

A Review of the Dye Extraction Methods from the Indigo and Woad Plant

Zahra Ahmadi*, Maede Mehdipour, Marye molla

Faculty of Applied Arts, Department of carpet, Art University, P. O. Box:1591634311, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 30-08-2022

Accepted:01-11-2022

Available online:21-12-2022

Print ISSN: 2251-7278

Online ISSN: 2383-2223

DOR: 20.1001.1.22517278.1401.12.3.2.1

Keywords:

Indigo

Woad

Natural Dyes

Dye Extraction

ABSTRACT

Nowadays, despite the presence of synthetic dyes, due to the environmental damage caused by these substances, the approach of returning to natural sources has been revived. Meanwhile, the indigo plant is one of the best plant sources to achieve blue color. Much research has been conducted to extract dyes from indigo and woad since long ago. The purpose of this research is to collect the studies done in this field and, secondly, to use the results of previous research by researchers to improve the extraction methods. The results of the research showed that several methods, such as traditional, hot water, microbial, enzyme, microwave, etc., could be applied. It was also found that variables such as oxidation speed, oxidation time, alkaline environment of fermentation, type of alkaline material, resting time of fermentation, etc. influence the extraction process of indigo and woad dyes, the effect of pH is much important.



*Corresponding author: ahmadi@art.ac.ir



مروری بر روش های استخراج ماده رنگزا از گیاه نیل و وسمه

زهرا احمدی^{۱*}، مائده مهدی پور^۲، ماریه ملا^۳

- ۱- استادیار، دانشکده هنرهای کاربردی، گروه فرش، دانشگاه هنر تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱.
- ۲- دانش آموخته کارشناسی، دانشکده هنرهای کاربردی، گروه فرش، دانشگاه هنر تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱.
- ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده هنرهای کاربردی، گروه فرش، دانشگاه هنر تهران، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۹۱۶۳۴۳۱۱.

چکیده

در عصر حاضر، به دلیل آسیب های زیست محیطی ناشی مواد رنگزای شیمیایی رویکرد بازگشت به سمت منابع گیاهی احیا شده است. گیاه نیل و وسمه بهترین منابع گیاهی برای رسیدن به رنگ آبی با ثبات های عمومی بسیار عالی هستند. از این رو تحقیقات بسیار زیادی به منظور استخراج رنگزا از این گیاهان انجام شده است. روش های استخراج سنتی تا پیشرفته و دستگاهی نتایج خوبی از راندمان استخراج را نشان دادند. هدف از انجام این پژوهش اولاً گردآوری مطالعات صورت گرفته در این حوزه به صورت مجموعه ای جدید و دوماً به کارگیری نتایج تحقیقات پیشین برای بهبود روش های استخراج است. نتایج نشان داد، استخراج ماده رنگزا از نیل یا وسمه از روش های متعددی نظیر روش سنتی، آب گرم، میکروبی، آنزیمی، مایکروویو و غیره می توان استفاده کرد. همچنین مشخص شد که متغیرهایی مانند سرعت اکسیداسیون، زمان اکسیداسیون، محیط قلیایی تخمیر، نوع مواد قلیایی، زمان استراحت تخمیر و غیره بر فرآیند استخراج رنگزاهای نیل و وسمه تأثیر می گذارند، که تأثیر pH بسیار مهم تر است.

اطلاعات مقاله

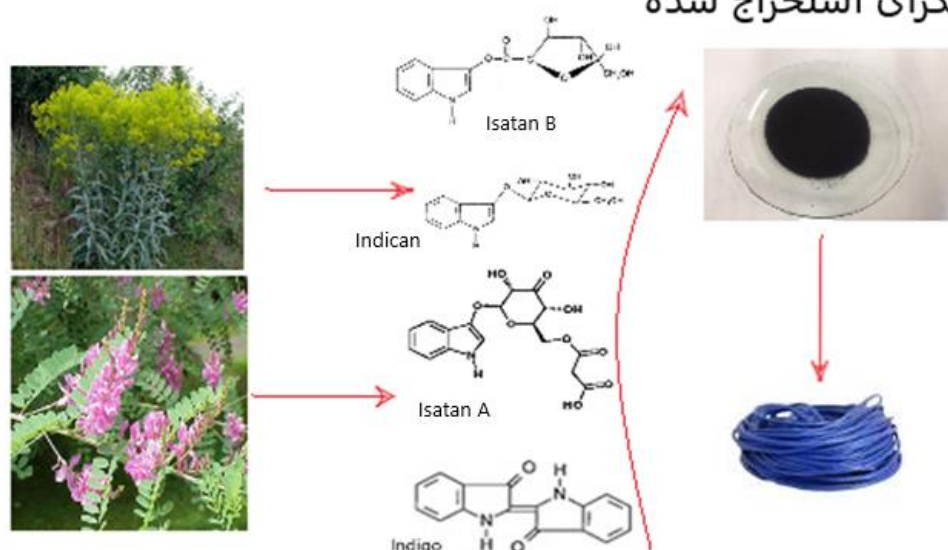
تاریخچه مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰
در دسترس به صورت الکترونیکی: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰
شاپا چاپی: ۲۲۵۱-۷۲۷۸
شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۳-۲۲۲۳

DOR: 20.1001.1.22517278.1401.12.3.2.1

واژه های کلیدی:

نیل
وسمه
ماده رنگزای گیاهی
استخراج ماده رنگزا

رنگزای استخراج شده



گیاه نیل و وسمه

۱- مقدمه

با توجه به تاریخ مکشوف جهان می‌توان به این نکته رسید که بشر از دیرباز با رنگ و رنگرزی آشنا بوده است. یکی از مهم‌ترین مواد رنگزا در طول تاریخ، رنگ آبی بوده است. از جمله گیاهان مورد استفاده به منظور استخراج و به دست آوردن مواد رنگزای آبی، گیاه نیل^۱ و گونه‌های متنوع آن و همین‌طور گیاه وسمه^۲ هستند که در طول تاریخ به این منظور کشت می‌شدند [۱-۳]. روش‌های استخراج مواد رنگزا از این گیاهان به دلیل تفاوت کوچکی که در ساختار مولکولی آن‌ها می‌باشد متفاوت است. اختراع مواد رنگزای مصنوعی و گسترش آن‌ها تاثیر به سزایی در کاهش استفاده از مواد رنگزای طبیعی داشته است؛ که از جمله دلایل آن را می‌توان تنوع وسیع فام رنگی، دستیابی و استفاده‌ی آسان، قیمت پایین، دوام و ثبات‌های مطلوب رنگ‌های مصنوعی دانست. امروزه با وجود آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مواد شیمیایی و تاثیرات مخرب و مضر و عوامل ایجاد حساسیت آن‌ها، توجه جوامع بشری به سمت استفاده بیشتر از مواد با منشأ طبیعی معطوف گشته و تمام فعالیت‌های علمی به سمتی پیش می‌رود که از آسیب‌رسانی به محیط‌زیست کاسته شود [۴]. از این جهت احیا و بازگشت به سمت استفاده دوباره از مواد رنگزای طبیعی بسیار ارزشمند خواهد بود. در تحقیق پیش رو مروری بر مطالعات دانشمندان در مورد روش‌های استخراج مواد رنگزا از گیاهان نیل و وسمه صورت گرفته است تا محققین بتوانند مجموعه‌ای از مطالعات انجام شده در این زمینه را به منظور تحقیقات کامل‌تر و استفاده بهینه از ماده رنگزای گیاهی با فام آبی در دسترس داشته باشند. قبل از این مبحث، روش‌های استخراج مواد رنگزا معرفی می‌شوند.

