوریک	۱۰۰۱۶۵/ مرک/آلمان
معرف پروتئین	//
اسید سولفوریک غلیظ	۱۰۰۷۱۳ / مرک /آلمان
اتانل صنعتی ۹۶ درصد	۱۰۰۹۸۳ / مرک / آلمان
فنل فتالئین	۱۰۷۲۳۳ / مرک/ آلمان
سولفات مس	۱۰۲۷۹۰ / مرک / آلمان
سولفات سدیم	۱۰۶۶۴۹ / مرک/ آلمان
دی اکسید سلنیم	۸۰۰۶۵۳ / مرک / آلمان
تیوسولفات سدیم	۱۰۶۵۱۲ / مرک / آلمان

ماده شیمیایی	کد/کارخانه/کشور سازنده
اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال	۱۰۰۷۱۳ / مرک /آلمان
سود ۰/۱ نرمال	۱۰۶۴۶۲ / مرک / آلمان
N هگزان	۱۰۴۳۹۱/ مرک / آلمان
سود یک مولار	۱۰۶۴۶۲ / مرک / آلمان
اسید کلریدریک ۴ نرمال	۱۱۳۱۳۶ / مرک / آلمان
کلروفرم	۱۰۲۴۳۲/ مرک / آلمان

جدول ۳ - استانداردهای مورد استفاده در این تحقیق

آزمایش	تاریخ انتشار – شماره استاندارد
پروتئین	۹۲۴ – ۱۳۷۲
چربی	۷۴۲ – ۱۳۸۲
رطوبت	۷۴۵ – ۱۳۵۰
خاکستر	۷۴۴ – ۱۳۸۱
پراکسید	۴۹۳ - ۱۳۸۳
pH	۱۳۸۶ – ۱۰۲۸ و ۱۳۷۶- ۴۱۲۴
رنگ سنجی	۲-۶۲۳۶، ۱۳۹۵
ترکیبات ویتامینه	۱۳۳۹۴ – ۱، ۱۳۹۳ ۲- ۱۳۳۹۴، ۱۳۸۹
افزودنی های خوراکی مجاز – رنگ های خوراکی	۷۴۰، ۱۳۹۲

۳-۲- محل اجرای تحقیق

این تحقیق در بخش فرآوری آبزیان انجام شد. نمونه های این پروژه در خط تولید بخش آماده سازی شده و سپس در آزمایشگاه شیمی بخش نمونه ها از حیث وجود فلزات سنگین آنالیز شدند.

۴-۲- روش تحقیق

این تحقیق از نوع تجربی با تکنیک مشاهده انجام شد.

متغیرهای مستقل شامل متدهای حلال آلی و هیدرولیز قلیایی برای استخراج بتا کاروتن هستند. متغیرهای وابسته شامل فاکتورهای شیمیایی تعیین راندمان تولید وزن ماده خشک آزولا در یک کیلوگرم، بررسی کمی و کیفی ماده های رنگی وزن ماده خشک، رنگ سنجی (hunter lap)، تعیین میزان و درصد خلوص ماده رنگی بتا کاروتن، بررسی

ترکیبات بتا کاروتن طبیعی، حلالیت و تعیین مدت زمان ماندگاری بتا کاروتن طبیعی استخراج شده از آزولا فیلیکوئیدس هست. مقیاس سنجش در مورد این فاکتورها از نوع کمی پیوسته است.

برای اجرای این پروژه ۸ تیمار و یک تکرار در نظر گرفته شد. جامعه مورد بررسی شامل آزولا فیلیکوئیدس(*Azolla filiculoides*) نواحی مختلف تالاب انزلی هست. نمونه برداری از آزولا فیلیکوئیدس تالاب انزلی در چهار تیمار و یک تکرار شامل آزولای فصول بهار، تابستان، پائیز و زمستان سال ۱۳۹۴ انجام شد. نمونه های آزولادر فصل بهار(اواخر اردیبهشت)، تابستان (اوایل مرداد ماه)، پائیز (اوایل آذر)و زمستان (اوایل اسفند) با استفاده از تور مخروطی طی مدت زمان ۱۵ دقیقه جمع آوری شدند.

بتا کاروتن از آزولا به دو روش هیدرولیز قلیایی (Hosotani, 2001) و حلال آلی

(Mijeong et al, 2006; Durn et al, 2004) استخراج شد. میزان قسمت های خوراکی جمع آوری (گل بدون ساقه و ریشه) شده از یک کیلوگرم آزولا اندازه گیری گردید. سپس این قسمت های خوراکی با استفاده از حرارت خشک و دمای ۵۰ درجه سلسیوس در آون خشک شده و مقدار آزولای خشک به دست آمده از یک کیلوگرم آزولای تر در وزن خشک نیز محاسبه شد.

۱-۴-۲- تهیه بتا کاروتن از آزولا به روش حلال آلی

برای تهیه بتا کاروتن ابتدا سه کیلوگرم آزولای وحشی از تالاب انزلی برداشت شد. آزولا بعد از برداشت تصادفی از تالاب انزلی با آب شیرین جهت حذف اپی فیت ها، رسوب و مواد آلی شستشو شد. سپس قسمت های خوراکی(گل بدون ساقه و ریشه) آن جمع آوری شده و دوباره با آب شیر کاملا شسته شد. نمونه های تمیز شده در آون ۵۰ درجه سلسیوس تا زمان خشک شدن قرار داده شدند. سپس ۱۰ گرم از پودر خشک شده با ۴۰ میلی لیتراتانل صنعتی ۹۶٪ مخلوط شدند. مخلوط تهیه شده با استفاده از مخلوط کن به مدت ۳ دقیقه هموژنیزه شد. محلول هموژنیزه شده با استفاده از هیتر به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس مخلوط فوق تا دمای اتاق خنک شد. به مخلوط فوق مقدار ۵۰۰ ppm آسکوربات سدیم افزوده شد. طی مدت زمان ۳ ساعت در یک دستگاه سوکسله با حلال (۱۰۰ میلی لیتر پترولیوم اتر یا ۵۰ میلی لیتر N هگزان) بتا کاروتن استخراج شد. لایه ان هگزان جدا شده و لایه آبی با استفاده از ان هگزان یا پترولیوم اتر مجددا عصاره گیری شد. عصاره با سولفات سدیم خشک جهت حذف لایه آبی فیلتر شد. رنگدانه استخراج شده از آزولا در HPLC با شرایط فاز متحرک شامل استونیتریل- متانول- اتیل استات در نسبت های ۸۸:۱۰:۲، نسبت جریان ۱ میلی متر بر دقیقه و طول موج ۲۵۰ نانومتر جداسازی و شناسایی شد. پیگمان با استفاده از فاز جامد روی ستون استیل بی رنگ ODS با سایز ذره ۵ میلی متر، طول ۲۵۰ میلی متر در I.D ۴

میلی متر خالص سازی شد. نمونه شسته شد و حلال جدا شد. بتا کاروتن به دست آمده در شیشه های رنگی و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک سال جهت انجام آزمایشات و بررسی کیفیت نگهداری شد.

جذب محلول استاندارد اندازه گیری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۶ نانومتر خوانده شد. محلول استاندارد کار به سیستم HPLC تزریق شد. شرایط کروماتوگرافی برنامه Perkin Elmer از HPLC شامل LC-1000 pump دارای ستون C18 پلیمریک و به تعیین کننده LC 250 UV/VIS متصل شده بود. شناسایی پیک ها توسط نرم افزار CSW32 برای سیستم HPLC انجام شد (Muller, 1998; Hui et al, 2006).

