Iranian Journal of Biological Sciences.2022; 17(3):19-27

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Effect of storage temperature and extraction methods in chlorophyll content in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Maryam Khoshsokhan-mozarffar [1,*]

1. Assistant Professor, Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

place of research: Qom Branch, Islamic Azad University

Article Info

Article History:
Recived 01.13.2023
Revised 01.26.2023
Accept 02.13..2023
Online 02.13..2023

KeyWords:
acetone
dimethyl sulfoxide
dimethylformamide
natural dye
chlorophyll

***Corresponding author:**
E-mail address

m.khoshm@gmail.com

Abstract

Introduction: Since the synthesis of some chemical compounds is difficult and expensive, it is necessary to find ways to increase their production in plants. One of these materials is color compounds. Chlorophyll, as a natural pigment, plays an important role in the green appearance of plants. This color is used in food, cosmetics, etc industries.
Aim: The purpose of this project is investigation of different methods of chlorophyll extraction for more chlorophyll content in alfalfa plants.
Materials and methods: To carry out this project, alfalfa cultivated and then the aerial part was harvested for biochemical analysis and kept at different temperatures (-20 and 4). chlorophyll was extracted using acetone and ethanol solvents by grinding method and methanol, DMSO and DMF solvents by soaking method and then its amount was measured by spectrophotometer at the respective wavelengths.
Results: Based on the obtained results, it can be said that acetone solvent with high ability and producing more extractable chlorophyll concentration than other solvents was chosen as the appropriate solvent. Also, samples kept at minus 20 temperature showed more chlorophyll due to less possibility of destruction.
Conclusion: maintaining of the aerial part of the plant at -20 keeps more chlorophyll than at 4°C and extracting chlorophyll by grinding in acetone has a better performance compared to other solvents.

Cite this article:Khoshsokhan-mozarffar M., Effect of storage temperature and extraction methods in chlorophyll content in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(3): 19-27

10.30495/zisti.2023.1977601.1151 DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.3.2.6
Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

تاثیر دمای نگهداری و روش استخراج در میزان کلروفیل درگیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

مریم خوش سخن مظفر [۱،*]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران

محل انجام تحقیق : واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۱/۱۰/۲۳
بازنگری ۱۴۰۱/۱۱/۰۷
پذیرش ۱۴۰۱/۱۱/ ۲۴
نمایه ۱۴۰۱/۱۱/۲۴

کلمات کلیدی
استون
دی متیل سولفوکسید
دی متیل فرمامید
رنگ طبیعی
کلروفیل

* نویسنده مسؤل

m.khoshm@gmail.com

چکیده

مقدمه: از آنجا که سنتز برخي ترکیبات شیمیایي سخت و هزینه‌بر است، یافتن راه‌هایي براي تقویت تولید آنها در گیاهان ضرورت دارد. یکي از این مواد، ترکیبات رنگي مي‌باشد. کلروفیل به عنوان یک رنگدانه طبیعي، نقش مهمي در ظاهر رنگ سبز گیاهان ایفا مي-کند. این رنگ در صنایع غذایي، آرایشي و غیره استفاده مي‌شود.

هدف: تاثیر نحوه نگهداری و روش استخراج در میزان کلروفیل در گیاه یونجه

مواد و روش ها: پس ازکشت بذرهای گیاه یونجه، بخش هوایي گیاه جهت آنالیزهاي بیوشیمیایي برداشت گردید و در دماهای مختلف (دمای ٤ و۲۰-) نگهداری شد. سپس کلروفیل با استفاده از حلال‌های استون و اتانول به روش سائیدن و حلال‌های متانول، DMSO و DMF به روش خیساندن استخراج و سپس میزان آن با اسپکتروفتومتر در طول موج هاي مربوطه اندازه گیري شد.

نتایج: بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان گفت حلال استون با توانایی بالا و تولید مقدار غلظت کلروفیل استخراجی بیشتر نسبت به دیگر حلال‌ها، به عنوان حلال مناسب انتخاب شد. همچنین نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۰-، به دلیل احتمال تخریب کمتر، میزان کلروفیل بیشتری نشان دادند.