۲- روش‌های استخراج مواد رنگزای طبیعی

استخراج، فرآیندی برای بدست آوردن بخش‌های موثره گیاه می‌باشد که می‌توان آن را به روش‌های مکانیکی و یا با حلال انجام داد.

۲-۱- استخراج آبی

این روش به طور سنتی برای استخراج ماده رنگزا از گیاهان استفاده می‌شد و امروزه نیز در مقیاس‌های کوچک و بزرگ مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش شامل آسیاب کردن ماده رنگزا به قطعات کوچک‌تر یا پودر کردن آن می‌شود و سپس آن را به مدت طولانی در یک ظرف چوبی و یا فلزی در آب خیس قرار می‌دهند تا ساختار سلولی آن در آب آزاد شود. برای بهبود بهره‌وری استخراج، می‌توان محلول را به مدت ۱ تا ۲ ساعت تا نقطه‌ی جوش حرارت داد. سپس محلول رنگ برای بدست آوردن تهنشین‌ها الک یا صافی می‌شود. در حالی که صاف کردن

محلول برای بدست آوردن ماده رنگزا انجام می‌شود، باقی مانده محلول را می‌توان برای تغذیه حیوانات یا به عنوان کود استفاده کرد. از معایب این روش می‌توان به طولانی بودن زمان استخراج، انرژی و آب مورد نیاز زیاد و بازده کم رنگ اشاره کرد [۵].

۲-۲- روش‌های اسیدی و قلیایی

از آنجا که بسیاری از مواد رنگزا به شکل گلیکوزید هستند، استفاده از اسید یا قلیا، به عنوان مثال اسید کلریدریک و کربنات سدیم به ترتیب آبکافت گلیکوزیدها را تسهیل می‌کند که منجر به استخراج بهتر و بازده بیشتر مواد رنگی می‌شود. روش استخراج قلیایی برای مواد رنگزا دارای گروه‌های فنلی مناسب است زیرا در مواد قلیایی محلول هستند. این روش همچنین برای استخراج رنگ لاک از ترشح حشرات لاک و رنگ قرمز از گلبرگ گلرنگ مناسب است [۵].

۲-۳- روش فراصوت

چندین گزارش تحقیقاتی نشان داده‌اند که استخراج‌هایی که با استفاده از این روش انجام می‌شود بازده استخراج را افزایش می‌دهد و در نتیجه مقدار حلال مورد نیاز، زمان و دمای استخراج را کاهش می‌دهد. هنگامی که ماده رنگزای طبیعی حاوی مواد گیاهی با آب یا هر حلال دیگری در حضور امواج فراصوت تصفیه می‌شود، حباب‌ها یا حفره‌های بسیار کوچکی در حلال ایجاد می‌شود. اندازه آن‌ها افزایش می‌یابد، اما با رسیدن به یک اندازه خاص، نمی‌توانند شکل خود را حفظ کنند. هنگامی که این اتفاق می‌افتد، حفره فرو می‌ریزد یا حباب‌ها می‌ترکند و دما و فشار بالایی ایجاد می‌کنند. میلیون‌ها حباب در هر ثانیه شکل می‌گیرند و فرو می‌ریزند. ایجاد دما و فشار بسیار بالا در حین استخراج باعث افزایش بازده استخراج در مدت زمان کوتاهی می‌شود. گزارش شده است که استخراج رنگزا از گیاهان در این روش در مقایسه با روش سنتی جوشاندن به طور قابل‌توجهی بهبود یافته است [۵].

۲-۴- روش حلال

ماده رنگزای طبیعی را می‌توان با استفاده از حلال‌های آلی مانند اتانل، کلروفرم، اتر نفتی، استن، متانل یا مخلوطی از هر یک از این‌ها مانند اتانل و متانل یا مخلوطشان با آب استخراج کرد. بازده استخراج با استفاده از این روش در مقایسه با روش آبی بهتر است. این روش استخراج معمولاً با استفاده از دستگاه سوکسله بر روی پودر خام خشک شده از هر قسمت از گیاه محتوی مواد رنگزا انجام می‌شود. همچنین در این روش، خالص‌سازی رنگ استخراج شده آسان‌تر است، زیرا حلال‌ها را می‌توان به راحتی با تقطیر حذف و دوباره استفاده کرد [۵].

¹ Indigofera tinctoria L

² Isatis tinctoria, (Woad)

۲-۵- روش مایکروویو

در این روش استخراج، مواد طبیعی با حداقل مقدار حلال در حضور منبع انرژی مایکروویو تصفیه می‌شوند. مایکروویو سرعت فرآیندها را افزایش می‌دهد به طوری که استخراج می‌تواند در مدت زمان کوتاهی به پایان برسد.

۲-۶- روش تخمیر

این روش شامل استفاده از آنزیم‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های موجود در جو یا آنزیم‌هایی است که در منابع طبیعی برای کمک به فرآیندهای استخراج وجود دارد. استخراج ماده رنگزای نیل بدین روش رایج‌ترین نمونه از این نوع استخراج است. تخمیر، زمانی شروع می‌شود که برگ‌ها و شاخه‌های تازه برداشت شده در دمای اتاق در آب خیس می‌شوند. در طی این فرآیند، نیل بی‌رنگ حاوی گلوکوزید (اندیکان) موجود در برگ‌ها توسط آنزیم ایندیمولسین موجود در برگ‌ها به گلوکز و ایندوکسیل تجزیه می‌شود. تخمیر در حدود ۱۰-۱۵ ساعت تکمیل می‌شود و سپس محلول زرد حاوی ایندوکسیل به مخزن‌های خمی منتقل می‌شود که در آنجا ایندوکسیل توسط هوا اکسید می‌شود و به نیل نامحلول آبی رنگی تبدیل می‌شود که ته نشین شده است. سپس، جمع‌آوری و شسته می‌شود و پس از برداشتن آب اضافی به صورت خمیر درمی‌آید. این روش مشابه روش استخراج آبی است اما برای افزایش دما نیازی به حرارت ندارد. معایب این روش، زمان طولانی استخراج طولانی و بوی بد است [۵].