۲-۴-۲- تهیه بتاکاروتن از آزولا به روش هیدرولیز قلیایی

برای تهیه بتا کاروتن ابتدا سه کیلوگرم آزولای وحشی از تالاب انزلی برداشت شد. از سه کیلوگرم ماده اولیه آزولا مقدار ۱۵۰۰ گرم قسمت خوراکی آزولا شامل گل به دست آمد. سپس گل آزولا با آب شرب شستشو داده شد. نمونه های تمیز شده در آون ۵۰ درجه سلسیوس تا زمان خشک شدن قرار داده شدند. ۵ گرم از پودر خشک شده با ۲۵ میلی لیترمحلول قلیایی سود یک مولار مخلوط شد. مخلوط تهیه شده با استفاده از مخلوط کن به مدت ۳ دقیقه هموژنیزه شد. هموژناسیون با استفاده از هیتر به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس مخلوط فوق تا دمای اتاق خنک شد. به مخلوط فوق مقدار به مقدار ۵۰۰ ppm آسکوربات سدیم افزوده شد. طی مدت زمان ۳ ساعت در یک دستگاه سوکسله با حلال (۱۰۰ میلی لیتر پترولیوم اتر یا ۵۰ میلی لیتر N هگزان) بتا کاروتن استخراج شد. لایه ان هگزان جدا شده و لایه آبی با استفاده از ان هگزان یا پترولیوم اتر مجددا عصاره گیری شد. عصاره با سولفات سدیم خشک جهت حذف لایه آبی فیلتر شد. رنگدانه استخراج شده از آزولا در HPLC با شرایط فاز متحرک شامل استونیتریل- متانول- اتیل استات در نسبت های ۸۸:۱۰:۲، نسبت جریان ۱ میلی متر بر دقیقه و طول موج ۲۵۰ نانومتر جداسازی و شناسایی شد. پیگمان با استفاده از فاز جامد روی ستون استیل بی رنگ ODS با سایز ذره ۵ میلی متر، طول ۲۵۰ میلی متر در I.D ۴ میلی متر خالص سازی شد. نمونه شسته شد و حلال جدا شد. بتا کاروتن به دست آمده در شیشه های رنگی و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک سال جهت انجام آزمایشات و بررسی کیفیت نگهداری شد.

جذب محلول استاندارد اندازه گیری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۶ نانومتر خوانده شد. محلول استاندارد کار به سیستم HPLC تزریق شد. شرایط کروماتوگرافی برنامه Perkin Elmer از HPLC شامل LC-1000 pump دارای ستون C18 پلیمریک و به تعیین کننده LC 250 UV/VIS متصل شده بود. شناسایی پیک ها توسط نرم افزار CSW32 برای سیستم HPLC انجام شد (Muller, 1998; Hui et al, 2006).

۳-۴-۲- روش تهیه محلول استاندارد ۳ میکروگرم/میلی لیتر بتا کاروتن

شش میلی گرم از ماده بتا کاروتن با ۲۰ میلی لیتر تتراهیدروفوران در حمام اولتراسونیک برای حدود ۳۰ ثانیه قرار داده شد. با تتراهیدروفوران به حجم رسانده شد (۶۰ میکروگرم/میلی لیتر). ۵ میلی لیتر از این محلول ذخیره استاندارد به دو تا فلاسک ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد(محلول اندازه گیری استاندارد). در یکی از فلاسک ها توسط سیکلوهگزان به حجم رسانده شد. ۵ میلی لیتر تتراهیدروفوران به فلاسک دیگر افزوده شده و با اتانل به حجم رسانده شد(محلول کار استاندارد) (Muller, 1998; Hui et al, 2006).

۴-۴-۲- انجام آزمایشات برای بتا کاروتن استخراج شده به روش حلال آلی و هیدرولیز قلیایی

برای ارزیابی کیفیت عصاره نهایی درصد خلوص از آزمایشاتHPLC (تزریق ۱ میلی لیتر از مایع فیلتر شده با استفاده از سرنگ میکرولیتری به HPLCReversed phase) (Khalil and Varananis, 1996) یا اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۶۰ نانومتر، رنگ سنجی (میزان ماده رنگی) با استفاده از دستگاه هانتر لب، تعیین ترکیبات ویتامینه به روش اسپکتروفتومتری(1960.AOAC 941.15)، تعیین درصد بتا کاروتن نسبت به وزن خشک آزولا (راندمان تولید در یک کیلوگرم)، حلالیت، بررسی ترکیبات بتا کاروتن طبیعی با روش اسپکتروفتومتری، تعیین مدت زمان ماندگاری بتا کاروتن طبیعی در نقطه صفر و بعد از زمان یک سال(۴ تیمار) و مقایسه زمان نگهداری عصاره به دست آمده با زمان نگهداری نمونه شاهد (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۰، ۱۳۹۲) استفاده شد

برای کالیبره کردن دستگاه از ترانس بتا کاروتن قبل و بعد از اندازه گیری استفاده شد.

آزولای مورد استفاده برای تهیه بتاکاروتن از حیث ارزش غذایی شامل پروتئین به روش ماکروکجلدال(استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۴، ۱۳۷۲)، چربی به روش هیدرولیز اسیدی (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۲، ۱۳۸۲)، رطوبت به روش آون خشک (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۵ ،۱۳۵۰)، خاکستر به روش تعیین گراویمتریک (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴، ۱۳۸۱) و pH به روش الکترومتریک (استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۲۸، ۱۳۸۶و استاندارد ملی ایران شماره ۴۱۲۴، ۱۳۷۶) و پراکسید به روش تیتراسیون یدومتریک (استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳، ۱۳۸۳) مورد ارزیابی قرار گرفت.

در تمام مراحل تهیه نمونه محلول ها از نور خورشید و اشعه UV محافظت شدند.

۵-۲- نمونه شاهد

از رنگ بتا کاروتن سنتتیک استاندارد تهیه شده از شرکت سیگما آلدریچ به عنوان نمونه شاهد استفاده شد.

شکل ۳: نمونه برداری از آزولای تالاب انزلی

شکل ۴: شستشوی آزولا

شکل ۵: آزولای پاک شده

شکل ۶: توزین آزولا

شکل ۷: مرحله خشک کردن آزولا

شکل ۸: آزولای خشک شده

۶-۲- آنالیز آماری

داده های به دست آمده از آزمایشات رنگ سنجی و شیمیایی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سایر تست ها (در صورت نیاز آزمون توکی) جهت مقایسه نمونه های آزمایشی با یکدیگر و نمونه شاهد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳- نتایج

از هر یک کیلوگرم آزولا مقدار ۵۰۰ گرم گل آزولا به دست آمد.

از هر کیلوگرم آزولای تر بعد از خشک شدن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس مقدار ۴۷/۱۳ گرم ماده خشک به دست آمد.

مقدار بتا کاروتن در فصل تابستان در مقایسه با سایر فصول کاهش معنی دار نشان داد (P<۰/۰۵).

مقدار بتا کاروتن در فصل بهار در مقایسه با سایر فصول افزایش معنی دار نشان داد(P<۰/۰۵).

این فاکتور در فصول پائیز و زمستان تفاوت معنی دار نشان نداد(P>۰/۰۵).

مقادیر استخراج بتا کاروتن در روش های حلال های آلی و هیدرولیز قلیایی نیز تفاوت معنی دار مشاهده شد(P<۰/۰۵). در نتایج آزمایشات شامل تعیین درصد خلوص، غلظت، رنگ سنجی، ترکیبات ویتامینه و حلالیت بتا کاروتن در تیمارهای حلال های آلی در مقایسه با هیدرولیز قلیایی کاهش معنی دار مشاده شد(P<۰/۰۵).

طی مدت زمان ماندگاری یک ساله در دمای ۵ درجه سلسیوس این فاکتورها در تیمارهای هیدرولیز قلیایی و حلال آلی تفاوت معنی دار نشان ندادند(P<۰/۰۵).