نتیجه گیری: نگهداری اندام هوایی گیاه در۲۰- میزان کلروفیل بیشتری را نسبت به ٤ درجه سانتیگراد حفظ می‌کند و استخراج کلروفیل به-روش ساییدن در استون در مقایسه با حلال‌های دیگر دارای عملکرد بهتری دارد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : خوش سخن مظفر م.، تاثیر دمای نگهداری و روش استخراج در میزان کلروفیل درگیاه یونجه (*Medicago sativa* L.). مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱ ؛ ۱۷(۳):۱۹-۲۷

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.3.2.6
doi 10.30495/zisti.2023.1977601.1151

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-۴۲۲۶ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-۴۵۹X **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

کلروفیل، رنگ حاصل از استخراج به وسیله حلال از برخي گیاهان سبز مانند یونجه، گزنه، اسفناج و غیره مي‌باشد (۱و۲). کلروفیل در لاملای کلروپلاست (۳ و ٤) توسط پروتئین‌هایی محافظت شده که مجموعه ای از کلروفیل-پروتئین تشکیل می‌شود (۷-۵)، این مجموعه توسط دولایه پروتئین-لیپیدی احاطه شده است و در نتیجه کلروفیل را در آن پایدار می‌کند (۸). در گیاهان عالی، کلروفیل معمولاً ۰/٦ تا ۱/۲٪ وزن برگ را بر اساس ماده خشک تشکیل می‌دهد (۹). تفاوت محتوای کلروفیل در برگ سبز تحت تأثیر محل رشد، سن برگ در یک درخت و موقعیت برگ است (۱۲-۱۰). کلروفیل به خاطر دو خاصیت اصلي خود، هم به عنوان يك ماده رنگي و هم ماده‌اي بوگير در صنعت كاربرد زيادي دارد. به‌طوری‌که جهت رنگ کردن فرآورده‌هاي لبني، روغن‌هاي خوراكي، كيك، نوشيدني‌ها، آب ميوه، ژله‌ها، پاستا، فرمولاسيون غذاي كودك، آدامس، شكر و محصولات قنادي و همچنين در حفظ رنگ سبزي‌هاي منجمد و يا كنسرو شده كاربرد دارد (۱۳ و ۱٤). تکنیک استخراج کلروفیل به دلیل کاربردهای فراوان، توجه ویژه ای را به خود جلب می‌کند. استخراج با حلال آلی روش سنتی مورد استفاده است (۱۵ و ۱٦). کلروفیل دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است که از بیماری‌های مزمن مانند سرطان جلوگیری می کند (۱۹-۱۷). یونجه با نام علمي *Medicago spp.* و نام انگليسي Alfalfa به تيره بقولات (Papilionaceae) تعلق دارد. این خانواده، از بزرگترین خانواده گیاهان گلدار است كه داراي بيش از ٤۵۰جنس و ۱۲۰۰۰گونه گياهي مي‌باشد و گزارش شده‌است یکی از گیاهان با بیشترین میزان کلروفیل است. استفاده هدفمند از آنزیم‌ها می تواند اثر حلال را افزایش دهد و یا مقدار حلال مورد نیاز برای استخراج را کاهش دهد یا بازده ترکیبات قابل استخراج را افزایش دهد (۲۰). آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی نظیر پکتینازها، سلولازها و همی سلولازها به طور موفقیت‌آمیزی برای افزایش آزادسازی اجزای مختلفی از جمله آنتوسیانین، لیکوپن، ب-کاروتن، کاروتنوئیدها و کلروفیل از بافت های گیاهی استفاده شده‌اند (۲۵-۲۱). استون یک حلال آلی است که قادر به شکستن ناخالصی-های محلول در برگ گیاهان می‌شود. کلروفیل بیشترین، ساده ترین و سریعترین انحلال را در این حلال دارد. برای اندازه گیری و استخراج کلروفیل از بافت گیاهی از استون ۸۰٪ استفاده می‌شود. طبق تحقیقات پیشین، روش آرنون که از حلال استون استفاده کرده است، بهترین حلال جهت استخراج کلروفیل با بهینه استخراج، استون می‌باشد. بعد از آن حلال قطبی اتانول جهت استخراج بهینه کلروفیل مناسب می‌باشد. روش‌های مختلف کروماتوگرافی، از جمله کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع با فشار بالا، و اسپکتروفتومتری جهت تعیین مقدار کلروفیل استخراج شده استفاده شده است (۲٦). استفاده از اسپکتروفتومتری مرئی با طول موج مناسب به عنوان روشی دقیق، مطمئن و کارامد جهت استخراج رنگدانه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی می‌باشد که در پروژه-های تحقیقاتی مورد استفاده می‌باشد. در مطالعه‌ای که در رابطه اثر حلال‌ها در استخراج کلروفیل، بدون سایش صورت گرفت، مشخص گردید که حلال استون پس از حلال پترولیوم اتر و DMSO، کارایی بیشتری در فرایند استخراج رنگدانه از سلول داشته است (۲۷)، همچنین گزارش شد میزان کلروفیلa استخراج شده در روش خیساندن از بافت برگ با DMSO در دمای بین ۲۵ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد به طور کلی مشابه به روش استون بود. محققان طی استخراج کلروفیل a از دو گونه مخمر مشاهده کردند که میزان کلروفیل a استخراجی با افزایش مدت زمان نگهداری نمونه در DMSO سبب افزایش شفافیت کلروفیل a استخراجی شد (۲۸). آنها همچنین در گزارش خود بیان کردند DMSO نسبت به DMF کم خطرتر می باشد. همچنین روش‌های مختلف استخراج کلروفیل از جلبک مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های جلبکی فریز شدند و سپس با حلال‌های مختلف کلروفیل استخراج شد. مشخص شد از بین حلال‌ها دی متیل فرمامید (DMF) بهترین حلال است. جهت بازدهی بیشتر کلروفیل این استخراج طی سه مرحله در طی ۲٤ ساعت انجام گرفت. همچنین نشان داده شد ساییدن مکانیکی حدود ۲۰ درصد استخراج کلروفیل را بهبود می‌بخشد (۲۹). در تحقیقی دیگر نیز فرایند استخراج کلروفیل و کاروتنوئیدها از میکروجلبک‌ها با استفاده از حلال‌های متانول و دی متیل سولفوکساید (DMSO) مورد آزمایش قرار دادند. بهترین نتیجه استفاده از حلال متانول

