



مروری بر کوپیگمانتاسیون، انواع و عوامل موثر بر آن

مرضیه جعفرزاده^۱، مرضیه خطیبزاده^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی پلیمر و رنگ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

۲- استادیار، دانشکده مهندسی پلیمر و رنگ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران، صندوق پستی: ۴۴۱۳-۱۵۸۷۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۲۳ تاریخ بازبینی نهایی: ۹۵/۴/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۰ در دسترس بصورت الکترونیک: ۹۵/۵/۱۰

چکیده

امروزه تقاضای زیادی برای ترکیبات رنگ‌دهنده غذایی منتج از منابع طبیعی که بتواند به عنوان جایگزین ترکیبات رنگ‌دهنده مصنوعی بکار رود، وجود دارد. ترکیباتی مثل آنتوسیانین‌ها پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان ترکیبات رنگ‌دهنده طبیعی نشان داده‌اند که علاوه بر داشتن فام‌های جذاب نارنجی، قرمز و بنفش، به دلیل حلالیت در آب، استفاده‌ی از آن‌ها در سیستم‌های خوراکی آبدار ممکن می‌شود. با این وجود عوامل مختلفی روی فام و پایداری آنتوسیانین‌ها اثر دارند که به همین دلیل مطالعات زیادی در این زمینه انجام شده است. سازوکارهای مختلفی به منظور پایداری آنتوسیانین‌ها بکار برده شده اما مهم‌ترین آن‌ها شامل کپسوله کردن و کوپیگمانتاسیون می‌باشد. فرآیند کپسوله کردن علاوه بر نیاز به تجهیزات پیشرفته، درصد بالایی از ضایعات را در طی فرآیند تولید می‌کند. کوپیگمانتاسیون می‌تواند به عنوان یک روش موثر و با ارزش برای بهبود فام محصولات طبیعی غنی از آنتوسیانین تلقی شود. کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین فام‌های درخشان‌تر، قوی‌تر و پایدارتری نسبت به آنتوسیانین‌های طبیعی می‌دهد. لذا در این پژوهش به بررسی انواع واکنش‌های کوپیگمانتاسیون و عوامل موثر بر آن پرداخته می‌شود.

واژه‌های کلیدی

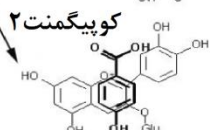
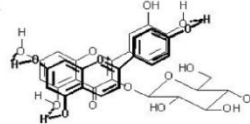
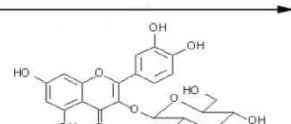
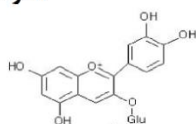
مواد رنگزای طبیعی، آنتوسیانین، کوپیگمانتاسیون، پایداری سازی.

چکیده تصویری



آنتوسیانین شاه توت

کوپیگمنت ۱



آنتوسیانین کوپیگمنته شده

آنتوسیانین کوپیگمنته شده



A Review of Copigmentation, the Types and the Factors Affecting It

M. Jarfarzadeh¹, M. Khatibzadeh^{2*}

1- M.Sc student, Department of Polymer Engineering and Color Technology, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran, Mailbox: 15875-4413.

2- Assistant professor, Department of Polymer Engineering and Color Technology, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran, Mailbox: 15875-4413.

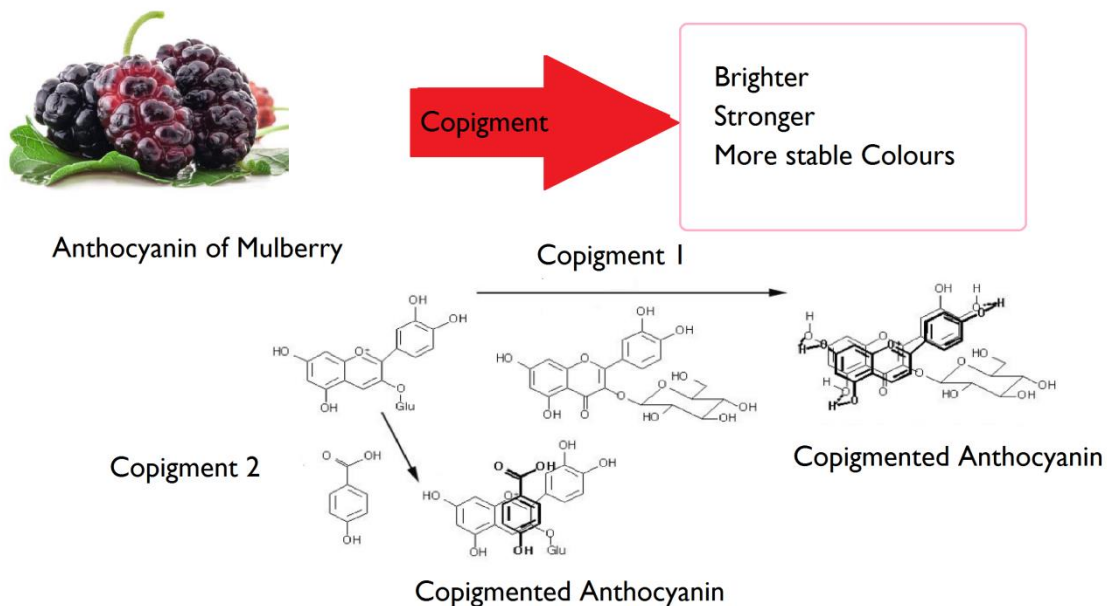
Abstract

There is a demand for food colorants from natural sources that can serve as alternatives to the use of synthetic dyes. Anthocyanins demonstrate a high potential to be used as natural colorants due to their attractive orange, red and purple hues and water solubility that allows their incorporation into aqueous food systems. Different factors affect the color and stability of these compounds. For this reason many studies have been conducted with the aim of increasing the stability of these substances. There are several mechanisms applied in the process of anthocyanins stabilization whose main mechanisms are including: encapsulation and copigmentation. Encapsulation method has some drawbacks as the requirement for sophisticated equipments and high percentage of losses obtained in the process. Copigmentation can be a valuable, natural tool for improving the color of anthocyanin rich food products. Anthocyanin copigmentation gives brighter, stronger, and more stable colours than those of natural anthocyanin. This study provides an overview of copigmentation reaction types and the factors which affect its properties.

Keywords

Natural Dyes, Anthocyanin, Copigmentation, Stabilization.