جدول ۴ : آنالیز آزولا فیلکوئیدس تالاب انزلی قبل از عمل آوری در فصول بهار، تابستان، پائیز و زمستان (وزن خشک)

ویژگی / نمونه	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)	وزن خشک	pH
آزولای فصل بهار	۲۳/۲۸	۱۹/۴۱	۳۲/۳۴	۲۴/۲۶	۸۹/۵۳	۶/۷
آزولای فصل تابستان	۲۳/۴۹	۱۹/۵۲	۳۲/۸۴	۲۴/۸۹	۸۹/۷۳	۶/۸
آزولای فصل پائیز	۲۲/۴۶	۱۸/۵۶	۳۱/۸۴	۲۳/۴۵	۸۸/۵۶	۶/۷
آزولای فصل زمستان	۲۱/۸۹	۱۸/۲۵	۳۱/۹۵	۲۳/۱۶	۸۸/۱۳	۶/۹

جدول ۵: نتایج آنالیز بتا کاروتن استحصال شده با روش های هیدرولیز قلیایی و حلال آلی از آزولای تالاب انزلی در مقایسه با شاهد (زمان صفر)

شاخص	حلالیت در چربی			رنگ سنجی			ترکیبات ویتامینه (IU)			درصد خلوص			بتا کاروتن (mg/kg)		
تیمار نمونه	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد
آزولای فصل بهار	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۳۱	۸۵/۳۹	۹۵/۷۵	۱۲۳۲۴	۱۱۶۹۸	۱۲۳۴۶	۹۸/۹۵	۸۹	۹۹	۱۱۸۵۳	۸۳۴۷	۱۱۸۶۳
آزولای فصل تابستان	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۷۴	۸۶/۳۵	۹۵/۷۵	۱۱۷۵۰	۹۸۳۷	۱۱۸۶۳	۹۸/۹۴	۸۹/۳	۹۹	۹۹۳۵	۶۶۴۸	۱۱۸۶۳
آزولای فصل پائیز	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۶۳	۸۶/۳۵	۹۵/۷۵	۱۱۸۴۹	۱۰۸۹۶	۱۱۸۶۳	۹۸/۳۳	۷۹/۵	۹۹	۱۱۲۵۶	۷۵۴۳	۱۱۸۶۳
آزولای فصل زمستان	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۲۹	۸۶/۳۵	۹۵/۷۵	۱۱۸۵۵	۱۰۸۹۳	۱۱۸۶۳	۹۸/۴۶	۷۹/۷	۹۹	۱۱۲۴۵	۷۵۳۹	۱۱۸۶۳

جدول ۶: نتایج آنالیز بتا کاروتن استحصال شده با روش های هیدرولیز قلیایی و حلال آلی از آزولای تالاب انزلی در مقایسه با شاهد یک سال پس از تولید

شاخص	حلالیت			رنگ سنجی			ترکیبات ویتامینه (IU)			درصد خلوص			بتا کاروتن (mg/kg)		
تیمار نمونه	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد	هیدرولیز قلیایی	حلال آلی	شاهد
آزولای فصل بهار	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۲۸	۸۵/۳۱	۹۵/۷۵	۱۲۳۲۴	۱۱۶۹۸	۱۲۳۴۶	۹۸/۹۵	۸۹	۹۹	۱۱۸۵۳	۸۳۴۷	۱۱۸۶۳
آزولای فصل تابستان	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۶۵	۸۶/۲۲	۹۵/۷۵	۱۱۷۵۰	۹۸۳۷	۱۱۸۶۳	۹۸/۹۴	۸۹/۳	۹۹	۹۹۳۵	۶۶۴۸	۱۱۸۶۳
آزولای فصل پائیز	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۵۹	۸۶/۳۳۳	۹۵/۷۵	۱۱۸۴۹	۱۰۸۹۶	۱۱۸۶۳	۹۸/۳۳	۷۹/۵	۹۹	۱۱۲۵۶	۷۵۴۳	۱۱۸۶۳
آزولای فصل زمستان	محلول	نسبتا محلول	محلول	۹۵/۱۱	۸۶/۲۹	۹۵/۷۵	۱۱۸۵۵	۱۰۸۹۳	۱۱۸۶۳	۹۸/۴۶	۷۹/۷	۹۹	۱۱۲۴۵	۷۵۳۹	۱۱۸۶۳

۴- بحث و نتیجه گیری

بر اساس جداول ۵ و ۶ مقدار بتا کاروتن در فصل تابستان در روش‌های حلال آلی و هیدرولیز قلیایی (۹۹۳۵ و ۶۶۴۸ mg/kg) در مقایسه با سایر فصول کاهش معنی‌دار نشان داد(P<۰/۰۵). مقدار بتا کاروتن در فصل بهار در روش‌های حلال آلی و هیدرولیز قلیایی(۱۱۸۵۳ و ۸۳۴۷ mg/kg) در مقایسه با فصول زمستان (۱۱۲۴۵ و ۷۵۳۹ mg/kg)، تابستان (۶۶۴۸ و ۹۹۳۵ mg/kg) و پائیز(۱۱۲۵۶ و ۷۵۴۳ mg/kg) افزایش معنی دار نشان داد(P<۰/۰۵). مقادیر استخراج بتا کاروتن در فصول بهار، تابستان، پائیز و زمستان در روش حلال آلی در مقایسه با روش هیدرولیز قلیایی تفاوت معنی دار نشان داد(P<۰/۰۵). در نتایج آزمایشات شامل تعیین درصد خلوص، غلظت، رنگ سنجی، ترکیبات ویتامینه و حلالیت بتا کاروتن در تیمارهای حلال آلی در مقایسه با هیدرولیز قلیایی کاهش معنی‌دار مشاهده شد(P<۰/۰۵). طی مدت زمان ماندگاری یک ساله در دمای ۵ درجه سلسیوس این فاکتورها در تیمارهای هیدرولیز قلیایی و حلال آلی در فصول بهار، تابستان، پائیز و زمستان تفاوت معنی دار نشان ندادند(P<۰/۰۵). زارع و کیانی راد در سال ۱۳۸۳ از کپک *Blakeslea trispora* به روش تخمیر مقدار ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر بتا کاروتن استخراج کردند، اما در تحقیق حاضر مقدار در فصول مختلف سال به روش های حلال آلی و هیدرولیز قلیایی مقدار۱۱۲۴۵ - ۶۶۴۸ میلی گرم بر کیلوگرم استخراج شد که در مقایسه با تحقیق زارع و کیانی از حیث مقدار بتاکاروتن استخراج شده ارجحیت دارد. Lejeune و همکاران در سال ۲۰۰۰ مقدار ۶۱۹ – ۲۰۶ میلی گرم/کیلوگرم بتا کاروتن از آزولا استخراج کردند، در تحقیق حاضر مقدار بتا کاروتن بیشتری از آزولا استخراج شد که تحت تاثیر روش خشک کردن برای استخراج بود.

اورگانیسم های فتوسنتز کننده بایستی خودشان را به تغییرات نور در محیط وفق دهند و سیانوباکتری ها که با این گیاهان همزیست هستند استراتژی هایی برای غلبه بر تغییرات نوری دارند. اگرچه این میکروارگانیسم ها به عنوان آفت کش های بیولوژیک، تهویه کنندگان خاک و نیز بهبود کیفیت خاک قابل استفاده هستند اما همچنین از پتانسیل بیوشیمیایی برای تولید ترکیبات باارزش دارویی و مواد غذایی برخوردار می باشند که تاکنون کشف نشده است. تولید و ترکیب سلولی این گیاهان تحت تاثیر عوامل محیطی و غذایی تحت تاثیر قرار می گیرد.

بین این فاکتورهای محیطی دما، pH و نور نقش مهمی را برای تولید و تشکیل پیگمان های فتوسنتز کننده برای متابولیسم اولیه و ثانویه گیاهان بازی می کنند(Chawla, 2002; Cosma, 2008; Lichtenthaler, 1987).