تحت امـــواج فراصوت بـــود (۳۰). روش خیســـاندن DMSO در ابتدا در ســـال ۱۹۷۸ معرفی گردید و نشـــان داده شـــد که انکوبه کـــردن برگ گیـــاه در ٦٥ درجه ســـانتیگراد بدون عمل ســـائیدن به اندازه اســـتخراج مکانیکـــی کلروفیل با اســـتون کارآمد اســـت (۳۱). در روشـــهایی دیگر نیـــز از کروماتوگرافی لایـــه نازک (TLC) جهت بهینه ســـازی جداســـازی کلروفیل ها استفاده شـــده است (۳۲).

هدف از این تحقیـــق، تاثیر روش نگهداری پس از برداشـــت و همچنین بررســـی روش‌هاي مختلف اســـتخراج کلروفیل جهت بازدهی بیشـــتر، در گیاه یونجه می‌باشـــد.

مواد و روش ها:

گیاه یونجه و کشت دانه

ابتـــدا بذرهاي گیـــاه یونجه همـــداني از شرکت پـــاکان بذر اصفهان تهیه شـــد. در تاریخ ۱٤۰۰/٤/٦ در زمیني به وســـعت ۱۰۰مترمربع کشـــت گردید. پـــس از ۵۰ روز رشـــد و قبل از گلدهـــی، بخش هوایـــي گیاهان برداشـــت گردید. بخشـــی در دمای ٤ درجه ســـانتیگراد و بخشـــی دیگـــر در ۲۰- درجه ســـانتیگراد نگهداری شـــدند تا آزمایشـــات لازم صورت گیرد.