۳- معرفی گیاهان نیل و وسمه

نیل: تاریخ دقیق استفاده از گیاه نیل نامشخص است، با این حال باستان‌شناسان بر این باورند که زیستگاه ابتدایی گیاه نیل سرزمین پهناور هند است که به دوره وداها در این سرزمین باز می‌گردد [۶]. از دیگر نمونه‌های مطالعات باستان‌شناسی می‌توان به تمدن مصر باستان که استفاده از نیل در آن به ۲۴۰۰ ق.م باز می‌گردد، اشاره کرد [۱۰، ۳]. این گیاه درختچه‌ای است از تیره‌ی پروانه‌واران و دارای برگ‌های مرکب شانه‌ای پوشیده از کرک که اغلب مخالف جهت هم می‌باشند، گل‌های آن سفید، صورتی یا ارغوانی هستند که دارای آرایش خوشه‌ای یا سنبله‌ای و میوه آن شبیه به نخود فرنگی است. نیل گیاهی دو ساله است و در اوایل بهار یا پاییز کشت می‌شود. آب و هوای مناسب برای کاشت آن گرم و مرطوب است و در مناطق گرمسیری کشت می‌شود [۱۷]. ایندیگوفر متشکل از هشتصد گونه است. بیش از ششصد گونه در آفریقا، حدود دویست گونه در آسیا، هشتاد گونه در آمریکا و شصت گونه در استرالیا یافت شده است؛ که در میان گونه‌های متنوع آن گیاه نیل مهم‌تر است و رنگ‌دهی

بیشتری دارد [۳، ۸]. شکل ظاهری گیاه نیل در شکل ۱ نشان داده شده است.

رنگرزی و استفاده از گیاه نیل تا قرن‌ها مختص کشورهای آسیایی بود تا اینکه در قرن پانزدهم میلادی به اروپا راه یافت که در ابتدا آن را به عنوان سنگ معدنی می‌شناختند و به سنگ هندی شهره بود در ابتدا از آن به عنوان جوهر استفاده می‌کردند و رنگرزان کمی از آن را در خمره رنگرزی با وسمه مخلوط می‌کردند [۹].

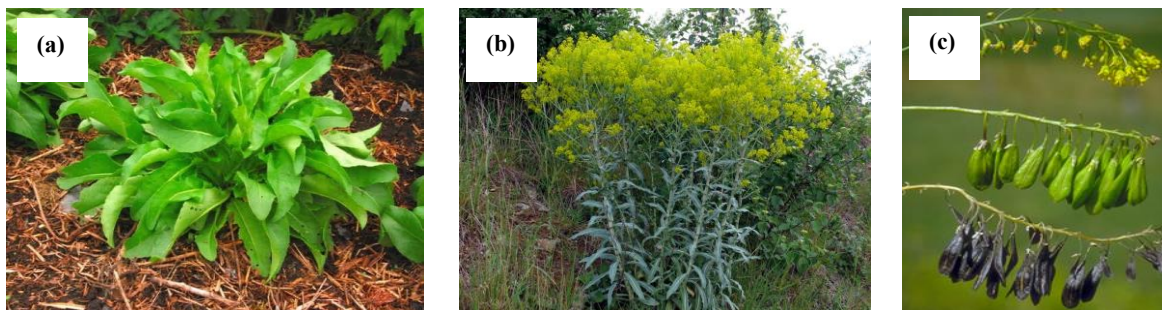
وسمه: گیاهی با سابقه تاریخی طولانی می‌باشد که در اروپا بسیار مشهور بوده و علاوه بر رنگرزی مصارف دارویی نیز داشته است [۱۱، ۱۰]. طبق مستندات تاریخی، استفاده از وسمه در اروپا به عصر آهن (۸۵۰-۳۵۰ پیش از میلاد) و حتی دورتر از آن، به عصر برنز (۱۵۰۰-۱۱۰۰ پیش از میلاد) باز می‌گردد [۱۴-۱۲]. در ابتدا از رنگ آبی حاصل از گیاه وسمه به عنوان لوازم آرایشی، رنگ کردن پوست بدن با فن تتو و نیز برای التیام جراحات‌ها در جنگ‌ها استفاده می‌شده است. رنگ آبی حاصل از وسمه در مناطقی چون سرزمین سلت‌ها در بریتانیا تا جنوب سیبری همچنین شرق مدیترانه و مصر رایج بود [۱۵]. رنگرزان قرون وسطی از وسمه به عنوان رنگی پایه برای ساخت رنگ‌های متنوع بهره می‌بردند [۱۶]. وسمه گیاهی است دوساله، از خانواده شب بو، که از برگ آن ماده آبی رنگ استخراج می‌شود [۳، ۷]. گیاه وسمه اغلب در زمین‌های خشک، سنگی یا شنی می‌روید. قلمرو رشد و نمو گیاه وسمه بسیار گسترده است و اروپای مرکزی و کشورهای حوزه مدیترانه، سرتاسر روسیه و آسیای غربی و مرکزی تا چین و ژاپن را در بر می‌گیرد. در تبت و افغانستان به صورت وحشی و اهلی کاشت می‌شود و در شمال آفریقا و آمریکا می‌روید [۱۷]. وسمه در زبان انگلیسی معروف به وود^۱ می‌باشد [۳]. شکل ظاهری گیاه وسمه با سنبلین مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: گیاه نیل.

Figure 1: indigo plant.

¹ Woad



شکل ۲: (a) گیاه وسمه یک ساله، مناسب برای استخراج رنگ آبی، (b) گیاه وسمه دو ساله، نامناسب برای استخراج رنگ آبی، (c) بذر گیاه وسمه، در اواخر تابستان تیره می‌شود و آماده برداشت است.

Figure 2: (a) A one-year woad plant, suitable for extracting blue dye, (b) A two-year-old woad plant, unsuitable for extracting blue dye, and (c) The seeds of the woad plant turn to dark in late summer and are ready for harvest.

در گونه‌های متفاوت گیاهان ایندیگو وجود دارد ایندیکان می‌باشد. درصد وجود این ماده باعث ایجاد رنگ آبی پایدار به مقدار مناسب می‌باشد. نیل جزء گیاهانی است که ایندیکان آن به مقدار مناسب وجود دارد [۲۲].

۳-۲- تاریخچه فرآوری گیاهان وسمه و نیل

وسمه: در قرون وسطی تا حدود قرن ۱۶ میلادی، رنگ آبی و تجارت وسمه بسیار حائز اهمیت بوده است. در حفاری‌های باستان‌شناسی در سال ۱۸۲۸ میلادی در شهر تبس مصر، مجموعه‌ای از دستورات عمل‌های قدیمی مربوط به قرون اول تا سوم میلادی کشف شد که در آن نحوه استفاده از وسمه نیز بیان شده است. در این مجموعه که معروف به پاپیروس هلمنسیس^۶ می‌باشد روش استخراج ماده رنگزا از گیاه وسمه نیز بیان شده است. طبق این نسخه برگ‌های چیده شده وسمه را ریز کرده و آن‌ها را با لگدکوب کردن جابجا می‌کردند تا جریان هوا آن‌ها را خشک کند. وسمه‌های خشک شده کول^۷ نام داشت که آن‌ها را انبار می‌کردند. حدود ۲۵ کیلو از کول‌ها را در ظرفی به گنجایش ۶۰۰ لیتر قرار داده و ظرف را مملو از اوره می‌کردند. سپس آن را به مدت ۳ روز زیر نور خورشید قرار می‌دادند تا به آرامی گرم شود. یک سوم از محتویات ظرف را در پاتیل ریخته و زیر آن آتش روشن کرده و آن را به آرامی و پیوسته هم می‌زدند هنگامی که ماده رنگزا جدا شد یعنی حرارت لازم را دیده پس آتش را خاموش می‌کردند. سپس نیم کیلو صابون^۸ به پاتیل اضافه کرده و ظرف را گرم نگه می‌داشتند به گونه‌ای که جوش نیامده یا سرد نشود. پاتیل را به مدت سه روز در این وضع قرار می‌دادند. سپس آن را به جوش آورده و پشم شسته شده را به آن اضافه کرده عملیات رنگرزی را انجام می‌دادند.