اکثر سیانوباکتریها میکروارگانیسم‌های سازش یافته به سایه هستند. این اورگانیسم ها بالاخص اورگانیسم‌های قرار گرفته درمعرض آب شیرین مکانیسم های مناسبی برای مقابله با اثرات مضر اشعه‌های خورشیدی دارا هستند. سیانوباکتریهای سازش یافته مکانیسم‌هایی برای جذب نور در پاسخ به تغییرات و کیفیت نور، شدت و حصول مواد غذایی دارند. نسبت فیکوبیلین‌ها به یکدیگر یا نسبت فیکوبیلی پروتئین به کلروفیل ۱ در بعضی از گیاهان تحت تاثیر نوری که در معرض آن قرار می گیرند، متغیر هست. در حالی که تحت تاثیر اندازه، ساختمان و تعداد فیکوبیلیزوم ها

در سیانوباکتریها، این اورگانیسم ها به شدت به تغییر شرایط محیطی حساس هستند(Aberouma, 2011; Dentuto et al, 2007).

تجمع کاروتنوئیدهای ثانویه در پاسخ به محدودیت های نوری در گیاهان نشان داده شده است. و ممکن به تغییر پروتئین سلول مرتبط باشد. اگرچه قندها نقش عمده ای در سازگاری گیاه به نور کم بازی می کنند. تولید قند گلوکز در گیاه از طریق چرخه کربس سبب تحریک نولید کلروفیل ۱ و پروتئین ها می شود. بتا کاروتن از ترکیبات موجود در کلروفیل A می باشد (Schieber and Carle, 2005).

قرار گرفتن در معرض نور خورشید منجر به تجمع نسخه هایی از پروتئین های متعلق به خانواده پروتئین های القاء پذیر تحت تاثیر نور بالا در سیانوباکتریها می شود. علاوه بر سیانوباکتریها این پروتئین ها در گیاهان نیز وجود داشته و شامل پروتئین های متصل به کلروفیل a/b۱ گیاهی و پروتئین های اولیه القاء پذیر به نور هستند. با توجه به این که کاروتنوئیدها از ترکیبات وابسته به کلروفیل و این پروتئین ها هستند قرار گرفتن در معرض نور خورشید می تواند ساخته شدن این پروتئین ها و بتاکاروتن را در گیاه تحریک کند. علاوه بر نور خورشید رسیدن نور اولترابنفش به گیاهان به دلیل پارگی لایه ازون نیز سبب تحریک ساخته شدن این پروتئین ها و بتا کاروتن می شود (Agostiano et al, 2003).

مقدار بتا کاروتن در فصل تابستان در مقایسه با سایر فصول نمونه برداری کاهش معنی دار نشان داد($P<۰/۰۵$)که تحت تاثیر ممانعت از سنتز لیکوپن در دمای بالای ۳۰ درجه سلسیوس و نور شدید خورشید می باشد (Prasanna, 1986; Robinson et al, 2004). لیکوپن به عنوان پیش نیاز سنتز بتا کاروتن هست. مقدار بتا کاروتن در فصل بهار در مقایسه با سایر فصول نمونه برداری افزایش داشت و تفاوت معنی دار نشان داد که تحت تاثیر شرایط و دمای مناسب رشد، وجود نور خورشید، مواد غذایی باقی مانده حاصل از تجزیه گیاهان آبزی در فصول پائیز و زمستان سال قبل می باشد. در فصول پائیز و زمستان مقدار بتا کاروتن تفاوت معنی دار نداشت که تحت تاثیر شرایط آب و هوایی و دمای تقریبا یکسان در این فصول می باشد. از طرفی طی این فصول سال دما کاهش داشته (زیر ۳۰ درجه سلسیوس) و برای سنتز لیکوپن مناسب هست (Hacktt et al, 2002). علاوه بر موارد فوق در فصول مختلف سال شرایط رشد متغیر می باشد. این عامل روی مراحل بلوغ برگ گیاه آزولاتاثیر گذار بوده و با توجه به تفاوت مقدار بتا کاروتن در برگ های جوان و بالغ، بتا کاروتن طی فصول مختلف سال تحت تاثیر این فاکتور قرار می گیرد. با افزایش شدت نور پیگمان های غنی از نیتروژن موجود در فیکوبیلین و کلروفیل ۱ سیانوباکتری ها تجزیه شده اما، ترکیبات غیر نیتروژنی شامل کاروتنوئیدها حفظ می شوند. تجزیه شدن این پیگمان ها، آزاد شدن نیتروژن و افزایش نسبت نیتروژن می تواند به عنوان عامل محدود کننده برای تولید بتاکاروتن در فصل تابستان عمل کند (Venugopal et al, 2006; Stahl, 2008).

درصد خلوص و حلالیت در تیمارهای هیدرولیز قلیایی و حلال های آلی تفاوت معنی دار نشان داد(P<۰/۰۵). تیمارهای عمل آوری شده با هیدرولیز قلیایی در مقایسه با تیمار های حلال های آلی از درصد خلوص و حلالیت بالاتری برخوردار هستند که تحت تاثیر حذف لیپیدها و کلروفیل از مایع استخراج قبل از تعیین مقدار بتا کاروتن هست. در حالی که در تیمارهای حلال های آلی این ترکیبات تحت تاثیر کاربرد حلال های مختلف برای استخراج حذف نشده، در مایع استخراج باقی مانده و سبب کاهش خلوص بتا کاروتن استخراج شده می شوند. این ترکیبات قابل حل در آب نبوده و سبب کاهش حلالیت بتا کاروتن در آب می شوند. کلروفیل a دارای ساختار آمفیفیلیک و غیر قابل حل در آب و دارای تمایل برای تشکیل توده می باشد. و به عنوان یکی از کاندیداهای مطلوب برای ایجاد حساسیت به نور مطرح می باشد (Jensen, 1978; Khachik et al,1986).

شدت رنگ در تیمار هیدرولیز قلیایی در مقایسه با تیمار حلال آلی افزایش معنی دار نشان داد که تحت تاثیر غلظت کاروتنوئیدها، حالت فیزیکی و عدم وجود رنگدانه های جانبی مانند کلروفیل به دلیل حذف کلروفیل تحت تاثیر ترکیبات قلیایی استفاده شده است (Kim et al, 1996).

ترکیبات ویتامینه، رنگ سنجی و غلظت بتاکاروتن در تیمار هیدرولیز قلیایی در مقایسه با تیمار حلال آلی افزایش معنی دار نشان داد (P<۰/۰۵). که تحت تاثیر حذف کامل دیواره سلولی و تخریب بافت های گیاهی و آزاد شدن کامل بتاکاروتن از بافت های گیاهی می باشد. آزاد شدن کامل بتاکاروتن از بافت های گیاهی سبب افزایش غلظت بتاکاروتن شده که در نهایت منجر به افزایش درصد رنگ سنجی توسط هانترلپ می شود. با توجه به این که در اثر شکستن بتاکاروتن دو مولکول ویتامین A تولید می شود و ۱۰۰ درصد بتا کاروتن قابلیت تبدیل به ویتامین A را دارد (Bendich and Higdon, 2004; Mercandate and Amaya, 1990)، افزایش مقادیر و غلظت بتاکاروتن در تیمار هیدرولیز قلیایی در مقایسه با تیمار حلال آلی منجر به افزایش ترکیبات ویتامینه در این تیمار شد(AOAC 941.15) .1960.

مقدار بتا کاروتن در تیمارهای حلال های آلی و هیدرولیز قلیایی تفاوت معنی دار نشان داد(P<۰/۰۵) که تحت تاثیر ترکیب قلیایی استفاده شده بود. این ترکیب سبب تخریب ماتریکس بافت های گیاهی، حذف دیواره و غشای سلولی شده و در مقایسه با تیمار حلال آلی مقدار بتاکاروتن بیشتری آزاد می شود(Agte, 2000; Chromatogr, 2003).