آزمایش‌های شیمیایی

در ایـــن آزمایش‌ها روش‌های مختلف ســـاییدن و خیســـاندن بافـــت انـــدام هوایی گیـــاه یونجـــه، نگهداری شـــده در ٤ درجه و ۲۰- درجه ســـانتیگراد انجام گرفته و مورد مقایســـه قـــرار گرفـــت. به طـــوری کـــه طبق جـــدول شـــماره ۱ بر روی نمونه‌هـــای نگهداری شـــده در ٤ درجه ســـانتیگراد، در روش ســـاییدن از حلال‌های اســـتون ۸۰ درصـــد و ۱۰۰ درصد و اتانـــول ۹۰ درصد اســـتفاده شـــد و در روش خیســـاندن از متانـــول ۱۰۰ درصـــد، DMSO و DMF. و بر روی نمونه های نگهداری شـــده در ۲۰- درجه نیز از حلال اســـتون ۸۰ درصد با روش ســـاییدن و حلال متانول در روش خیســـاندن استفاده شد .

استخراج به روش ساییدن با حلال استون و اتانول

۰/۵ گرم انـــدام هوایی گیاه یونجه (در ســـه تکرار)، با۱۰ ســـی ســـی حلال در هاون ســـائیده شـــد تـــا یکنواخت گردد. سپس

مخلـــوط حاصل با دور ۲۵۰۰و زمان ۱۰دقیقه ســـانتریفیوژ گردیـــد. محلـــول رویي با حلال به حجم ۱۰ ســـی ســـی رســـانده شـــد و جذب در طول موجهـــای مربوطه قرائت گردید. ســـپس میزان کلروفیـــل a وb و کاروتنوئید کل طبق فرمول محاســـبه گردید (۳۳).

فرمولهـــای محاســـبه غلظـــت رنگیزه‌هـــا با اســـتون ۱۰۰ د ر صد

Ca (µg/ml) = 11.24 A661.6 - 2.04 A664.8

Cb (µg/ml) = 20.13 A644.8 – 4.19 A661.6

C(X+C) (µg/ml) = (1000 A470 -1.90 ca -63.14 cb)/214

فرمولهای محاسبه غلظت رنگیزه‌ها با استون ۸۰ درصد

Ca (µg/ml) = 12.25 A663.2 - 2.04 A646.8

Cb (µg/ml) = 21.50 A646.8 – 4.19 A663.2

C(X+C) (µg/ml) = (1000 A470 -1.82 ca -85.02 cb)/198

فرمولهای محاسبه غلظت رنگیزه‌ها با اتانول ۹۰ درصد

Ca (µg/ml) = 13.36 A664.1 – 5.19 A648.6

Cb (µg/ml) = 27.43 A648.6– 4.19 A664.1

C(X+C) (µg/ml) = (1000 A470 -2.13 ca -97.64 cb)/209

اســـتخراج بـــه روش خیســـاندن با متانـــول خالص و DMF

میزان ۰/۱ گـــرم از نمونه‌های نگهداری شـــده در دمای ٤ درجه ســـانتیگراد در ۵ ســـی ســـی حلال خیســـانده شـــد و به مدت ۳ دقیقه ســـونیکیت گردید. ســـپس به مدت ۲٤ ســـاعت دریخچال (دمای ٤ درجه سانتیگراد) نگهـــداری شـــد و در نهایت بـــا دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه ســـانتریفیوژ شـــده و صاف گردید. میزان جذب محلـــول در طـــول موجهـــای مربوطه قرائـــت گردید. افـــزودن حلال و مراحل انجام شـــده، روی نمونه گیاهی باقیمانده ســـه بار تکرار شـــد تا جایی کـــه کاملا برگ بیرنگ شـــد. میزان کلروفیل‌هـــا و کاروتنوئید کل طبق فرمول محاســـبه گردید (۳۲).

فرمولهای محاسبه غلظت رنگیزه‌ها با اتانول ۹۰ درصد

Ca (µg/ml) = 16.72 A665.2 – 9.16 A652.4

Cb (µg/ml) = 34.09 A652.4– 15.28 A665.2

C(X+C) (µg/ml) = (1000 A470 -1.63 ca -104.96 cb)/221

فرمولهای محاسبه غلظت رنگیزه‌ها با DMF (۳۰)

Ca (µg/ml) = 16.72 A665.2 – 9.16 A652.4

Cb (µg/ml) = 34.09 A652.4– 15.28 A665.2

استخراج به روش خیساندن باDMSO

۰/۱ گرم از نمونه های نگهداری شده در ۴ درجه، در محلول DMSO خیسانده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴و ۴۸ ساعت قرار گرفت. پس از زمان طی شده محلول ها در دمای اتاق سرد شده و سپس با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و صاف گردیدند. میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موجهای مطابق فرمولهای زیر خوانده و میزان رنگیزه‌ها محاسبه شد (۳۴).