۳-۱- ساختار شیمیایی گیاهان نیل و وسمه

وسمه: در دهه‌ی ۱۸۵۰ میلادی شیمیدان انگلیسی به نام ادوارد شانک^۱ در تحقیقاتش پیرامون ایندیگو، از مرغوب‌ترین دانه وسمه فرانسوی گیاه وسمه را پرورش داد و با استفاده از اتانول سرد، ماده‌ی پیش‌ساز ایندیگو را از برگ‌های وسمه جدا کرده و آن را ایندیکان^۲ نامید که بسیار ناپایدار بود [۳]. تحقیقات بسیاری که در اوایل قرن بیستم بر روی وسمه انجام گرفت نشان داد که ایندیکان کشف شده توسط شانک که از برگ‌های وسمه به دست آمده بود با ایندیکان موجود در سایر گیاهان حاوی ایندیگو متفاوت است. ازین رو پیش‌ساز ایندیگو در وسمه ایساتان بی^۳ نام گذاری شد. تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۰۰ میلادی حاکی از آن است که در وسمه علاوه بر ایساتان بی، ایندیکان نیز وجود دارد [۱۸]. تحقیق انجام گرفته در سال ۲۰۰۱ میلادی بیان داشت که در برگ‌های جوان وسمه که در اواخر بهار برداشت می‌شود، علاوه بر پیش ماده‌های ایندیکان و ایساتان بی، پیش ماده ی دیگری وجود دارد که آن را ایساتان سی^۴ نام نهادند [۱۹]. تحقیق انجام گرفته در سال ۲۰۰۴ میلادی پیش ماده ی دیگری در وسمه را با نام ایساتان ای^۵ معرفی می‌کند [۲۰]. ساختار شیمیایی مواد تشکیل دهنده ماده رنگزای وسمه در شکل ۳ نشان داده شده است.

آنچه که وسمه را از انواع گونه‌های ایندیگوفر متمایز می‌سازد، ماده ای به نام ایساتان بی می‌باشد. این ماده مختص وسمه است و همراه با ایندیکان در وسمه وجود دارد که در اثر آبکافت تشکیل ایندوکسیل می‌دهد. دو مولکول از ایندوکسیل در معرض هوا با یکدیگر ترکیب شده و ایندیگو را می‌سازند [۲۱]. مراحل تشکیل ساختار ایندیگو در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. ماده‌ای که

¹ Edward Schunk

² Indican: (indoxyl-β-D-glucoside)

³ Isatan B: (indoxyl-5-ketogluconate)

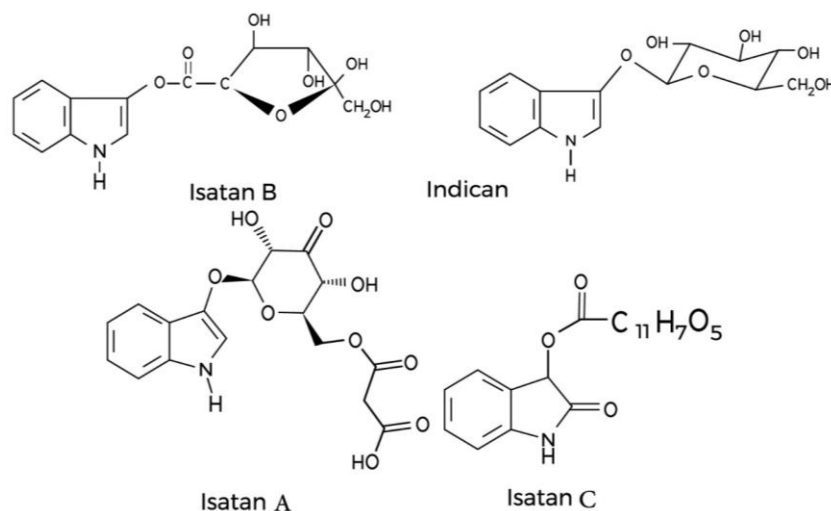
⁴ Isatan C

⁵ Isatan A: (1H- indol-3-yl6-o(carboxyacetyl) -β-D-ribohex-3-ulopyranoside)

⁶ Papyrus Holmiensis

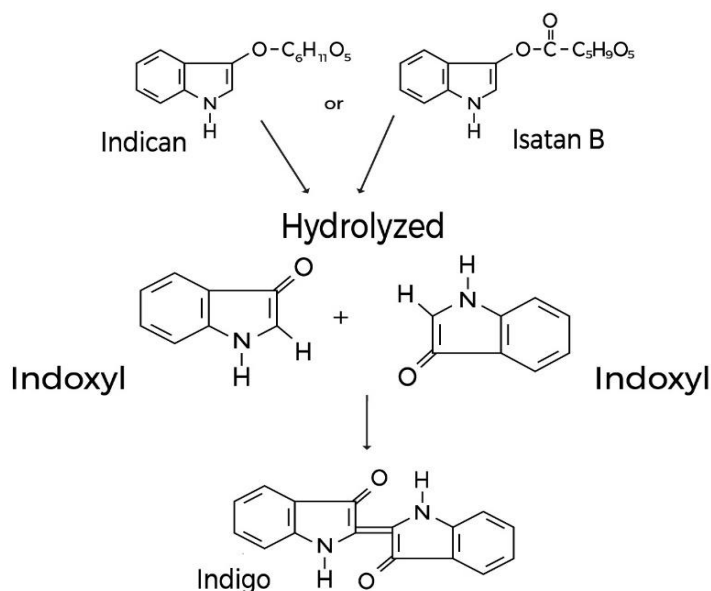
⁷ Kole

⁸ Soap weed



شکل ۳: ایندیکان، پیش ماده موجود در وسمه و نیل، ایساتان بی، پیش ماده موجود در وسمه، ایساتان سی، پیش ماده موجود در وسمه و ایساتان ای، پیش ماده موجود در وسمه [۱۸].

Figure 3: Indican, the precursor found in woad and indigo. Isatan B, the precursor in woad. Isatan C, the precursor in woad. Isatan A, the precursor in woad [18].



شکل ۴: چگونگی تبدیل isatan b به indigo در وسمه برای رسیدن به رنگ آبی [۲۱].

Figure 4: How to convert isatan b to indigo in woad to get blue color [21].