تیمار حرارتی استفاده شده برای خشک کردن آزولا چون در دمای ملایم انجام شده سبب کاهش مقدار کاروتنوئیدها نشده اما سبب تخریب آنزیم های ماده غذایی، تسهیل در آزاد شدن و حلالیت کاروتنوئیدها شده و در نهایت منجر به افزایش دسترسی به این ترکیب می شود. هموژناسیون استفاده شده برای استخراج بتاکاروتن نیز سبب افزایش دسترسی به بتا کاروتن می شود(Yamini et al, 2001; Negi and Roy, 2000) . این اعمال استفاده شده برای عمل آوری سبب ناپایداری میکرونوترینت های ماده غذایی نشده و نمی‌توانند در مقدار بتاکاروتن طی مدت زمان ماندگاری در دمای ۵ درجه سلسیوس تغییر ایجاد کنند. علاوه بر این نگهداری در شیشه های تیره رنگ، عدم وجود اکسیژن و استفاده از مواد آنتی اکسیدان برای عمل آوری نیز از عوامل موثر در پایداری بتاکاروتن طی مدت زمان

نگهداری می باشند(Amaya, 2001) . مقدار رطوبت متوسط موجود در پودر آزولا علیرغم این که برای واکنش های غیر آنزیماتیک قهوه ای شدن مناسب بوده می‌تواند سبب حفاظت کاروتنوئیدها از اکسیداسیون لیپیدها شود. در دمای پائین استفاده شده برای خشک کردن مانند ۵۰ درجه سلسیوس اکثر کاروتنوئیدها پایدار بوده و ایزومریزاسیون بتاکاروتن طی پروسه خشک کردن اتفاق نمی‌افتد(Anguelova and Warthesen, 2000; Anjum, 2008; Çinar, 2005) .

مقدار بتا کاروتن در آزولا فیلیکوئیدس در مقایسه با گونه های دیگر آزولای پرورش یافته در سایر نقاط دنیا تفاوت معنی دار نشان داد (P<۰/۰۵)که تحت تاثیر ژنوتایپ، تغییرات آب و هوایی، شرایط رشد و مراحل بلوغ برگ های گیاه آزولا می باشد(Becerra, 1990) .

با توجه به این که برای برداشت آزولا از تالاب انزلی نیاز به تجهیزات خاصی نمی باشد و از حیث زمانی مقدار زیادی از آزولا را در مدت زمان کوتاه می توان برداشت کرد و همچنین برای استخراج بتا کاروتن از آزولای تالاب انزلی نیز نیاز به تجهیزات خاصی نمی باشد، فاقد ارزش اقتصادی بودن ماده اولیه، عدم نیاز به شرایط بخصوصی برای پرورش، دو برابر شدن آزولا طی سه روز، غنی بودن آزولا از بتا کاروتن، استحصال مقدار زیاد بتا کاروتن از مقدار اندک ماده اولیه، هزینه مواد شیمیایی، کارگر، سوخت، تجهیزات آزمایشگاهی مورد نیاز و هزینه وارد کردن بسته های کوچک بتا کاروتن به داخل کشور هزینه تولید بتا کاروتن از حیث اقتصادی در مقایسه با هزینه بتا کاروتن وارداتی شرکت سیگما مقرون به صرفه می باشد.

از مزایای زیست محیطی برداشت آزولای تالاب انزلی برای تهیه بتا کاروتن می توان به رسیدن نور و اکسیژن به لایه های پائینی آب، جلوگیری از ایجاد شرایط بی هوازی و رسوب گذاری در کف تالاب انزلی به دلیل تجزیه قسمت های مختلف این گیاه و بالطبع جلوگیری از افزایش بیش از حد رسوبات در کف تالاب انزلی و در نهایت غیر قابل استفاده شدن این مناطق برای زیست آبزیان و اهداف شیلاتی و بهبود وضعیت بوم سازگاری تالاب قابل ذکر هستند.

همانطور که در جدول شماره ۵ مشاهده شد در نمونه تهیه شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با نمونه سنتتیک ساخت کارخانه سیگما از حیث آزمایشات شیمیایی شامل رنگ سنجی، درصد خلوص، ترکیبات ویتامینه و حلالیت تفاوت معنی دار مشاهده نشد(P<۰/۰۵). در نمونه تهیه شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با نمونه سنتتیک ساخت کارخانه سیگما از حیث آزمایشات شیمیایی شامل رنگ سنجی، درصد خلوص، ترکیبات ویتامینه و حلالیت تفاوت معنی دار مشاهده شد (P>۰/۰۵).

با توجه به وجود تفاوت معنی دار بین مقدار بتا کاروتن استخراج شده به روش های هیدرولیز قلیایی و حلال آلی، و عدم وجود تفاوت معنی دار بین خلوص، حلالیت و آزمایشات شیمایی بتا کاروتن استخراج شده به روش هیدرولیز قلیایی در مقایسه با شاهد، وجو تفاوت معنی دار بین مقدار بتاکاروتن استخراج شده از آزولای تالاب انزلی در فصل بهار در مقایسه با سایر فصول سال و کاهش رشد گیاهان در فصول پائیز و زمستان آزولای فصل بهار تالاب انزلی و روش هیدرولیز قلیایی برای استخراج بتا کاروتن از آزولای تالاب انزلی پیشنهاد می شود.

پیشنهادها

۱ –پیشنهاد می شود شرایط اپتیمایز تولید رنگدانه بتاکاروتن در آزولا مورد بررسی قرار گیرد.

۲ – تاثیر شرایط ماندگاری در دماهای اتاق و پیش سردکن روی پودر آزولا جهت مقایسه مقدار تولید بتا کاروتن و کیفیت آن مورد بررسی قرار گیرد.

۳ - کشت و پرورش آزولا جهت استخراج بتا کاروتن از آزولای پرورشی مورد بررسی قرار گبرد.

۴ –تولید رنگدانه بتا کاروتن از سیانوباکتریهای همزیست آزولا مورد بررسی قرار گیرد

۵ – پیشنهاد می شود سیانوباکتریهای ساپروفیت همزیست با آزولا نیز از حیث مقدار تولید رنگدانه های خوراکی جهت کاهش هزینه تولید مورد بررسی قرار گیرند.

۶ – پیشنهاد می شود سایر رنگدانه های خوراکی موجود در آزولا نیز شناسایی شده و از حیث مقدار تولید مورد ارزیابی قرار گیرند.

۷ – با توجه به تاثیر نور روی آزولا و تغییر رنگ آزولا به قرمز مقدار رنگدانه خوراکی بتا کاروتن در این نوع آزولا نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

۸ – با توجه به تاثیر نور روی رشد گیاهان و تکثیر آزولا در شرایط دمایی مناسب پیشنهاد می شود پرورش آزولا در شرایط گلخانه ای جت ایجاد منبع دائمی برای تهیه آزولا در تمام فصول سال و استخراج بتا کاروتن از آن نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

۹ – با توجه به کاهش دما در سه فصل از سال در مناطق شمالی کشور و تاثیر آن روی رشد گیاهان و بالطبع تولید و استحصال بتا کاروتن پیشنهاد می شود پرورش آزولا در مناطق جنوبی کشور نیز جهت افزایش تولید بتا کاروتن تحقیق شود.

۱۰ – با توجه به تاثیر رنگدانه های آزولا روی پوست میگوی پرورشی و پرورش میگو در مناطق گرم کشور پیشنهاد می شود پرورش آزولا در استخرهای پرورش میگو جهت افزایش تولید آزولا و استحصال بتا کاروتن و همچنین بهبود کیفیت رنگ پوست میگو با استفاده از رنگدانه های طبیعی آزولا به جای کاربرد رنگدانه های سنتتیک در جیره غذایی میگو از حیث بهداشت مواد غذایی تحقیق شود.