Graphical abstract



۱- مقدمه

آنتوسیانین‌ها دسته بزرگی از ترکیبات رنگ‌دهنده محلول در آب در قلمرو گیاهان هستند و به دسته‌ای از مولکول‌ها به نام فلاونوئیدها تعلق دارند. آن‌ها مسئول ایجاد خصوصیات رنگی تعداد زیادی از گل‌ها، میوه‌جات و بری‌ها هستند و می‌توانند به عنوان ترکیبات رنگ‌دهنده طبیعی در سیستم‌های خوراکی استفاده شوند. آن‌ها به دلیل داشتن ظاهری جذاب و پررنگ، همچنین دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به ترکیبات رنگ‌دهنده مصنوعی از مقبولیت بیشتری نزد مصرف‌کننده برخوردار هستند [۱]. با این وجود، عوامل مختلفی روی فام و پایداری رنگدانه‌های آنتوسیانین از جمله ساختار و غلظت آن، pH، دما، نور و حضور کوپیگمنت اثر دارند. به همین دلیل مطالعات زیادی با هدف افزایش پایداری این مواد انجام شده است. پایداری آنتوسیانین‌ها بوسیله کپسوله کردن و کوپیگمانتاسیون افزایش می‌یابد [۲]. کپسوله کردن یک روش با هدف بی‌حرکت ساختن و به دام انداختن یک ترکیب فعال داخل ذرات جامد می‌باشد که سبب پایدار کردن ساختار و حفاظت ترکیبات فعال می‌گردد. این روش برای مولکول‌های ناپایدار مانند آنتوسیانین‌ها باعث افزایش پایداری‌شان در برابر حرارت و نور می‌شود. روش‌های مختلفی برای تشکیل و تهیه کپسول در صنایع مختلف مطالعه و بکار برده شده است. اما برای کپسوله کردن آنتوسیانین‌ها فقط تعداد کمی از روش‌های کپسوله کردن ارزیابی شده است. در حالت کلی، کپسوله کردن پایداری آنتوسیانین‌ها را بدون وابستگی به نوع روش استفاده شده افزایش می‌دهد. هرچند میزان پایداری به نوع روش بکاربرده شده بستگی دارد. با وجود مزایای مختلف، این روش علاوه بر نیاز به تجهیزات پیشرفته، اشکالات زیادی از جمله تولید ضایعات فراوان در طی تولید دارد [۲].

به همین دلیل در این مقاله به روش پایدارسازی کوپیگمانتاسیون که یک مبحث جدید و بسیار جالب است و با توجه به رویکردهای زیست‌محیطی جهانی برای استفاده از ترکیبات رنگ‌دهنده طبیعی مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است، پرداخته می‌شود. در ابتدا به تعریفی از کوپیگمانتاسیون و عوامل موثر بر آن پرداخته شده و سپس انواع مختلف کوپیگمانتاسیون به همراه مثال معرفی می‌گردد.

۱-۱- تعریف کوپیگمانتاسیون

کوپیگمانتاسیون پدیده‌ای است که در آن رنگدانه‌های ناپایدار با ترکیبات آلی در نقش کوپیگمنت، تشکیل تجمع یا کمپلکس مولکولی می‌دهند و در طی این عمل پایداری‌شان افزایش می‌یابد. کوپیگمنت‌ها مولکول‌هایی بی‌رنگ و یا کمی زردرنگ هستند که به طور طبیعی در داخل سلول‌های گیاهان در کنار آنتوسیانین‌ها قرار دارند. کوپیگمنت می‌تواند یک ماده متفاوت از آنتوسیانین، یک ساختار متصل به آنتوسیانین و یا یک فلز باشد، حتی در برخی موارد تجمع خود آنتوسیانین‌ها در کنار هم می‌تواند آن‌ها را از تخریب در برابر عوامل مختلف حفظ نماید [۳].

آنتوسیانین‌ها طبقه بزرگی از مواد رنگزای گیاهی هستند که ناپایدارند و فام آن‌ها باید بوسیله ترکیبات دیگری چون کوپیگمنت پایدار شود. ویل استارتر و زولینگر برای اولین بار در سال ۱۹۱۶ مشاهده کردند که فام انگور با افزودن تانن^۱ و اسیدگالیک^۲ به قرمز متمایل به آبی تغییر پیدا می‌کند [۴].

در واقع کوپیگمانتاسیون علاوه بر پایدارسازی سبب تغییرات رنگی در آنتوسیانین نیز می‌شود. تشکیل کمپلکس حاصل از کوپیگمانتاسیون با آنتوسیانین دلیل نوعی از تغییرات در ویژگی‌های طیفی کروموفور آنتوسیانین است که باعث افزایش جذب و شیفت به طول‌موج‌های بالاتر می‌شود [۴]. لذا در این پدیده، یک شیفت باتوکرومیک^۳ مشاهده می‌گردد. به عبارت دیگر طول موج بیشینه جذب در ناحیه مرئی به طول موج‌های بالاتر تغییر مکان می‌دهد که به عنوان اثر آبی شدن بیان می‌شود. همچنین شدت جذب رنگ آنتوسیانین بوسیله کوپیگمانتاسیون تغییر می‌کند که به آن اثر هایپروکرومیک^۴ می‌گویند. شکل ۱ جابه‌جایی باتوکرومیک و اثر هایپروکرومیک برای سیانیدین^۵-۳-گلیکوزید^۶ که با روسمارینیک‌اسید^۷ و پیگمنت‌شده را نشان می‌دهد [۱]. براساس شکل ۱، منحنی A آنتوسیانین اولیه و منحنی B آنتوسیانین کوپیگمنت‌شده را نشان می‌دهد. در منحنی B طول موج بیشینه جذب و همچنین سطح زیرمنحنی افزایش یافته که نشان‌دهنده افزایش شدت جذب رنگ می‌باشد. در واقع کوپیگمانتاسیون سبب افزایش ۵۳/۳۵ درصدی در شدت جذب و نیز افزایش ۲/۸۵ درصدی در طول موج بیشینه شده است.

۲- انواع کوپیگمنت

انواع زیادی از ترکیبات به عنوان کوپیگمنت عمل می‌کنند. مهم‌ترین آن‌ها شامل فلاونوئیدها^۷، آلکالوئیدها^۸، فنولیک‌اسیدها و آمینواسیدها^۹ هستند.