تابستان، چیده می‌شدند. برگ‌ها را در آسیاب‌های مخصوص وسمه خرد می‌کردند تا به صورت خمیر درآید سپس خمیر حاصل را با دست به شکل توپ‌هایی تقریباً بزرگ، شکل می‌دادند. این توپ‌ها به توپ سبز (گرین بال^۲) معروف بود. توپ‌های وسمه را بر روی الوارهای الوارهای چوبی قرار می‌دادند تا اولین مرحله تخمیر انجام شده و

سپس حمامی از یک کیلو اورسیلیک^۱ درست کرده آن را جوشانده و پشم رنگ شده را در آن قرار می‌دادند و در آخر آن را در آب نمک شست و شو می‌دادند. از حمام رنگ مزبور تا زمان رمق‌کشی کامل می‌توان برای رنگ‌ریزی بهره برد [۲۳]. روش معمول در این دوره به این گونه بود که برگ‌های پهن و سبز وسمه در اواخر

² Green ball

¹ Archil

قرار می‌دهند. تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که برگ‌های سبز و تازه نیل از نظر تولید و استخراج ایندیگو بسیار غنی‌تر از برگ‌های خشک شده نیل هستند [۲۹]، سپس روی برگ‌ها را با چوب‌های سنگین می‌پوشانند و درون حوض را از آب پر می‌کنند تا روی برگ‌ها کاملاً مملو از آب باشد. پس از چند ساعت، تخمیر برگ‌ها شروع می‌شود، نشانه این تخمیر نیز کف کردن روی سطح آب است. در این زمان دی اکسید کربن و اکسیژن از برگ‌ها متصاعد می‌شود. آب سطح حوض ابتدا به رنگ زرد و سپس سبز تغییر می‌کند. پس از تکمیل تخمیر، برگ‌ها را از آب بیرون آورده و مایع درون حوض را به سرعت به هم می‌زنند تا اکسیژن هوا با محلول ترکیب شود. با این عمل رنگ مایع درون حوض آبی پررنگ می‌شود. در پایان، ایندیگو به شکل رسوب ته‌نشین می‌گردد. گاهی نیز برای سرعت بخشیدن به رسوب ماده رنگزا، کمی سود یا آمونیاک به آن می‌افزایند [۴۱، ۴۰]. استخراج ماده رنگزا از نیل به روش بیان شده صورت می‌گیرد که همان روش تخمیر است در این زمینه آزمایش‌ها و تحقیقات بیشماری صورت گرفته است که در آن‌ها دمای آب و مقدار pH محیط که در میزان ایندیگو استخراجی موثر است ارزیابی شده اند [۴۶-۴۲].

۴- خصوصیات نیل و وسمه در حمام رنگ

مواد رنگزای حاوی ایندیگو از خانواده مواد رنگزا خمی هستند که کاربرد وسیعی روی الیاف پشم دارند. بنابراین در حالت کلی باید آن‌ها را ابتدا با استفاده از یک احیاکننده، محلول و سپس جذب لیف و آن‌گاه مجدداً نامحلول کرد. الیاف پشم دارای ساختمان پروتئینی هستند و از آمینواسیدها تشکیل شده‌اند. در نتیجه ساختار داخلی مقاومی در مقابل محیط‌های قلیایی ندارند و در این محیط استحکام خود را از دست می‌دهند. در نتیجه شرایط رنگرزی کالای پشمی به گونه‌ای است که باید از قلیایی ضعیف‌تر مانند آمونیاک یا کربنات سدیم بهره برد [۴۸، ۴۷].

۵- مروری بر تحقیقات پیشین براساس روش استخراج

۵-۱- استخراج ماده رنگزا از گیاه نیل

در تحقیقی هری پرناما^۳ و همکارش [۴۹]، تاثیر آماده‌سازی اولیه گیاه نیل را در تولید ماده رنگزای ایندیگو بررسی کرده‌اند. متغیرهای این آزمایش، مدت زمان خیساندن و همچنین تاثیر میزان آهک بر مقدار جذب بوده است. برگ‌های گیاه نیل در آب سرد، آب گرم و آب سرد بعد از آسیاب کردن گیاه به مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت خیسانده شده‌اند. ۲۰، ۲۵ و گرم اکسید کلسیم نیز میزان

آن‌ها خشک شوند. بعد از گذشت حدود یک هفته، آن‌ها را آسیاب می‌کردند. پودر وسمه حاصل به شکل توده بر روی هم انباشته شده و مرحله دوم تخمیر با افشاندن آب روی توده وسمه انجام می‌گرفت. در حال انجام تخمیر، توده وسمه به خودی خود کم کم گرم می‌شد. بعد از حدود دو هفته و انجام عملیات تخمیر، وسمه‌ها کاملاً خشک شده و انبار می‌شد. پودر وسمه به دست آمده مستقیماً برای انجام رنگرزی مناسب نبود و برای رنگرزی احتیاج به عملیات شیمیایی به منظور آزاد کردن رنگ داشت. در نتیجه پودر حاصل را دوباره تخمیر می‌کردند [۲۵، ۲۴، ۲۱، ۱۶، ۱۵، ۱۳]. در ژاپن به منظور تهیه رنگ آبی از گیاه پلی گنیوم تینکتوریوم^۱ استفاده می‌شود. این گیاه به وسمه ژاپنی معروف است. شیوه کار آن‌ها همانند استخراج ایندیگو از وسمه در اروپاست. در ژاپن برخلاف اروپا، برگ‌ها را آسیاب نمی‌کردند بلکه آن‌ها را ریز کرده و ساقه‌ها را جدا می‌نمودند و از ساقه‌ها به منظور کود کشاورزی بهره می‌بردند. آنچه که بسیار حائز اهمیت است استفاده از برگ‌های تازه و مرغوب به منظور استخراج ماده رنگزاست [۲۶]. برگ‌های ریز شده را در سایه پهن کرده تا خشک شوند، توده برگ‌های پهن شده سوکومو^۲ نامیده می‌شد. هر ۵ روز یک بار توده‌های سوکومو آب پاشی شده تا عملیات تخمیر به خوبی انجام پذیرد. پس از گذشت ۳ ماه سوکوموها خشک، سفت و سیاه شده و عملیات تخمیر و آماده‌سازی به پایان می‌رسید. تحقیقات بسیاری در زمینه استخراج و استفاده بهینه از وسمه انجام گرفته است؛ مطالعات انجام شده در سال ۱۹۹۲ بیان می‌دارد که به منظور استخراج ایندیگو از گیاه وسمه بهتر است برگ‌های گیاه به مدت چند دقیقه در آب جوش قرار گیرد سپس به دمای محیط رسانده و با اضافه کردن آمونیاک عملیات هوادهی انجام پذیرد. این روش به "آب گرم" یا روش پاکیزه معروف است [۲۷]. در سال ۱۹۹۹ مطالعه انجام شده نشان داد که یک باکتری عامل احیا ایندیگو در فرآوری وسمه به روش قرون وسطی یعنی خشک کردن توپ‌های وسمه و عملیات تخمیر می‌باشد [۲۸]. طی سال‌های گذشته محققان بسیاری روش جدید استخراج ماده رنگزا از گیاه وسمه را که همان شیوه آب گرم است مورد مطالعه و آزمایش قرار داده و عوامل گوناگون این شیوه را مطالعه کرده‌اند. گیاه وسمه را در مقیاس‌های متنوع با عوامل متعددی از جمله دما، زمان گرمادهی، زمان و دمای خنک کردن، pHهای گوناگون که از جمله عوامل تاثیرگذار در نتیجه می‌باشند، را مورد ارزیابی قرار دادند [۳۸-۲۷].