۱۱ – برای بررسی تاثیر انجماد روی مقدار بتا کاروتن در آزولا پیشنهاد می شوداستخراج بتاکاروتن از آزولای منجمد نیز جهت مقایسه مقدار و کیفیت آن با آزولای تازه مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

از جناب آقای دکتر پورکاظمی ریاست محترم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، آقای دکتر حسین زاده معاونت محترم تحقیقاتی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، آقای دکتر خانی پور ریاست محترم پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی، آقای دکتر ولی پور معاونت محترم تحقیقاتی پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی، آقای دکتر مرادی رئیس محترم بخش زیست فناوری و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، آقای دکتر صدریان و آقای دکتر حسینی مشاوران محترم پروژه، آقای مهندس زارع رئیس بخش فرآوری آبزیان پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی، اعضای محترم شورای پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و مرکز ملی تحقیقات فرآوری آبزیان جهت تصویب این پروژه، آقای مهندس صفری همکار محترم آزمایشگاه بخش فرآوری جهت همکاری در نمونه برداری از آزولای تالاب انزلی، آقای مهندس فهیم مسئول محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی بخش فرآوری، خانم مهندس رهنما رئیس محترم آزمایشگاه های بخش فرآوری، خانم مهندس خدابنده جهت همکاری در خط تولید بخش فرآوری، خانم مهندس نوغانی مسئول محترم آزمایشگاه شیمی بخش فرآوری جهت همکاری در آزمایشات شیمیایی آزولا، آقای محمدی دوست همکار محترم ترابری، همکاران محترم پروژه و کلیه همکارانی که به نحوی در اجرای این پروژه همکاری داشتند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می نمایم.

منابع

۱ – استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳، ۱۳۸۳. نمونه برداری و روش های آزمون روغن ها و چربی ها. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۲– استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۰، ۱۳۹۲. افزودنی های خوراکی مجاز – رنگ های خوراکی – فهرست و ویژگی های عمومی. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۳ – استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۲، ۱۳۸۲. گوشت و فرآورده های آن – تعیین چربی تام – روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۴– استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴، ۱۳۸۱. گوشت و فرآورده های آن – تعیین مقدار خاکستر کل – روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۵– استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۵، ۱۳۵۰. گوشت و فرآورده های آن – اندازه گیری رطوبت. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۶– استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۴، ۱۳۷۲. اندازه گیری پروتئین تام در گوشت و فرآورده های آن. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۷– استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۲۸، ۱۳۸۶. گوشت و فرآورده های آن – اندازه گیری pH. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۸ – استاندارد ملی ایران شماره ۴۱۲۴، ۱۳۷۶. اندازه گیری pH قسمت اول– ویژگی های مقیاس pH . موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۱–۶۲۶۳، ۱۳۹۵. مایعات شفاف رنگ سنجی به وسیله مقیاس رنگ گاردنر– قسمت ۲ روش اسپکتروفتومتری. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۱– ۱۳۳۹۴، ۱۳۹۳. مواد غذایی –اندازه گیری ویتامینA به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا(HPLC) قسمت ۱– اندازه گیری رتینول تمام ترانس و ۱۳– سیس رتینول –روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۲– ۱۳۳۹۴، ۱۳۸۹. مواد غذایی – اندازه گیری ویتامین A به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا– قسمت ۲– اندازه گیری بتا– کاروتن –روش آزمون چاپ ۱. وسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

۹ – اسفیاء، محمود. ۱۳۷۱. موتاژنز آزولا. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۱۰ – اسفیاء، محمود. ۱۳۷۹. بررسی اکوفیزیولوژیک آزولا در شرایط تالاب انزلی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۱۱ – دانشگاه آمار کل واردات و صادرات به مقصد ج. ا. ایران. ۱۳۹۱. اتاق بازرگانی، صنایع، معادن و کشاورزی.

۱۲– وارسته، ا و رجبی اسلامی، ه . ۱۳۹۱. آنالیز اسدهای چرب و ترکیبات آزولا *FilicoluidesAzolla*و کاربردهای تغذیه ای آن. همتیش ملی پژوهش های آبزیان و اکوسیستم های آبی.

۱۳ – بایگان. ع.، راسخ. ف و راسخی. ن. ۱۳۸۸. فناوری تولید و استخراج کاروتنوئید ازموجودات زنده. همایش ملی یافته های نوین شیمی در صنعت و پزشکی. شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری،

۱۴ – حبیبی، حسین، مهدی محمدیان، و مریم انتشاری، ۱۳۹۰، تولید کاروتنوئیدها (بتا-کاروتن،آستاگزانتین و لوتئین) توسط ریز جلبک(Microalgae)، *بیستمین کنگره ملی علوم وصنایع غذایی*، تهران، دانشگاه صنعتی شریف.

۱۵– خانی پور، الهام.، کرامت، جواد.، حسینی پرور، سید هاشم.، معتمدزادگان، علی.، قربانی حسن سرایی، آزاده.، شیدی یاساقی، سید احمد. ۱۳۸۸. کاربرد کاروتنوئیدهای استخراجی از گوجه فرنگی در مواد غذایی حرارت دیده و سرد و بررسی پایداری آن در طول زمان نگهداری. مجله پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران. ۱۳– ۲۲.

۱۶– رضوی، سید هادی.، رضایی، کرامت اله و مارک، ایوان. ۱۳۸۴. مقایسه روشهای استخراج پیگمان (کاروتنوئید) از مخمر *Sporobolomyces ruberrimus H* ۱۱۰. پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران ۱(۲):۳۳-۴۲.

۹ – زارع، د و کیانی راد، م. ۱۳۸۳. مقایسه تولید بتاکاروتن توسط کپک درفرمانتورهای(*Blakesleatrispora*) پانزده لیتری همزن دار و هفتاد و پنج لیتر یایرلیفت. پژوهش و سازندگی شماره ۶۴. صفحات۲– ۷.

۱۰ – مقدسی. ز، امتیازجو. م، ربانی. م، امتیازجو. م، لبیبی.ف، آذرگشب. ا و مصفا. ن. ۱۳۹۰. مطالعه اثر ضد سرطانی عصاره اتانولی جلبک سبز *Dunaliella salina* جدا شده از دریاچه حوض سلطان بر رده سلولی *Squamous cell carcinoma* درشرایط آزمایشگاهی. فصلنامۀعلمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطرایران جلد۲۷، شماره ۲، صفحۀ ۳۰۶ – ۳۱۵.

۱۱ – مقدسی. ز، امتیازجو. م، ربانی. م، امتیازجو. م، لبیبی. ف، آذرگشب. ا ومصفا. ن. ۱۳۹۰. پتانسیل تولید بتاکاروتن از دونالیلا سالینا دریاچه شاهی تحت استرسهای شوری. شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزاد شهرجلد ۵ شماره ۲. پیاپی ۱۸. صفحات ۹۳ – ۱۰۰.