Total Chlorophyll: 20.2(A645) + 8.02(A663)

Chlorophyll a: 12.7(A663) – 2.69(A645)

Chlorophyll b: 22.9(A645) – 4.68(A663)

آنالیز آماری

کلیه آنالیزها با سه تکرار مستقل انجام گرفت و سپس نتایج به دست آمده از گروه‌ها به کمک نرم‌افزار spss و انجام تست Tukeyمورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از نرم‌افزار Excel داده‌ها تحلیل و نمودارهای مربوطه رسم شد. همچنین میزان معنی‌دار بودن یا نبودن آن‌ها در سطح $p\leq0.05$ بررسی شد.

مواد و روش ها:

نتایج میزان کلروفیل با روش ساییدن در دمای ٤ درجه سانتیگراد

نتایج مقایسه میانگین در استخراج به روش سائیدن در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتیگراد نشان داد بیشترین مقدار کلروفیل b وa در بین ۳ روش استخراج با (استون خالص، استون ۸۰ درصد و اتانول ۹۰ درصد)، در استخراج با استون خالص بدست آمد و بین دو روش دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

نتایج میزان کلروفیل به روش خیساندن در دمای ٤ درجه سانتیگراد

براساس نتایج بدست آمده، استخراج با DMSO بعد از ٤٨ ساعت بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کارتنوئید) را در گیاه یونجه حاصل داشت. نتایج نشان داد در روش استخراج با DMSO خیساندن به مدت ٢٤ ساعت با ٤٨ ساعت تفاوت معنی داری در میزان کلروفیل a و کارتنوئید نشان نداد و بالعکس سبب کاهش قابل توجه در میزان کلروفیلb شد (جدول ۱).

نتایج سنجش کلروفیل نمونه های در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد

مقایسه میزان کلروفیلa و b دو روش ساییدن و خیساندن در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نشان داد در روش ساییدن در مقایسه با خیساندن میزان کلروفیل بیشتری استخراج می‌گردد (جدول ۱).

مقایسه میزان کلروفیل a و b در نمونه های نگهداری شده در دمای ٤ درجه با نمونه‌های نگهداری شده در ۲۰- درجه

مقایسه میزان کلروفیل a و b نمونه‌های نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با نمونه‌های نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی گراد و استخراج شده در استون ۸۰٪ به روش ساییدن و همچنین در روش خیساندن با متانول نشان داد، محتوای کلروفیل a نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۰- بیشتر از ٤ درجه است (جدول ۱).

جدول ۱: متغیرهای استفاده شده جهت نگهداری گیاه بعد از برداشت، روش استخراج و حلال¬های مورد استفاده و نتایج حاصل از استخراج

C(x+c) µg/ml	Chlb µg/ml	Cha µg/ml	solvent	Extraction method	Storage temperature
0.2±0.002	1.9±0.01	2.58±0.6	Acetone 80%	Mechanical devices/ grinding	4°C
0.54±0.007	4.05±1.2	4.1±1.1	Acetone 100%		
0.16±0.007	1.6±0.8	1.9±0.3	Ethanol 90%		
0.16±0.009	0.63±0.07	1.18±0.06	Methanol 100%	Immersion	
0.4±0.0002	0.7±0.001	1.71±0.019	24 hours DMSO		
0.48±0.003	0.56±0.0025	2.15±0.1	48 hours		
0.11±0.002	0.53±0.001	1.25±0.1	DMF		
0.4±0.007	2.85±0.2	4.6±0.8	Acetone 80%	Mechanical devices/ grinding	-20°C
0.1±0.008	1.3±0.07	1.7±0.05	Methanol 100%	Immersion	

بحث:

محتوای کلروفیل از معیارهای مشخصی است که به عنوان شاخص فعالیت فتوسنتزی در کشاورزی محسوب می‌شود.. یکی از مشکلاتی که امروزه در ارتباط با تولید کلروفیل و کارتنوئیدها وجود دارد جداسازی رنگدانه تولیدی است. روش‌های متعددی از جمله روش‌های فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی برای استخراج رنگدانه از سلول وجود دارد (۳۵).