از فلاونوئیدها، روتین^{۱۰} و همچنین کوئرستین^{۱۱} از تاثیرگذارترین کوپیگمنت‌ها هستند که در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. روتین باعث یک جابه‌جایی باتوکرومیک ۳۰ نانومتری و کوئرستین یک جابه‌جایی ۲۸ نانومتری روی مالویندین^{۱۲} ۵-۳-دی‌گلیکوزید^{۱۳} می‌شوند. هرچند در مقادیر pH خیلی کم (کمتر از ۲)، کوپیگمانتاسیون بین مولکولی که بوسیله روتین القا می‌شود فقط جابه‌جایی باتوکرومیک القا می‌کند و شدت رنگ را افزایش نمی‌دهد [۵].

¹ Tannin

² Gallic Acid

³ Bathochromic Shift

⁴ Hyperchromic Effect

⁵ Cyanidin 3-Glucoside

⁶ Rosmarinic Acid

⁷ Flavonoid

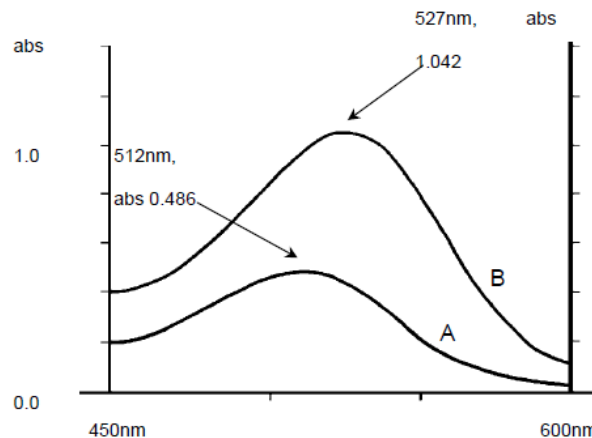
⁸ Alkaloid

⁹ Amino acids

¹⁰ Rutin

¹¹ Quercetin

¹² Malvidin 3,5-diglucoside



شکل ۱- شیفت باتوکرومیک و اثر هایپرکرومیک مربوط به سیانیدین ۳-گلیکوزید کوپیگمنته شده با روسمارینیک/اسید [۱].

(هیدروکسی سینامیک اسید و هیدروکسی بنزوئیک اسید) از جمله ترکیباتی هستند که به منظور تثبیت آنتوسیانین ها مورد استفاده قرار می گیرند [۶]. از گروه فنولیک اسیدها، سیناپیک اسید و فرولیک اسید را می توان به عنوان تاثیرگذارترین کوپیگمنت ها نام برد.

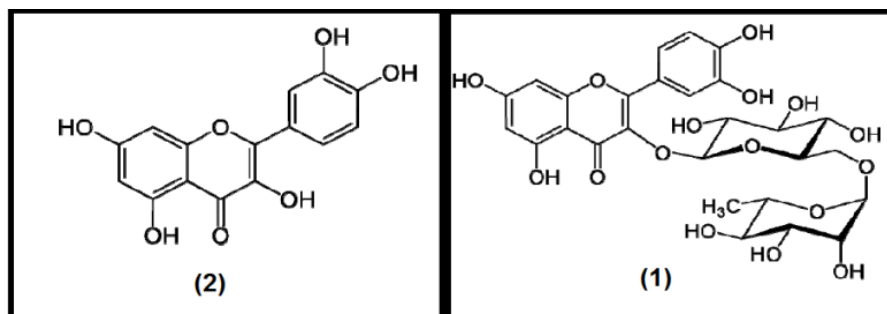
۳- انواع واکنش های کوپیگمانتاسیون

کوپیگمانتاسیون می تواند به چهار روش صورت گیرد. مهم ترین سازوکار کوپیگمانتاسیون، تشکیل ترکیبات بین مولکولی و درون مولکولی است. سازوکار خودمشارکتی و کمپلکس فلزی هم از دیگر واکنش های کوپیگمانتاسیون است. سازوکارهای مختلف کوپیگمانتاسیون حاصل واکنش های متفاوت مابین آگلیکون، گروه فنودی، کوپیگمنت و اسید است که در شکل ۳ نحوه رخداد پدیده ی کوپیگمانتاسیون به صورت شمایی نشان داده شده است [۱].

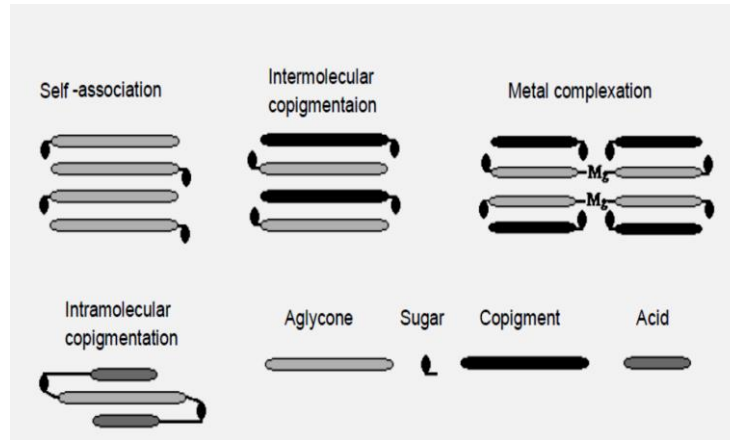
آلکالوئید به ترکیبات آلی شیمیایی گفته می شود که دست کم دارای یک اتم نیتروژن در حلقه هتروسیکلیک هستند. مشخصه آلکالوئیدها داشتن ترکیبات نیتروژنی است. در حقیقت ارائه تعریفی دقیق از اصطلاح آلکالوئید (شبه قلیا) تا حدی مشکل است، چون مرز واضحی بین آلکالوئیدها و آمین های پیچیده طبیعی وجود ندارد. آلکالوئیدهای معمول که از گیاهان بدست می آیند، نوعی ترکیبات بازی هستند که معمولاً دارای یک یا بیش از یک اتم نیتروژن در یک حلقه هتروسیکلیک می باشند.

از بین آمینواسیدهای مصرفی به عنوان تقویت کننده فام، پرولین^۱ و آرژینین^۲ بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند. فنولیک اسیدها

- ¹ Proline
² Arginine



شکل ۲- ساختار روتین (۱) و کوئرستین (۲) [۵].



شکل ۳- انواع واکنش‌های کوپیگمانتاسیون [۱].

می‌گیرد. با قرارگیری آنتوسیانین و کوپیگمنت روی هم، از حمله نوکلئوفیلی آب به مولکول آنتوسیانین جلوگیری می‌شود که در شکل A-۴ نشان داده شده است. همچنین یک پیوند هیدروژنی بین گروه کتون شکل باز کوئیندال یک آنتوسیانین و هیدروکسیل‌های یک کوپیگمنت فلاونول یک شکل ممکن از تشکیل کمپلکس است که در شکل B-۴ نشان داده شده است [۱].