نیل: در اوایل بهار کشت و در اواخر بهار چیده می‌شود. در قدیم ابتدا برگ‌های نیل را خشک می‌کردند و هنگامی که به رنگ سیاه درآمد برگ‌ها را از شاخه جدا کرده و در حوض‌های چوبی یا سیمانی قرار می‌دادند. در حال حاضر برگ‌ها را به صورت تازه و سبز در حوض‌ها

¹ Polygonum tinctorium

² Sukumo

³ Purnama H

متغیر آهک بوده و همینطور اکسیدشدن به وسیله هواکش و به مدت ده دقیقه در محلول انجام گرفته است. سپس ۲۴ ساعت به محلول اجازه رسوب داده‌اند و پس از آن صاف کردن انجام شده تا خمیر نیل آماده استفاده شود. تجزیه و تحلیل کیفیت ماده رنگزای تولید شده با استفاده از دستگاه طیف‌سنج انجام و نشان داده شد که شرایط اولیه بر وزن خالص خمیر تولید شده تأثیر می‌گذارد. هر چه مدت خیساندن بیشتر باشد، وزن خالص حاصل از نیل نیز بیشتر است. در واقع این مطالعه نشان می‌دهد، عملیات غوطه‌وری زودهنگام گیاه در آب سرد به مدت ۴۸ ساعت نسبت به قرار دادن در آب گرم یا آسیاب کردن آن، عملکرد بهتری دارد. بیشترین زمان تخمیر باعث می‌شود میزان باکتری در محلول بیشتر شود و شرایط هوازی باکتری‌ها به دلیل درجه حرارت، زمان تأمین شده و pH، توسط مواد مغذی به بهترین حالت خود برسند. برعکس هنگامی که زمان تخمیر کمتر است، فرآیند تخمیر کامل انجام نشده و باکتری‌های موجود در آن نیز کمتر خواهد بود، به طوری که تعداد برگ‌های در حال پوسیدگی نیز کاهش می‌یابد. اگر زمان تخمیر طولانی شود، رنگ محلول نیز از حالت سبز، به قهوه‌ای مایل به زرد تغییر می‌کند و بوی بدی می‌دهد. در این مطالعه بهترین زمان خیساندن با آب معمولی به مدت ۴۸ ساعت بود. از نظر دمای محلول، (دمای اتاق حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد) احتمالاً دمای ثابت آب سرد است که به ساختار مولکول‌های مواد رنگزا روی برگ‌ها آسیب نمی‌رساند و باکتری‌ها را زنده نگه می‌دارد و همین‌طور آنها به حالت هوازی می‌رسند و در نتیجه عملکرد بهتری دارند و فرآیند تخمیر در حد بیشینه خود انجام می‌شود. طبق آزمایش‌های کیفی که با استفاده از دستگاه طیف‌سنج انجام شد، منحنی کالیراسیون نشان می‌دهد که هر چه غلظت ماده رنگزای ایندیگو بیشتر باشد، مقدار جذب آن نیز بیشتر خواهد بود که البته مقدار جذب، تحت تأثیر مدت خیساندن نیز می‌باشد. نتایج نشان داد، بیشترین میزان جذب ۱/۶۹۸ با خیساندن یک کیلوگرم برگ تازه گیاه نیل، به مدت ۴۸ ساعت، ۵ لیتر آب و افزودن ۱۵ گرم آهک حاصل شد.

هدایتی^۱ و همکارانش [۵۰] به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج گیاه نیل تحقیقی انجام دادند. در این تحقیق که به منظور تولید ماده رنگزای آبی درخشان انجام شده بود، از دو روش خیساندن و جوشاندن برای استخراج گیاه نیل بهره گرفته بودند. متغیرهای این آزمایش در روش خیساندن، مدت زمان خیساندن و در روش جوشاندن، درجه حرارت‌های متفاوت بود؛ همچنین تأثیر میزان pH نیز در هر دو روش با دو pH ۱۱ و ۱۳ بررسی می‌شود. میزان ماده رنگزای ایندیگو نیز با استفاده از طیف‌سنج در طول موج ۶۱۱ نانومتر اندازه‌گیری شد. در روش خیساندن، مقدار مشخصی از گیاه نیل به

منظور تخمیر در مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در آب قرار داده شد. پس از اینکه محلول تخمیر صاف شد، آهک به محلول اضافه شد و سپس به طور متناوب بین ۱۰ تا ۱۵ دقیقه هم زده و در تماس با اکسیژن قرار گرفت تا به رنگ آبی درآید. پس از اینکه اکسید کلسیم به منظور افزایش pH به محلول اضافه شد، محلول نیل در دمای اتاق به مدت ۲۰ ساعت استراحت داده و سپس برای بدست آوردن خمیر (رسوب) نیل صاف شد. در روش حرارت بالا، گیاه نیل در دماهای بین ۶۰ تا ۷۰، ۷۰ تا ۸۰ و ۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از آن تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد سرد و سپس صاف شدند، پس از آن مشابه روش خیساندن عمل شد. در روش خیساندن، بیشترین جذب در ۴۸ ساعت و کمترین آن ۱۲ ساعت بود در حالی که زمان ۲۴ ساعته تفاوت معنی داری با ۳۶ ساعت نداشت. این نشان می‌دهد که طول مدت خیساندن باعث افزایش جذب محلول ایندیگو می‌شود که به دلیل محتوای بالای ایندوکسیل است. در این آزمایش، بیشترین میزان ماده رنگزای نیل بدست آمده در ۴۸ ساعت خیساندن و pH=۱۱ بدست آمده است. بیشترین جذب در روش جوشاندن در دمای ۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد با میانگین جذب ۰/۷۵۶ به دست آمد در حالی که در دمای ۸۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی داری با دمای ۸۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد نداشت. این نتیجه توضیح می‌دهد که دمای جوش به طور مستقیم با جذب محلول متناسب است و همچنین دیده شد که خمیر نیل بدست آمده از روش خیساندن نسبت به روش جوشاندن، آبی پر رنگ‌تر با سطح تابش بهتری داشت. در مطالعه‌ای احمدی و همکارانش [۵۱] به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج ماده رنگزا که به روش آب گرم انجام شده بود، تأثیر روش‌های خشک کردن گیاه، میزان pH حمام (از ۷/۵ تا ۱۱)، زمان استراحت محلول و درجه حرارت را بر میزان استخراج ایندیگو مورد آزمایش قرار دادند. در استخراج به شیوه آب گرم در این پژوهش، کربنات سدیم به میزان لازم را در ۳۰ میلی لیتر آب جوش حل و سپس به آرامی خنک نمودند (مقدار کربنات سدیم در طول آزمایشات متغیر در نظر گرفته شد تا بهترین مقدار مشخص گردد). ۵ گرم پودر گیاه نیل خشک را درون بشر ریخته و ۷۰۰ میلی لیتر آب با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به آن افزودند و حدود ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. سپس بشر را بیرون آورده و در ظرف پر از یخ قرار دادند تا دما به سرعت پایین آید. وقتی دما به حدود ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید، محتویات بشر را از صافی حریر عبور داده و پودر نیل جدا شد. در این زمان محلولی به رنگ قهوه‌ای تیره بدست آمد. هنگامی که دمای مایع مزبور به حدود ۴۹ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید، حدود ۸ درصد کربنات سدیم به آن اضافه شد. در این زمان محلول احتیاج به اکسیژن دارد. حدود ۱۰ دقیقه با استفاده از هم‌زن الکتریکی فرآیند اکسیژن‌دهی به محلول را انجام دادند. محلول چند