هدف از این مطالعه، مقایسه استخراج کلروفیل جهت دستیابی به بهترین بازدهی، بهینه سازی تولید کلروفیل، می‌باشد. در این پژوهش از حلال‌های (استون خالص و ۸۰ درصد، اتانول ۹۰ درصد، متانول،DMSO،DMF) و روش مکانیکی سائیدن و خیساندن در دو دمای ٤ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای گیاه یونجه استفاده شد.

نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که استخراج با استون به روش ساییدن موجب افزایش قابل توجهی در بازده کلروفیل می‌شود. چیستی و همکاران، روش‌های مختلف تخریب سلولی را بررسی کرده‌اند (۳٦). برای تخریب سلول در مقیاس بزرگ، روش‌های مکانیکی تخریب سلول متداول‌تر هستند. شواهد کافی نشان می‌دهد که تخریب سلول به روش‌های مکانیکی به آنزیم‌های داخل سلولی پروتئین‌ها آسیب نمی‌رسانند (۳۷).

در این تحقیق روش استخراج کلروفیل a ، b و کارتنوئیدها با حلال‌های استون در دو غلظت ۱۰۰ و ۸۰ درصد و اتانول ۹۰ درصد در روش سائیدن و همچنین با حلال‌های متانول، DMF و DMSO در روش خیساندن سنجش

گردید و با توجه به نتایج بدست آمده، در بین ۳ حلال استفاده شده در روش سائیدن (استون خالص، استون ۸۰ درصد و اتانول ۹۰ درصد)، بیشترین مقدار کلروفیل a و b در استخراج با استون خالص بدست آمد. بین دو روش دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. رنگدانه‌های کارتنوئیدی به صورت محلول در چربی هستند. انتخاب حلال مهم‌ترین عامل برای استخراج کارآمد کارتنوئیدها است و عمدتاً به ترکیبات کارتنوئیدی بستگی دارد. در این پژوهش از میان چهار حلال (استون ، اتانول ۹۰ درصد، متانول، DMSO) که حلال‌های ایمن و تائید شده در سازمان غذا و دارو FAD است، جهت انتخاب حلال مناسب برای سیستم‌های سایشی، خیساندن و اختلاط با دماهای ٤ و ۲۰- استفاده شد. مطابق نتایج بدست آمده، حلال استون با توانایی بالا و تولید مقدار غلظت کارتنوئید استخراجی بیشتر نسبت به دیگر حلال‌ها به عنوان حلال مناسب انتخاب شد. در میان روش‌های استخراج کارتنوئید از گیاه یونجه استفاده از روش استخراج با حلال DMSO در اندام هوایی گیاه مدت زمان ٤٨ ساعت نسبت به سایر روش ها موثرتر بود با اینکه صابریان و همکاران (۱۳۹۸) در گزارشی اعلام کردند که حلال استون توانایی بالاتری جهت استخراج کاروتنوئید، نسبت به دو حلال متانول و اتانول دارد (۱۳). Shoaf و Lium (۱۹۷٦) نشان دادند که دی متیل سولفوکسید (DMSO) در استخراج کلروفیل از گونه‌های جلبک نسبت به استون کارآمدتر است (۳۷). آنها بیان کردند استخراج با دی متیل سولفوکسید برخلاف استون نیاز به سائیدن ندارد و نسبت به استون روش ساده‌تری می‌باشد.

در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۰-، استخراج با حلال‌های استون (در غلظت ۸۰ درصد) با روش سائیدن و متانول (۱۰۰ درصد) در روش خیساندن بر میزان کلروفیل a، b و کارتنوئیدها مورد سنجش قرار گرفت . بیشترین میزان کلروفیل a و b در روش استخراج کلروفیل با استون ۸۰ درصد به روش سائیدن، بدست آمد. همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد اختلاف معنی-داری در میزان کلروفیل به دست آمده در روش سائیدن با استون خالص (نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) با میزان کلروفیل به دست آمده از روش سائیدن در استون ۸۰ درصد (نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) وجود ندارد. مطابق نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت حلال استون دارای توانایی بالاتری در استخراج کلروفیل a نسبت به دیگر حلال‌ها بوده و به‌عنوان حلال مناسب معرفی می گرد د .