در بعضی موارد، گروه کتون در موقعیت ۷ و ۴ آنتوسیانین با گروه هیدروکسیل در موقعیت ۳ و ۴ یک فلاونول پیوند هیدروژنی برقرار خواهد کرد. برخلاف کمپلکس فلزی، کوپیگمانتاسیون بین مولکولی با همه آنتوسیانیدین‌های اصلی اتفاق می‌افتد [۵].

تکسایرا و همکارانش تشکیل کمپلکس آنتوسیانین پیاز با اپی‌کتچین^۲ و اپی‌گالوکتچین^۳ را بررسی کردند. نزدیک‌ترین هندسه به ساختار کمپلکس آنتوسیانین پیاز- کوپیگمنت در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تشکیل این کمپلکس بوسیله نیروهای واندروالس بین سطح صفحه‌ای بزرگ آنتوسیانین و مولکول کوپیگمنت اتفاق می‌افتد [۹].

۳-۱ کوپیگمانتاسیون بین مولکولی^۱

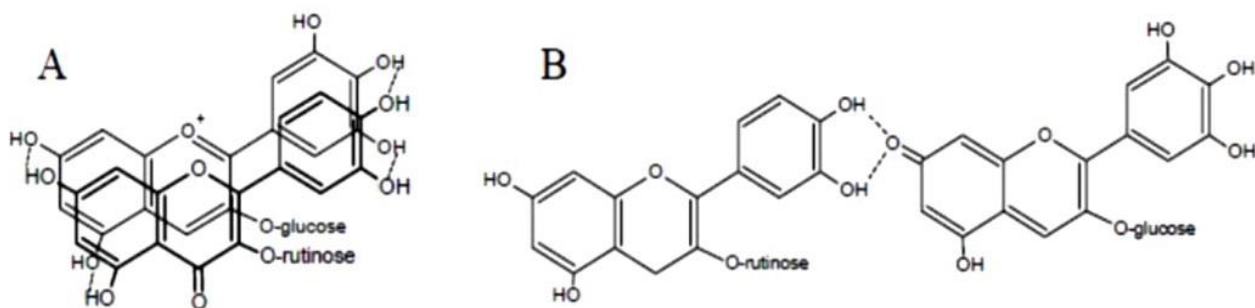
این کوپیگمانتاسیون در بین میوه‌جات و بری‌ها و سایر محصولات مشتق شده از آن‌ها بیشتر از کوپیگمانتاسیون درون مولکولی مشاهده می‌شود که این امر به دلیل کمبود آنتوسیانین‌های آسیله‌شده در میوه‌جات و بری‌ها می‌باشد.

کوپیگمانتاسیون بین مولکولی به عنوان واکنش بین یک آنتوسیانین رنگی و یک کوپیگمنت بی‌رنگ است که بر پایه ایجاد پیوندهای ضعیف بوده و پیوند کووالانسی بین آن‌ها وجود ندارد. ایجاد پیوندهای هیدروژنی و واکنش آب‌گریزی به عنوان سازوکار اصلی انجام واکنش برای کوپیگمانتاسیون بین مولکولی پیشنهاد می‌شود [۷]. پیوندهای یونی (الکترواستاتیک) هم ممکن است در ایجاد کمپلکس نقش داشته باشند [۵]. هرچند عده‌ای بیان کردند که دافعه و جاذبه کولمبیک بین آنتوسیانین و کوپیگمنت‌اش عامل محرکی برای کوپیگمانتاسیون نیست [۸]. کوپیگمانتاسیون بین مولکولی بیشتر توسط شکل آنتوسیانینی کاتیون فلاویلوم و باز کوئیندال اتفاق می‌افتد [۵]. از آنجایی که این دو شکل آنتوسیانین به شکل مسطح هستند در نتیجه فعل و انفعال بین کوپیگمنت‌ها با این دو راحت‌تر از بقیه حالت‌های تعادلی صورت

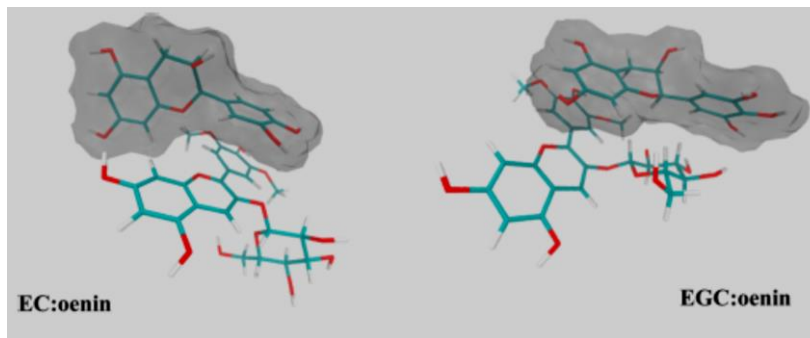
² Epicatechin

³ Epigallocatechin

¹ Intermolecular Copigmentation



شکل ۴- سازوکارهای کوپیگمانتاسیون بین مولکولی [۱].



شکل ۵- ساختار احتمالی کمپلکس آنتوسیانین پیاز با اپی کتچین (EC) و اپی گالوکتچین (EGC) [۹].

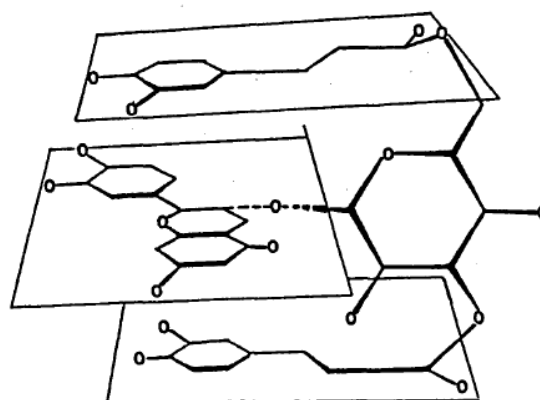
۳-۲- کوپيگمانتاسيون درون مولكولى^۱

کوپيگمانتاسيون درون مولكولى اين گونه تعريف مى شود كه كوپيگمنت قسمتى از مولكول آنتوسيانين است و كروموفور آنتوسيانين به صورت كووالاتسى با باقى مانده قندى اش پيوند داده مى شود [۷]. در واقع در واكنش هاى درون مولكولى يك اسيدآلى، يك گروه آسيل آروماتيك يا يك فلاونويد به صورت كووالاتسى با يك كروموفور آنتوسيانين پيوند داده مى شود [۱۰]. در تعريف خاص تر گفته شده كه آسيل دار كردن كووالاتسى مولكول آنتوسيانين باعث تثبيت و پايدارى پيگمنت ها مى شود كه اين آسيل دار كردن هميشه در بخش قندى آنتوسيانين اتفاق مى افتد [۱۱].