^۱ Hidayati

نتایج به دست آمده درمورد شرایط خشک کردن گیاه (جدول ۲) حاکی از آن است که میزان ایندیگوی استخراج شده از برگ‌هایی که با دستگاه میکروویو خشک شده و سپس با روش آب گرم مورد آزمایش قرار گرفتند، بیشترین مقدار می‌باشد. همچنین به منظور افزایش بازده استخراج، دمای گرمادهی ۸۰ درجه سانتی‌گراد و هوادهی به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و نمونه آزمایش محلول رنگی نیز هفت روز ثابت و بی حرکت ماند.

در یک ارزیابی مقایسه‌ای، از چهار روش مختلف برای استخراج گیاه نیل به منظور ارزیابی کیفی و کمی استفاده شد. چهار روش استخراج شامل روش مرسوم، میکروبی، آب گرم و شیمیایی به همراه هفت مدت زمان مختلف برای تخمیر (۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ ساعت) در نظر گرفته شده بود [۵۲]. در روش سنتی، گیاه نیل (۱۲۰ روزه) به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد، سپس عملیات هوادهی انجام شد. پس از آن به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دید و سپس صاف و خشک گردید. برای روش آب گرم، آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با آب سرد مخلوط شده تا به دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد رسید. در روش میکروبی^۱ که میکرو ارگانیسم‌های موثر هستند فعال شد. برای روش شیمیایی، گیاهان به مدت ۴ ساعت در حجم ۱۰ لیتر آب در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد خیسانده و عصاره‌ها به مدت ۲۴ ساعت در مخزن خیساندن نگهداری شدند.

^۱ EM

ساعتی در سایه قرار گرفته و سپس توسط صافی حریر، ماده رنگزا جدا شده و برای رنگرزی استفاده شد. در تمام آزمایش‌ها: وزن نیل ۲۵ گرم، زمان گرمادهی و هوادهی ۱۰ دقیقه، میزان آب ۷۰۰ میلی‌لیتر و دمای آب را ۸۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفتند. نتایج نشان داد برای رسیدن به نتیجه مطلوب، زمان قرارگیری نمونه‌ها در سایه و در مکانی ثابت حائز اهمیت است، در نتیجه برای تعیین pH مناسب، نمونه‌ها (حمام استخراج ماده رنگزا) به مدت هفت روز به صورت بی‌حرکت و ثابت در سایه قرار داده شدند. همچنین مقدار ماده رنگزای استخراج شده با افزایش pH زیاد شده و تا $pH = 9$ این افزایش ادامه دارد، اما بعد از آن راندمان استخراج، سیر نزولی پیدا کرده و مقدارش کم می‌شود. بیشترین میزان ایندیگو در $pH = 9$ به دست آمد. همچنین نتیجه پژوهش نشان می‌دهد که بیشترین مقدار ایندیگو در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حاصل شده و مقدار ماده رنگزا در دمای نزدیک به جوش به شدت کاهش یافته است، احتمالاً دمای جوش سبب تجزیه شکل ایندیکان در گیاه نیل شده باشد و همین‌طور مشاهده شد که افزایش زمان گرمادهی نیز سبب افت بازده استخراج شده است. همان‌طور که نتایج گزارش شده در جدول ۱ نشان می‌دهد، بیشترین میزان ماده رنگزا با ده دقیقه هوادهی پیوسته که با دستگاه همزن برقی انجام گرفت حاصل شده و افزایش زمان هوادهی تا ۱۲۰ دقیقه تاثیری در افزایش میزان استخراج ماده رنگزا نداشته و سبب کاهش آن نیز شده است. همچنین نتایج آزمایشات نشان داد بیشترین مقدار ماده رنگزا در مدت زمان ۱۰ دقیقه و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، گرمادهی حاصل و برابر با ۰/۱۵۶ گرم بود.

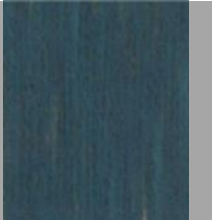
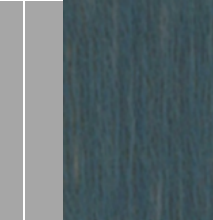
جدول ۱: میزان ایندیگوی استخراج شده از برگ خشک نیل، بررسی تاثیر متغیر زمان هوادهی [۵۱].

Table 1: The indigo content extracted from dried indigo leaves, check the effect of variable aeration time [51].

Sample	1	2	3	4
Aeration time (minutes)	10	30	60	120
Indigo content (g)	0.156	0.132	0.130	0.125

جدول ۲: تاثیر شرایط خشک کردن بر فام رنگی و میزان استخراج ماده رنگزا [۵۱].

Figure 2: The effect of drying conditions on the color hue and the content of dye extraction [51].

Drying conditions of the indigo plant	Sun	Shadow	Microwave Power 100%	Oven with a temperature of 45 C
Content of indigo extracted (g)	0.068	0.054	0.085	0.046
Dyed fibers				

رنگزا از طریق روش میکروبی است.

در سال ۲۰۱۹، پوتری^۱ و همکارانش [۴۳] مطالعه‌ای به منظور مشخص کردن تعیین سطح پایداری ماده رنگزای ایندیگو در برابر چندین دما و pH های مختلف انجام دادند. در این آزمایش، استخراج از برگ‌های نیل به روش تخمیر انجام شد؛ برگ‌های نیل را به مدت ۲۴ ساعت خیساندند و سپس لایه بالایی زرد رنگ را برداشتند و لایه زیرین آبی رنگ به عنوان ماده رنگزای طبیعی ایندیگو گرفته شد. pH محلول با اضافه کردن سود و اسید کلریدریک تنظیم گردید. محققین بیان داشته‌اند، تاثیر pH مهم‌ترین عامل در ایجاد ماده رنگزای ایندیگو می‌باشد و رنگ‌های نیل بسته به شرایط pH دارای چهار رنگ مختلف می‌باشند. ایندیگوتین و اشکال غیریونی احیا شده در pH زیر ۹ تا ۹/۵ هستند. pH بیش‌تر از ده در ساختارهای غیریونی به شکل مونو فنولیک کاهش یافته و تقریباً تمام مولکول‌های نیل در pH حدود ۱/۵، مونو فنولیک تشکیل می‌دهند. هرچه pH قلیایی‌تر خیمیر نیل بیشتر باشد، رنگ آبی غلیظ‌تری تولید می‌شود. تنظیم pH محلول می‌تواند شرایط فرآیند را ثابت نگه دارد، زیرا pH محلول مناسب باعث ایجاد رنگ نیلی مناسب می‌شود. هر چه pH خیمیر نیل بیشتر آبی شود، pH اسیدی رنگ بنفش شفاف‌ی ایجاد خواهد کرد.