نتیجه گیری:

جهت مراقبت بعد از برداشت اندام هوایی گیاه یونجه و حفظ بیشتر کلروفیل دمای ۲۰- بهتر از ٤ درجه سانتیگراد عمل می¬کند. همچنین جهت استخراج کلروفیل، روش سائیدن و استفاده از حلال استون در مقایسه با حلال¬های دیگر عملکرد بهتری دارد.

تقدیر و تشکر

بدین¬وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و بخش آزمایشگاه‌ها قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع:

تعارض منافعی وجود نداشته است.

References

1. Bagheri, S. Radi, m., & Amiri, S.Investigation of chemical structure and stability of chlorophyll as a natural pigment. 2012. 21 th national congress of Iranian Food Science and Technology.

2. Park, M.H., Sangwanangkul, P., & Baek, D.R. . Changes in carotenoid and chlorophyll content of black tomatoes (Lycopersicone sculentum L.) during storage at various temperatures. Saudi journal of biological sciences, 2018, 25(1), 57-65. **DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.10.002.**

3. López-Millán, A. F., Duy, D., & Philippar, K.. Chloroplast iron transport proteins–function and impact on plant physiology. Frontiers in plant science,2016, 7, 178. **DOI: 10.3389/fpls.2016.00178.**

4. Staehelin, L. A.. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. Photosynthesis research, 2003, 76(1), 185-196. **DOI: 10.1023/A:1024994525586.5.**

5. Camm, E. L., & Green, B. R. How the chlorophyll-proteins got their names. Photosynthesis research, 2004, 80(1), 189-196. **DOI: 10.1023/B:PRES.0000030460.26687.95.**

6. Markwell, J. P., Thornber, J. P., & Boggs, R. T. Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll—protein complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979, 76(3), 1233-1235. **DOI: 10.1073/pnas.76.3.1233.**

7. Jotham, R., Austin, II, Staehelin L. A. Three-Dimensional Architecture of Grana and Stroma Thylakoids of Higher Plants as Determined by Electron Tomography. Plant Physiology, 2011, 155 (4): 1601–1611. **DOI: 10.1104/pp.110.170647.**

8. Hubo, X., Jie, W., Zhaopeng, W., Yongmao, G., Zhipeng, W., & Zhengqiang, Z. Discrimination of brownheart of Korla pear using vibration frequency spectrum technique. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 2017, 10(2), 259-266.

9. Katre, Y., Singh, M., & Singh, A. K. Kinetics and Mechanism of Cetyltrimethylammonium Bromide Catalyzed N-Bromosuccinimide Oxidation of D-Mannose in Acidic Medium. Journal of dispersion science and technology, 2011, 32(6), 903-912.

10. Hörtensteiner, S., & Kräutler, B. Chlorophyll breakdown in higher plants. Biochim. Biophys. Acta, B. 2011, 1807(8):977-88. **DOI: 10.1016/j.bbabio.2010.12.007**.

11. Oberhuber, M., Berghold, J., Breuker, K., Hörtensteiner, S., & Kraütler, B. Breakdown of chlorophyll: a nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless "nonfluorescent" chlorophyll catabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003,100(12), 6910-6915.

12. Skutnik, E., Rabiza-Swider, J., Wachowicz, M., & Łukaszewska, A. J. Senescence of cut leaves of Zantedeschia aethiopica and Z. elliottiana. Part I. Chlorophyll degradation. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 2004, 3(2), 57-65.

13. saberian, H., hosseini, F.,Bolourian, Sh. Optimizing the extraction condition of chlrophyll from alfalfa and investigating its qualitative andquantitative properties in comporison to different plant resources. JFST. 2017, 71 (14): 47-57.

14. Humphrey, A. Chlorophyll as a color and functional ingredient. Journal of food science, 2004, 69(5): 422-425. **DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x.**

15. Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. International journal of chemical engineering, 2010

16. Ritchie, R. J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynthesis research, 2006, 89(1), 27-41.

17. McQuistan, T. J., Simonich, M. T., Pratt, M. M., Pereira, C. B., Hendricks, J. D., Dashwood, R. H., Williams, D. E., & Bailey, G. S. Cancer chemoprevention by dietary chlorophylls: A 12,000-animal dose–dose matrix biomarker and tumor study. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(2), 341-352 .**DOI: 10.1016/j.fct.2011.10.065.**

18. Subramoniam, A. Asha VV. Nair SA. Sasidharan SP. Sureshkumar PK. Rajendran KN. Karunagaran D. Ramalingam K. Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF-à gene by the same. Inflammation, 2012 35, 959-966.