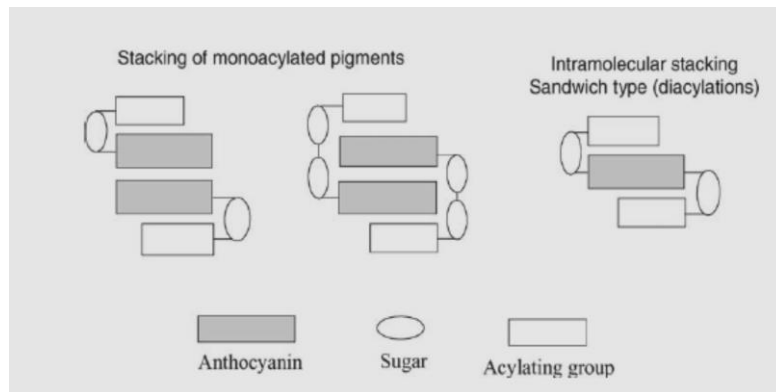
كوپيگمانتاسيون درون مولكولى به دليل تشكيل پيوند كوالانس، قوى تر از كوپيگمانتاسيون بين مولكولى بوده و تاثير زيادى روى تثبيت و پايدارى فام آنتوسيانين ها دارد. پايدارى رنگى فوق العاده رنگ گل ها نديك pH خنثى، به اين دليل كه آنتوسيانين گل ها اغلب آسيله شده است، مربوط

^۱ Intramolecular Copigmentation

ساختار و موقعيت باقى مانده آگليكونى متصل و همچنين ساختار و تعداد بخش قندى روى كوپيگمانتاسيون درون مولكولى تاثيرگذار است. شكل ۶ كوپيگمانتاسيون درون مولكولى را نشان مى دهد كه گروه هاى آسيل حاصل از كوپيگمانتاسيون درون مولكولى در بالا و پايين كاتيون-فلاويليوم آن را در برابر حمله ساير عوامل حفاظت نموده و سبب پايدارى مى شود. كوپيگمانتاسيون تك آسيله آنتوسيانين ها به اندازه كوپيگمانتاسيون پلى آسيله كاراى ندارد. اين موضوع ناشى از اين است كه در آنتوسيانين هاى مونوآسيله يك بخش رنگى مولكول آنتوسيانين به صورت محافظت نشده باقى مانده و عوامل هسته دوست مى توانند از همان بخشى كه محافظت نشده به قسمت آگليكونى حمله كنند. عده اى نيز بيان كردند كه آنتوسيانين دى آسيله مى تواند به وسيله يك بهم چسبيدگى شبیه ساندويچ باعث واكنش آب گريزى بين باقى مانده آروماتيك صفحه اى گروه هاى آسيل و هسته پيريليوم با بار مثبت شود. در حالى كه در مونوآسيله فقط يك طرف حلقه پيريليوم مى تواند در برابر حمله نوكلئوفيلى آب حفاظت شود و بنا بر اين فقط يك اثر بين مولكولى ضعيف اتفاق مى افتد. سازوكار پايدار شدن آنتوسيانين هاى مونو و دى-آسيله در شكل ۷ نشان داده شده است [۱۲]. واكنش بين يك گروه آسيل حمله كننده به يك باقى مانده آگليكونى كه در موقعيت ۳، ۵، ۷، ۳ و ۵ آنتوسيانين مى باشد با آگليكون امكان پذير است [۷].



شكل ۶- قرارگيرى گروه هاى آسيل بالا و پايين هسته فلاويليوم [۱۱].



شکل ۷- سازوکار پایدارشدن آنتوسیانین‌های مونو و دی‌آسیله [۱۲].

۳-۳- خود مشارکتی^۱

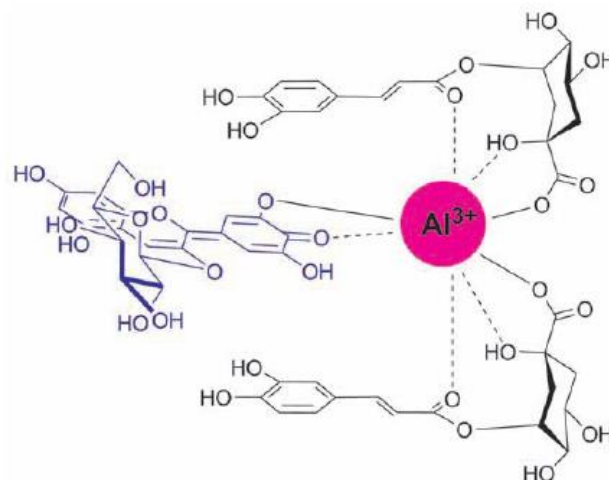
آسن در سال ۱۹۷۲ پی برد که افزایش غلظت آنتوسیانین‌ها از ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۱ مولار میزان طول موج بیشینه جذب را از ۵۰۲ به ۵۰۷ نانومتر جابه‌جا می‌کند و باعث افزایش شدت رنگ می‌شود که این به دلیل کوپیگمانتاسیون خودمشارکتی می‌باشد. این اتفاق وقتی می‌افتد که دو یا بیشتر از مولکول‌های آنتوسیانین تجمع کنند و روی هم قرار گیرند [۵]. هرچند که سازوکار خودمشارکتی هنوز به صورت کامل شناخته نشده ولی چندین فرضیه در مورد واکنش‌های محتمل که به این بحث مربوط می‌شود، بیان شده‌است. عده‌ای بیان کردند که سازوکار کوپیگمانتاسیون خودمشارکتی شبیه به قرار گرفتن مولکول‌های آنتوسیانین روی هم می‌باشد و به صورت اساسی از طریق واکنش‌های آب‌گریزی که بین هسته‌های آروماتیک‌شان اتفاق می‌افتد، پایدار می‌شود [۲].