12 - Aberouma, A. 2011. A Review Article on Edible Pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. World Journal of Dairy and Food Sciences 6 (1): 71-78

13 - Agostiano A, Catucci L , Co sma P, Fini P. 2003. Aggregation processes and photophysical properties of chlorophy l l a in aqueous solutions modulated by the presence of cyclodextrins. Physical Chemistry. 5: 2122–813.
14 - Agte,V. V., Tarwadi, K. V., Mengale, S.and Chiplonkar, S. A. 2000. Potential of traditionally greenleafy vegetables as natural sources for supplementation of eight micronutrients in vegetarian diets. Journal Chromatography. 13: 885-891.
15 - Ahamad, M. N., Saleemullah, M., Shah, H., Iqtidar, U., Khalil, A and Saljoqi, A. U. R. 2007. Determination of beta carotene content in fresh vegetables using high performance liquid chromatography. Sarhad Journal Agricultural. 23(3): 767 – 770.
16 - Alcaíno, A., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., iklitschek, M., Sepúlveda, D., Baeza, M and Cifuentes, V. 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase *(crtR) gene and its* involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces Dendrorhous. BMC Microbiology*. 8 (169): 1 – 13.
17 - Amaya, R. 2001. The effect of processing and storage oncarotenoids content of vegetables. Journal Food Science. 7:2005-5802.
18 - Anguelova, T. and Warthesen, Y. 2000. Degradation of lycopene, α-carotene and β-carotene during lipid peroxidation. Journal of Food Science. 65 (1): 71-75.
19 - Anjum, F., Barkat, A. K., Noreen, N., Tariq, M and Faisal, S. 2008. Effect of Boiling and Storage on Beta-Carotene Content of Different .Vegetables. Pakistan journal life society science. 6(1):63-67
20 - AOAC 941.15.1960, Vitamin A in foods in which carotenes have been added as a source of vitamin A. pectrophotometric meth. AOAC.
21 - Becerra, M., Murgueitio, E., Reyes, G and Preston, T. R. 1990. *Azolla filiculoides* as partial replacement for traditional protein supplements in diets for growing-fattening pigs based on sugar cane juice.Livestock Research for Rural Development. 2 (2):15 -22.
23 - Bendich, A and Higdon, G. S. 2004. Biological actions ofBeta-Carotene. American Journal Nutrition. 32(2): 225-230.
24 - Branen, A. L., Michael Davidson, P., Seppo Salminen and John Thorngate. 2001. Food Additives. Taylor & Francis . 952 P.
25 - Caivano, J. L and Buera, M. D. P. 2012. Color in Food: Technological and Psychophysical Aspects. CRC Press. 478 P.
26 - Chawla, H. S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Plant Biotecnology Publishers. 562 P.
27 –Chromatogr, B. J. 2003. Improved simultaneous determination method of beta-carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver.Analytical Technology Biomedicne Life Scence. 1(1-2):305-13.
28 - Çinar, I. 2005. Carotenoid pigment losses of freeze driedplant samples under different storageconditions. Kahramanmaraş Sütçü İmam Univercity.Deptt. Food Science. and Technology. Kahramanmaraş ,Turk.
29 - Cosma, P., Fini, P., Rochira, S., Catucci, L., Castagnolo, M and Agostiano, A. 2008. Phototoxicit y and cyt otoxicity of chlo rophyl l a/cyc lodextrins complexes on Jurkat cells. Bio electrochemistry . 74(1): 58-64 .
30 - Davies, B. H. 1976.*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (ed.Goodwin, T. W.), Academic Press, London. vol. 2, 2nd edn, pp. 38–165.
31 - Dentuto, P.L., Catucci, L., Cosma, P., Fini, P., Agostiano, A and Hackbarth, S. 2007. Cyclodextrin/chlorophyl l a complexes as supramolecular photosensitizers. Bioelectrochemistry . 70(1):39-43.
32 - Dietz, J. M, Sri Kantha, S., Erdman, J. W. Jr. 1988. Reversed phase HPLC analysis of alpha- and beta-carotene from selected raw and cooked vegetables. Plant Foods for Human Nutrition. 38(4): 333-41.
33 - Durn, J. L., Turnbell, J. D., Robinson, S. A. 2004. Comparison of solvent regimes for the extraction of photosynthetic pigments from leaves of plants. Functional Plant Biology. 31: 195 -202.
34 - Edge, R., McGarvey, D. J and Truscott, T.G. 1997. The carotenoid as antioxidants. A review . Journal of Photochemistry and Photobiolog Biology. 41(3): 189 -200.
35 - Farzianpour, F., Jahead Khaniki, G., Younesian, M., Banaei Ghahferkhi, B., Sadeghi, M and yan Hosseini, SH. 2013. Evaluation oF food color consumptions and determining color type by Thin layer chromatography. American Journal of Applied Sciences. 10 (2): 172-178.
35 - Golkho, Sh and Baratalab, F. 2007. Purification of Astaxanthin from mutant of *Phaffia rhodozma JH - 82* which isolated from forests trees of Iran. Pakistan Journal of Biological Science . 10(5): 802 – 805.

36 - Hackett, M., Lee, J and S. Schwartz, S. 2002. ThermalStability and Isomerization of Lycopene inTomato Oleoresins from Different Varieties. Journal Food Science. 69: 536-541.
37 - Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L and Goycoolea, F.M .2006 .Astaxanthin: a review of its chemistry and applications.Critical Review Food Science Nutrition. 46:*185–196.*
38 - Hopkins, W. G. 2006. Plant Biotechnology. Infobase Publishing. 153 P.
39 - Hosotani, K., Kitagawa, M., Granado, F., Olmedilla, B., Gilmantines, E and Blando, I. 2001. A fast reliable and low cost saponification protocol for analysis of carotenoeids in vegetables. Journal Food Composition and Analytical. 14: 479 – 489.
40 - Hui, B. D., Li, J., Pei, L. P., Zhang, L. X., Zhang, Y and Hu, Y. X. 2006. Separation and Identification of β-Carotene Geometrical Isomers by C30-HPLC-PDA, Food Science (Chin). 27(10): 252–255.
41 - Hutchings, J. B . 2003. Food color and appearance. Gaithersburg, Md. : Aspen Publishers. 610 P.
42 –Jalilevand, F., Rahimi Niaraki, A., Sadeghi Niaraki, A and Haizade Safari, R. 2009. Evaluation of artificial colors in saffron extract Qazvin restaurants in 2008. 11th National Congress of Environmental Health; Tehran, Shahid Bheshti University of Medical Sciences. 2666-73.
43 - Jensen, A. 1978. Chlorophyllus and carotenoeids, pp. 59 -70 in J. A. Hellebust, J. S. Craige(Eds): Physiologicl methods. Physiological and biochemical methods. Cambridge University Press, Cambridge(UK).
44 - Khachik, F., Beecher, G and Whittaker, N. 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. Journal Agricultural Food Chemistry. 34:603–16
45 - Khalil, I.A. and F.R. Varananis. 1996. Carotiniod extraction and analysis by reversed phase HPLCsystem. Sarhad Journal Agricltural. 105(67): 15-21.
46 - Khanafari, A., Saberi, A., Azar, M., Vosooghi, GH., Jamili, SH andabbaghzadeh, B. 2007. Extraction of astaxanthin esters from shrimp waste by hemical and microbial methods. Iranian Journal Environmental Health Science. 4(2):93-98.
47 - Khodaitan, F., Razavi, SH., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, SM. A AND Hejazi, M.
2007. Effect of Culture Conditions on Canthaxanthin Production by *Dietzia atronolimnaea HS-1*. Journal Microbiology Biotechnology. 17(2): 95-201.
48 - Khosravi Mashizi, R., Yonesian, M., Omidvar Borna, M and Galavi, E . 2012. Evaluation of Knowledge and Attitude of Confectionery Workers towards Usage of Artificial Food Dyes in Bardsir. Journal of Health and Hygiene. 3(2):32-41.
49 - Kim, S. W., Seo, W. T. & Park, Y. H. 1996 .Increased β-carotenesynthesis in Blakeslea trispora under strong alkaline culturecondition. Biotechnology Letters. 18: 1287-1290
50 - Kim, S. W., Seo, W. T. & Park, Y. H. 1997 Enhancedproduction of Beta-carotene from Blakeslea trisporawith span 20 . Biotechnology Letters. 19: 561-562.
51 - Lejeune, A., Peng, J., Boulenge, E. Le., Larondelle, Y and Hove, C. V. 2000. Carotene content of Azolla and its variations during drying and storage treatments. Animal feed science and technology. 84: 293 – 301.
52 - Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* (eds Packer, L. and Douce, R.), Academic Press. 148: 350–382.
53 - MacDougall, D. B. 2002. Colour in Food: Improving Quality. Woodhead Publishing. 378P.
54 - Mercandate, A and R. Amaya, R. 1990. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. Journal Food Science. 25: 213-219.
55 - Mijeong, L. J; Zahn, M; Trinh, T; Jia, Qi; Wenwen, Ma. 2006. Headspace Gas Chromatography–Flame Ionization Detector Method for Organic Solvent.Journal of
AOAC International. 89 (6): 1475 – 1482.
56 - Mostafa, E. M and Ibrahim, M. M. 2012. HPLC analysis of non – enzymatic antioxidants in Azolla caroliniana (pteridopsida) subjected to UV-B. Biology Science. 3(1):19-30.
57 - Muller, H. 1998. The determination of the beta-carotenecontent in selected vegetables and fruits by HPLC and photodiode array detection. Journal Food Nutriton. 2: 88-94.
58 - Negi, P and Roy, S. 2000. Effect of drying condition onquality of green leaves during long term storage . Food Research International Journal. 34: 283-287.
59 - Prasanna, R., Pabby, A., Singh, P. K. 2004. Effect of glucose and light/dark environment on pigmentation profiles in Calothrix elenkeni. Folia Microbiologica. 49: 26 -30.