19. Jokopriyambodo, W. The antiradical activity of insoluble water suji (Pleomele angustifolia NE Brown leaf extract and its application as natural colorant in bread product. Journal of Food and Pharmaceutical Sciences, 2014, 2(2).

20. Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. Trends in biotechnology, 2012, 30(1), 37-44. **DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.06.014.**

21. Choudhari, S. M., & Ananthanarayan, L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues.

Food chemistry, 2007, 102(1), 77-81. **DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.04.031.**

22. Munoz, O., Sepúlveda, M., & Schwartz, M. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. Food chemistry, 2004, 87(4), 487-490. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.12.024

23. Ranveer, R. C., Patil, S. N., & Sahoo, A. K. Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. Food and Bioproducts Processing, 2013, 91(4), 370-375. **DOI: 10.1016/j.fbp.2013.01.006**

24. Senklang, P., & Anprung, P. Optimizing enzymatic extraction of Zn–chlorophyll derivatives from pandan leaf using response surface methodology. Journal of Food Processing and Preservation, 2010, 34(5), 759-776. **DOI: 10.1111/j.1745-4549.2009.00393.x.**

25. Stoll, T., Schweiggert, U., Schieber, A., & Carle, R. Process for the recovery of a carotene-rich functional food ingredient from carrot pomace by enzymatic liquefaction. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2003, 4(4), 415-423.

26. DeMan, J. M., Finley, J. W., Hurst, W. J., & Lee, C. Y. Principles of food chemistry, 1999, (Vol. 1). Springer.

27. Park, P., Kim, E., & Chu, K. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. Separation and Purification Technology, 2007, 53(2), 148-152.

28. Blanke, M. M. Determination of chlorophyll using DMSO. Wein-Wissenschaft, 1992, 47(1), 32-35.

Boonsong, P., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. Natural pigments from six species of Thai plants extracted by water for hair dyeing product application. Journal of cleaner Production, 2012, 37, 93-106. **DOI: 10.1016/j.jclepro.2012.06.013.**

29. Schumann, R., Häubner, N., Klausch, S., & Karsten, U. Chlorophyll extraction methods for the quantification of green microalgae colonizing building facades. International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, 55(3), 213-222. **DOI: 10.1016/j.ibiod.2004.12.002**

30. Macías-Sánchez, M., Mantell, C., Rodriguez, M., de la, De La Ossa, E. M., Lubián, L., & Montero, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from Dunaliella salina. Talanta, 2009, 77(3), 948-952. **DOI: 10.1016/j.talanta.2008.07.032.**

31. Hiscox, JD., Israelstam, GF. A method for the extraction of chlrophyll from leaf tissue Without maceration. Can. J. bot. 1979, 57: 1332- 1334.

32. Quach, H.T, Steeper R. L., and Griffin, G.W. An improved method for the extraction and thin layer chromatography of chlorophyll a and b from spinach. J. Chemical. Education, 2004, 81: 385-387.

33. Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry, 2001, 1(1): 1-6.

34. Kumari, R., Ashraf, S., Bagri, G., Khatik, S., Bagri, D., & Bagdi, D. (2018). Extraction and estimation of chlorophyll content of seed treated lentil crop using DMSO and acetone. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(3), 249-250.

35. Sabo, M., Teklic, T., & Vidovic, I. Photosynthetic productivity of two winter wheat varieties (Triticum aestivum L.). Rostlinna vyroba, 2002, 48(1), 80-86.

36. Chisti, Y., & Moo-Young, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. Enzyme and Microbial Technology, 1986, 8(4), 194-204. **DOI: 10.1016/0141-0229(86)90087-6.**

37. Shoaf, W. T., & Lium, B. W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. Limnology and oceanography, 1976, 21(6), 926-928. **DOI: 10.4319/lo.1976.21.6.0926.**

.