۳-۴- تشکیل کمپلکس فلزی^۲

ایجاد کمپلکس فلزی اهمیت کمتری در صنایع غذایی داشته و این امر ناشی از آلودگی فلزی نامطلوبی است که ممکن است به وجود آید. تغییرات زیادی که در رنگ گل‌ها مشاهده می‌شود ناشی از تشکیل کمپلکس فلزی بین فلز با نمک فلاویلیوم قرمز رنگ است [۵]. رایج‌ترین فلزات در تشکیل کمپلکس آنتوسیانین‌ها قلع، مس، آهن، آلومینیوم، منیزیم و پتاسیم هستند. تنها سیانیدین، دلفینیدین و پتونیدین‌ها که بیش از یک گروه هیدروکسیل در حلقه B خود دارند دارای توانایی تشکیل کمپلکس‌های فلزی می‌باشند [۲]. شکل ۸، تشکیل کمپلکس فلزی دلفینیدین ۳-گلیکوزید با آلومینیوم را نشان می‌دهد.

² Metal Complexation

¹ Self- Association



شکل ۸- کمپلکس فلزی دلفینیدین ۳-گلیکوزید با آلومینیوم [۸].

۴- عوامل موثر بر کوپیگمانتاسیون

واکنش کوپیگمانتاسیون به شدت با تغییرات غلظت و ساختار رنگدانه، دما، pH، نور، آنزیم، آسکوربیک اسید و مواد قندی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. که در ادامه این موارد توضیح داده می‌شود.

۴-۱- اثر غلظت

در این مورد با افزایش غلظت کوپیگمنت و یا غلظت آنتوسیانین که سبب در معرض هم قرارگیری ساختارهای آنتوسیانینی و کوپیگمنت بیشتری می‌شود، کوپیگمانتاسیون موثرتری رخ می‌دهد. کلمنت و همکارانش، اثر افزودن میزان کوپیگمنت کافئیک اسید را روی کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین‌های ضایعات انگور بررسی کردند و مشاهده نمودند که افزایش میزان کوپیگمنت نسبت به عصاره خام سبب افزایش جذب می‌شود [۱۳]، این افزایش در شکل ۹ نشان داده شده است.

در واقع با افزایش غلظت آنتوسیانین به این علت که امکان ایجاد تجمع بین مولکول‌های آنتوسیانین بیش‌تر می‌شود، پایداری و جذب بیش‌تر می‌شود. از سویی با افزایش غلظت کوپیگمنت، امکان ایجاد کمپلکس بین کوپیگمنت و آنتوسیانین بیش‌تر می‌شود که در نتیجه پایداری بیش‌تر و جذب بالاتری مشاهده می‌شود.

در شکل ۹ نیز با افزایش نسبت کوپیگمنت کافئیک اسید به عصاره خام آنتوسیانین، سطح زیر منحنی جذب در طول موج بیشینه جذب ۵۳۵ نانومتر، افزایش می‌یابد. که این تغییرات را می‌توان به تشکیل کمپلکس بیش‌تر بین آنتوسیانین و کوپیگمنت مرتبط دانست.

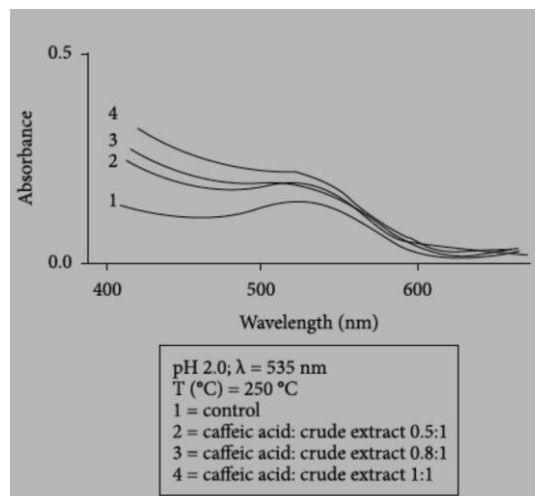
۴-۲- اثر ساختار شیمیایی

اثر کوپیگمانتاسیون با افزایش درجه متیل‌دار و گلیکوزیدشدن آنتوسیانین افزایش می‌یابد. ساختار آنتوسیانین و نیز کوپیگمنت روی میزان کوپیگمانتاسیون اثر می‌گذارد. هرچه گروه‌های هیدروکسیل بیشتری در کوپیگمنت فلاونوئید وجود داشته باشد، کوپیگمانتاسیون و تشکیل کمپلکس قوی‌تر خواهد بود و بهترین کوپیگمنت از فلاونوئیدهایی که حاوی گروه‌های هیدروکسیل زیادی هستند، بدست می‌آید. به این دلیل که امکان تشکیل پیوند هیدروژنی را افزایش می‌دهند. همچنین ثابت شده که گروه‌های متوکسیل روی کوپیگمنت، اثر کوپیگمانتاسیون را کاهش می‌دهند [۱۵].

۴-۳- اثر دما

افزایش دما مانع از کوپیگمانتاسیون می‌شود و به شدت اثر تشدید رفام تولیدشده بوسیله افزایش کوپیگمنت به آنتوسیانین را کاهش می‌دهد. در واقع این افزایش، سبب تخریب پیوند بین آنتوسیانین و کوپیگمنت می‌شود و با ایجاد ترکیبات بی‌رنگ، سبب کم‌رنگ یا بی‌رنگ شدن نمونه حرارت داده شده می‌گردد [۱۴]. کوپچار و همکارانش اثر افزایش دما روی کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین عصاره انگور قرمز و کوپیگمنت‌های گالیک اسید، کلروژنیک اسید و چند کوپیگمنت دیگر را بررسی نموده و مشاهده کردند که افزایش دما، سبب پایین آمدن محتوای آنتوسیانینی نمونه‌های کوپیگمنت می‌شود. تغییرات مذکور در جدول ۱ نشان داده شده است [۱۵].

قابل ذکر است که نمونه کنترل فاقد کوپیگمنت در دماهای متفاوت، بیشتر از نمونه‌های کوپیگمنته شده محتوای خود را از دست می‌دهد. در واقع محتوای آنتوسیانینی در هر دمایی برای نمونه‌های کوپیگمنته شده بیش‌تر از نمونه کنترل است که این گواهی بر پایداری آنتوسیانین‌ها توسط کوپیگمانتاسیون در دمای بالا می‌باشد.



شکل ۹- اثر افزایش میزان کوپیگمنت روی منحنی جذب کمپلکس آنتوسیانین-کوپیگمنت [۱۳].

جدول ۱- محتوای آنتوسیانینی (میلی گرم/۱۰۰ میلی لیتر) عصاره انگور قرمز کویگمنته شده در طی حرارت دادن در دماهای مختلف [۱۵].