60 - Qiu, D., Chen, Z. R.., Li, H. R. 2008. Qualitative Analysis of β-Carotene Isomers. Food Science (Chin.). 29(4): 50-53.
61 - Robinson, C. H., Marlilyn, R. L and Wanda, L. C and Garwick, A. E. 1986. Analyzed summer vegetables fortheir micronutrient content. Journal Nutrition. 45(8): 497-502.
62 - Rymbai, H., Sharma, R. R and Srivastav, M. 2011. Biocolorants and its implications in Health and Food Industry - A Review. International Journal of Pharmaceutical Technology Research. 3(4): 2228 – 2244.
63 - Schieber, A. and Carle, R.. 2005. Occurrence of carotenoid cis-isomers in food: Technological , analytical, and nutritional implications. Trendsin Food Science and Technology. 16: 416–422.
64 - Silverman, H. M., Romano, J and Elmer, G. 1999. The Vitamin Book. Bantam. 512 P.
65 - Smith, J and Hong Shung, L. 2001.Food Additives. Wiley-Blackwell. Pp: 328 – 396.
66 - Stahl,U., Donalies, U. E. Band Nevoigt, E. 2008. Food Biotechnology. Springer. Pp: 316 -365.
67 - Tsukida, K., Saiki, K., Takii, T., Koyama, Y. 1982. Separation and Determination of Cis-Trans Carotenes by High Performance Liquid Chromatography. Journal Chromatography. 245: 356-364.
68 - Venugopal, V., Prasanna, P., Sood, A., Jaiswal, P and Kaushik. 2006 . Stimulation of pigment accumulation in Anabaena azollae strains: effect of light intensity and sugars. Folia Microbiologica. 51(1). 50 – 56.
69 - Winter, R. A 2009. Consumer's Dictionary of Food Additives. Crown Publishing Group. Pp: 413 – 465.
70 - Yamini, C., N. Ranjana, Y. Chaturvedi and R. Nagar . 2001. Levels of beta-carotene and effects ofprocessing on selected fruits and vegetables of the arid zone of Indian Journal Food Science. 56 : 27-132.

Abstract:

The present project was aimed at determining the content, quality, and purity of β-carotene extracted from *Azolla filiculoides* in the Anzali Wetland, comparing it with synthetic β-carotene, and measuring its economic value. One treatment had β-carotene derived from *Azolla filiculoides* in the Anzali Wetland through the alkaline hydrolysis method in the summer of 2014. Treatments were kept at 4 °C for one year. Synthetic β-carotene was used as the control. The quality of the treatments was assessed by applying some chemical tests, including the measurement of the content and quality of β-carotene, colorimetry using the Hunter-LAB method, determination of the purity and vitamin A employing high-performance liquid chromatography (HPLC), estimation of the dwell-time duration at 5°C, and measurement of the solubility of β-carotene in water. Beta carotene of Azolla in the spring extracted to alkaline hydrolysis was11853 mg/kg, in summer was 9935mg/kg, in autumn was 11256 mg/kg and in winter was 11245 mg /kg. Beta carotene of Azolla in the spring extracted to organic solvent was 8347 mg/kg, in summer was 6648 mg/kg, in autumn was 7543 mg/kg and in winter was 7539 mg/kg. The amount of beta-carotene is extracted using organic solvents and alkaline hydrolysis in the summer compared to other seasons showed a significant reduction ($P<0.05$). The amount of beta-carotene in the spring were significantly increased compared to the other seasons ($P<0.05$). This factor (organic solvent and alkaline hydrolysis) in autumn and winter showed no significant difference ($P>0.05$). The extracted amounts of beta-carotene in organic solvents compared to alkaline hydrolysis method in seasons spring, summer, autumn and winter was difference significant ($P<0.05$). The results of tests included determining the purity, concentration, colorimetry, compounds soluble vitamins and beta-carotene in organic solvents compared to alkaline hydrolysis significant reduction ($P<0.05$). During the shelf life of one year at 5°C, these factors had no significant difference between treatments alkaline hydrolysis and organic solvents ($P>0.05$).

According to the harvesting Azolla of wetland is not requires special equipment and in terms of time a lot of Azolla can be harvested in a short time and also for the extraction of beta-carotene from Azolla Anzali Lagoon is not requires special equipment, too, have no economic value of raw material, does not require special conditions for growing, doubling in three days, Azolla is rich in beta-carotene, beta-carotene extraction of large quantities of small amounts of starting material, the cost of chemical materials, labor, fuel, Laboratory equipment required and the cost of importing small packages beta-carotene, beta-carotene into the country in terms of economic cost compared to the cost of imported Sigma beta carotene is economical.

As shown in Table 5 in the samples prepared by alkaline hydrolysis in comparison with synthetic chemical manufactured by Sigma in terms of colorimetric tests, purity, composition and solubility of vitamins significant difference was not observed ($P>0.05$). But, in samples prepared by organic solvents in comparison with synthetic chemical manufactured by Sigma in terms of colorimetric tests, purity, composition and solubility of vitamins significant difference was observed ($P<0.05$). According to significant differences between the amount of beta-carotene extracted from Azoula wetland compared to other seasons in spring and autumn and winter plant growth in spring Azoula alkaline hydrolysis method for the extraction of beta-carotene wetland and wetland Azolla is recommended.

keywords: Wild Azoula (*Azola filiculodes*), natural pigment, purity of beta-carotene, colorimetric, HPLC, additives

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute –Inland Waters Aquaculture Research Center

---

Project Title: Development of technology to extract beta-carotene natural colors from Azolla *(Azolla filiculoides*)
Approved Number: 2 – 12 – 12 – 93119
Author: Mina Seifzadeh
Project Researcher: Mina Seifzadeh
Collaborator(s)*:* Moradi, Y., Khanipour, A.S., Daghigh Rohi, J., Zareh Gashti, Gh., Rahnama, M., Khodabandeh, F., Rafiepour, F., Zarei, M., Mohammadi, A., Sadrian, M.
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution: Guilan province
Date of Beginning : 2014
Period of execution : 2 Years
Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Inland Waters Aquaculture Research Center

Project Title:

Development of technology to extract beta-carotene natural colors from Azolla *(Azolla filiculoides*)

Project Researcher:

Mina Seifzadeh

Register NO.
51735