دما (درجه سانتی گراد)	۳۰	۵۰	۷۰	۹۰
کنترل (عصاره فاقد کویگمنت)	۴۷/۹۷	۴۵/۵۹	۳۹/۳۳	۳۴/۳۲
عصاره کویگمنته شده با گالیک اسید	۵۰/۴۱	۴۷/۲۲	۴۱/۵۸	۳۷/۳۲
عصاره کویگمنته شده با کلروژنیک اسید	۴۹/۶۰	۴۷/۰۹	۴۲/۸۳	۳۷/۴۵

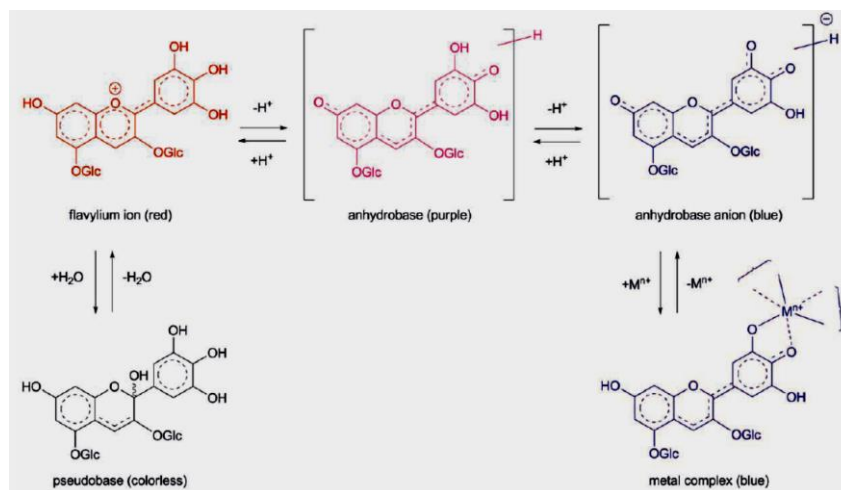
۴-۴- اثر pH

آنتوسیانین فقط در شکل کاتیون فلاویلیوم حضور دارد و اثر هایپرکرومیک در حضور کویگمنت به دلیل واکنش بین کاتیون فلاویلیوم و کویگمنت مشاهده می شود.

در pH=۳، محلول آنتوسیانین بدون کویگمنت به علت تبدیل شدن بخشی از کاتیون فلاویلیوم به شبه باز (بی رنگ)، با کم رنگ شدن نمونه همراه است در حالی که پایداری فام آنتوسیانین با افزودن کویگمنت اتفاق می افتد. بنابراین نقش کویگمنت جلوگیری از تشکیل شبه باز (بی رنگ) از کاتیون فلاویلیوم است. در pH=۴-۶، محلول آنتوسیانین بدون کویگمنت به صورت تقریباً بی رنگ است. در حالی که محلول حاوی کویگمنت فامش را حفظ می کند [۱۶]. همچنین بیشترین تغییر مکان باتوکرومیک در واکنش های کویگمانتاسیون اساساً در مقدار pH کمتر از ۳ که غلظت بیش تری از کاتیون فلاویلیوم موجود است، اتفاق می افتد [۱۶].

تغییرات pH روی طول موج بیشینه جذب آنتوسیانین ها اثر می گذارد. بنابراین آنتوسیانین ها با تغییرات pH می توانند فام های مختلفی را تجربه کنند. شکل یون فلاویلیوم قرمز به همراه شکل های دیگر آنتوسیانین در محلول، وابسته به pH، حضور خواهند داشت. فرم یون-فلاویلیوم در pH بین ۱ و ۲ غالب است و با افزایش pH، مقدار آن کاهش خواهد یافت. همچنین واکنش های انتقال پروتون منجر به ایجاد بازهای انیدرو و هیدراته شدن یون فلاویلیوم، باعث ایجاد شبه باز بی رنگ خواهد شد. در شکل ۱۰ شکل های تعادلی آنتوسیانین با توجه به pH در محیط آبی نشان داده شده است [۸].

مشاهدات نشان داده است که بیشترین اثر هایپرکرومیک (افزایش میزان جذب) ناشی از کویگمانتاسیون در pH=۳/۳ اتفاق می افتد. تغییرات در میزان جذب آنتوسیانین با تغییر pH در حالت با و بدون کویگمنت را می توان با سازوکار پیشنهادی برویلارد توضیح داد: در pH=۱-۲



شکل ۱۰- شکل های تعادلی آنتوسیانین با توجه به pH در محیط آبی [۸].

۴-۵- اثر نور

می‌کند. از طرفی می‌تواند با تجزیه آنتوسیانین‌ها و یا تشکیل آنتوسیانین پلیمریزه شده باعث بد رنگ شدن و یا بی‌رنگ شدن آنتوسیانین‌ها شود، و از طرفی با اکسایش آسکوربیک اسید و تشکیل پراکسید هیدروژن باعث پایداری آنتوسیانین‌ها شود. علاوه بر آن آسکوربیک اسید می‌تواند به عنوان محافظ آنتوسیانین‌ها در برابر تجزیه آنزیمی باشد [۱]. بنابراین با توجه به اثر دوگانه آنزیم بر پایداری آنتوسیانین، این ترکیبات اثر نامطلوبی بر کوپیگمانتاسیون نیز خواهند داشت.

۴-۸- اثر مواد قندی

قندها و محصولات حاصل از تجزیه آن‌ها باعث کاهش پایداری آنتوسیانین‌ها می‌شود. واکنش آنتوسیانین‌ها با محصولات حاصل از تجزیه قندها و همچنین با آسکوربیک اسید منجر به تشکیل پلیمرهای قهوه‌ای رنگ می‌شود. قندها می‌توانند به عنوان محافظ آنتوسیانین‌ها و فام آن‌ها نیز عمل کنند. قندها از تجزیه آنتوسیانین‌ها در طول نگهداری ماده حاوی آنتوسیانین به شکل فریز شده محافظت می‌کنند. قندها همچنین از قهوه‌ای شدن و تشکیل پیگمنت‌های پلیمری توسط واکنش‌های آنزیمی جلوگیری به عمل می‌آورند. کاهش فعالیت آبی توسط قند هم می‌تواند منجر به کاهش تجزیه آنتوسیانین‌ها شود [۱].

۵- نتیجه گیری

آنتوسیانین به عنوان یک رنگدانه که در محصولات طبیعی به وفور یافت می‌شود، به علت خواص مختلف دارویی، پزشکی و همچنین حلالیت در آب برای سیستم‌های غذایی گزینه‌ای مناسب می‌باشد. با توجه به این که این مواد در برابر عوامل خارجی همچون حرارت، نور، pH و غیره تخریب می‌شوند، بنابراین برای استفاده از آن‌ها در سیستم‌های غذایی و سایر صنایع، باید پایداری در برابر عوامل خارجی و عمر انبارداری آن‌ها را افزایش داد. به همین منظور از کوپیگمانتاسیون استفاده می‌شود. در واکنش کوپیگمانتاسیون یک ماده به عنوان کوپیگمنت عمل می‌کند و با سازوکارهای و پیوندهای مختلف فیزیکی یا شیمیایی سبب پایداری ماده رنگی در برابر عوامل مختلف خارجی می‌گردد. این کوپیگمنت می‌تواند یک گروه خارجی، یک ساختار متصل به آنتوسیانین و یا یک فلز باشد، حتی در برخی موارد تجمع خود آنتوسیانین‌ها در کنار هم می‌تواند آن‌ها را از تخریب در برابر عوامل مختلف حفظ نماید. افزایش دوام و پایداری آنتوسیانین‌ها امکان استفاده از این منبع غنی را دوچندان خواهد نمود.

نور عامل دیگری است که روی پایداری آنتوسیانین‌ها اثر دارد. پوسپیتا و همکارانش در سال ۲۰۱۲، اثر نور فلورسنت سفید روی پایداری فام آنتوسیانین را در دو فرم طبیعی و کوپیگمنت شده بررسی کردند. نتایج نشان داد که آنتوسیانین در برابر نور فلورسنت با تخریب شدیدتری همراه است. همچنین آنتوسیانین‌های کوپیگمنت شده کمتر از آنتوسیانین به تنهایی تخریب می‌شوند [۱۰]. به این دلیل که کوپیگمانتاسیون با توجه به کمپلکس تشکیل شده، مانع از شکسته شدن پیوندهای آنتوسیانین در معرض نور می‌گردد و پایداری آنتوسیانین با افزودن کوپیگمنت، در برابر تابش نور افزایش می‌یابد.

۴-۶- اثر آنزیم

آنزیم یک ماده آلی است که یک فرآیند شیمیایی را در یک موجود زنده، تقویت یا تضعیف می‌کند، ولی خودش دگرگون نمی‌شود. به عبارت دیگر آنزیم‌ها کاتالیزگرهای فرآیندهای زیستی هستند و نسبت به کاتالیزگرهای غیرزیستی کارایی بسیار بالایی دارند. مطالعات نشان داده که غیرفعال سازی آنزیم‌ها، پایداری آنتوسیانین‌ها را بهبود می‌بخشد. رایج‌ترین آنزیم تجزیه‌کننده آنتوسیانین‌ها، گلیکوزیدازها^۱ هستند که باعث شکست پیوند کووالانسی مابین گروه قندی و بخش آنتوسیانیدین می‌شود. نتیجه آن، تخریب آنتوسیانیدین که بسیار ناپایدار است، می‌باشد. در تجزیه آنزیمی آنتوسیانین‌ها، کوپنون‌ها^۲ مهم‌ترین نقش را بازی می‌کنند. آنزیم‌ها ابتدا سایر ترکیبات فنولیک موجود در محیط را اکسید کرده و تولید کوپنون مربوط به آن ترکیب را می‌کنند که این کوپنون‌ها با آنتوسیانین‌ها واکنش داده و باعث تجزیه آن‌ها و به وجود آمدن محصولات قهوه‌ای رنگ می‌شوند [۱]. بنابراین با توجه اثر نامطلوب آنزیم بر پایداری آنتوسیانین، این ترکیبات اثر نامطلوبی بر کوپیگمانتاسیون نیز خواهند داشت.

۴-۷- اثر آسکوربیک اسید

غنی سازی آمیوه‌ها با آسکوربیک اسید یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای محافظت محصول از اکسایش و افزایش ارزش تغذیه‌ای محصولات غذایی است. آسکوربیک اسید در پایداری آنتوسیانین‌ها نقش‌های مختلفی ایفا

¹ Glycosidases

² Quinones

۶- مراجع

1. M. Rein, "Copolymerization reactions and color stability of berry anthocyanins (Dissertation)", University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, 2005.
2. R. Cavalcanti, Santos D, Meireles M, "Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview", Food Res. Int., 44, 499-509, 2011.
3. B. Gordillo, Pulido F, Gilete M, Miret M, Heredia F, "Comprehensive colorimetric study of anthocyanic

- copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio". *J. Agric. Food Chem*, 60, 2896-2905, **2012**.
4. N. Malaj, B. Simone, A. Quartarolo, N. Russo, "Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids". *Food Chemistry*, 141, 3614-3620, **2013**.
 5. S. Asen, R. Stewart, K. Norris, "Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color", *Phytochem*, 11, 1139-1144, **1972**.
 6. J. Markovic, N. Petranovic, J. Baranac, "A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids", *Agric Food Chem*, 48, 5530-5536, **2000**.
 7. M. Eiro, M. Heinonen, "Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation", *J. Agric. Food Chem*, 50, 7461-7466, 2000.
 8. K. Yoshida, M. Mori, T. Kondo, "Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology", *Nat. Prod. Rep.*, 26, 857-964, **2009**.
 9. N. Teixeira, L. Cruz, N. Bras, N. Mateus, M. Ramos, V. Freitas, "Structural features of copigmentation of oenin with different polyphenol copigments.", *J. Agric. Food Chem*, 61, 6942-6948, **2013**.
 10. S. Puspita, H Christofora, S. Dondin, S. Unang, "Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins", *Food Chem.*, 132, 1908-1914, **2012**.
 11. F. Francis, P. Markakis, "Food colorants: Anthocyanins", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 28, 273-314, **1989**.
 12. M. Giusti, R. Wrolstad, "Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems", *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225, **2003**.
 13. E. Clemente, D. Galli, "Stability of the anthocyanins extracted from residues of the wine industry", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 765-768, **2011**.
 14. E. Ghasemifar, Sh. Saeidian, P. Setareh, "Stability of seedless red grape anthocyanin under the effect of chlorogenic acid copigment, heating and UV irradiation.", *J. Novel. Appl. Sci.*, 2 (11), 594-597, **2013**.
 15. M. Kopjar, V. Pilizota, D. Subaric, J. Babic, "Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition". *Croat. J. Food Sci. Technol*, 1 (1), 24-30, **2009**.
 16. C. Gauche, E. Malagoli, M. Luiz, "Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from cabernet sauvignon grape extracts with organic acids". *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz)*, 67(1), 41-46, **2010**.