در شکل ۵، مقدار جذب ایندیگو از ۰/۰۲ تا ۰/۱۰۳۲ دیده می‌شود که بیشترین میزان جذب (۰/۱۰۳۲) روی pH ۱۴ است. افزایش مقدار pH منجر به مقدار جذب بالاتر شد اما این در حالی است که در فرآیند تخمیر گیاه نیل، محلول اسیدی باعث عصاره‌ی بیشتر نیل می‌شود که به دلیل اسیدهای قوی می‌باشد که پروتون‌های (H^+) آزاد می‌کنند و به طور کامل بر شکستن پیوندهای گلیکوزید تاثیر می‌گذارد، سپس گلوکوزیدها به ایندوکسیل و گلوکز تجزیه می‌شوند و ایندوکسیل تولید شده به ایندیگو اکسید می‌شود. در نتیجه، هرچه گلوکزید ایندیکان بیشتر به ایندوکسیل و گلوکز تجزیه شود، ایندیگوی بیشتری تولید خواهد شد.

^۱ Putri

محلول آمونیاک غلیظ و کلسیم ۱/۵ گرم در لیتر به آن اضافه و به نیل اجازه داده شد تا ۲۴ ساعت ته نشین شده و در آب باقی بماند. سپس رسوب جمع‌آوری و از طریق یک پارچه پنبه‌ای صاف شد. پس از خشک شدن در کوره با دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد و سرد شدن تا دمای اتاق، مقدار نیل خام وزن شد. داده‌های مربوط به تغییر pH در این مطالعه نشان می‌دهد طول مدت تخمیر باید با توجه به روش استخراج تغییر کند. همچنین، تاثیر pH بر مدت زمان تخمیر و روش انجام آن نیز بسیار قابل توجه است. کمترین میزان pH مربوط به روش میکروبی و بیشترین آن مربوط به روش مرسوم است. این در حالی است که در بین روش‌ها، روش میکروبی فقط ۱۲ ساعت طول کشید تا به مرحله تخمیر خوب برسد (رنگ سبز مایل به آبی محلول بیانگر کیفیت تخمیر بود)، افزایش سرعت تخمیر در یک دوره کوتاه (۱۲ ساعت) همانطور که در روش میکروبی مشاهده شد احتمالاً به دلیل میکروارگانیسم‌ها موجود در کشت EM بوده که بیانگر مقادیر بهینه pH و مدت زمان تخمیر بکار گرفته شده است. همانطور که نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد، از بین چهار روش استخراج، بیشترین میزان ایندیگو براساس میانگین (۲/۶۵ درصد) در روش میکروبی ثبت شد و از نظر آماری نسبت به سایر روش‌ها برتری داشت. درواقع روش میکروبی نه تنها عملکرد و کیفیت را افزایش داد، بلکه مدت زمان استخراج را نیز کم کرد. پس از ۲۰ ساعت تخمیر، به جز روش میکروبی، سایر روش‌ها روند کاهشی را در میزان ایندیگو نشان دادند. این ممکن است به دلیل تخمیر بیش از حد محلول باشد که ایندوکسیل را آزاد نمی‌کند و تخمیر بیش از حد باعث کیفیت پایین فرآیند شده است. روش میکروبی بدلیل مشارکت فعال میکروفلور در طی فرآیند تخمیر بهینه‌ترین روش برای استخراج در این آزمایش معرفی شد. در واقع میکروفلورها در بخش شکستن رده‌های سلولی آزادکننده‌ی ایندیکان، از قسمت قند به ایندوکسیل جدا و بعد با مولکول اکسیژن ترکیب می‌شوند و در نهایت به ماده رنگزای ایندیگو تبدیل می‌شوند. همچنین با توجه به میزان بازیابی ماده رنگزا و مقدار آن در این تحقیق، بالاترین عملکرد ایندیگو در مدت زمان تخمیر ۱۲ ساعته، به نفع فعالیت همه عوامل در جهت تولید ماده

جدول ۳: تأثیر روش‌های مختلف استخراج و مدت تخمیر بر میزان درصد ایندیگو [۵۲].

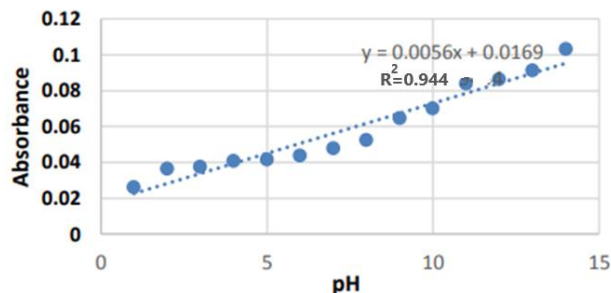
Table 3: Influence of various extraction methods and duration of fermentation on indigo conten [52].

Method	4 hours	8 hours	12 hours	16 hours	20 hours	24 hours	Mean
Conventional	0.45	0.57	0.68	1.37	1.84	1.73	1.69
Microbial	0.79	1.96	2.58	2.69	2.78	2.95	2.65
Hot water	0.51	1.67	1.93	2.19	2.63	2.41	2.48
Chemical	0.36	0.65	0.97	1.26	1.74	1.49	1.88
Mean duration of fermentation	0.53	1.21	1.54	1.88	2.32	2.14	

برد که البته آن را گران‌تر نیز خواهد کرد. مقایسه بین زمان صرف شده نیز حائز اهمیت است؛ فرآیند در خمره قرار دادن با هیدروسولفیت به تخمیر حدود ۱۰ تا ۱۵ دقیقه نیاز دارد، اما فرآیند تخمیر با شکر قهوه‌ای به بیش از یک روز نیاز دارد تا بتوان از ماده برای رنگرزی استفاده کرد. بنابراین روش شیمیایی می‌تواند در زمان و هزینه صرفه‌جویی کند اما با توجه به سریع و ارزان تر بودن، نباید این نکته فراموش شود که هیدروسولفیت سدیم حاوی مواد خطرناکی است که خورنده، سرطان‌زا و حتی جهش‌زا هستند و اگر دفع زباله آنها به روش صحیح انجام نشود، خطرناک‌تر بوده و ورود پسماند این فرآیند به خاک می‌تواند برای انسان، محیط‌زیست و جانوران آسیب‌زا باشد. اما در نهایت اینگونه نتیجه‌گیری کردند که هر یک از تخمیرها بسته به شرایط، نیازها و اهدافی که می‌خواهند به دست آورند، بهترین استفاده را خواهند داشت.

استخراج مواد رنگزا به روش‌های مرسوم زمان زیادی می‌برد و همینطور برخی از محققان ثابت کرده‌اند که استخراج به کمک مایکروویو، علاوه بر کاهش زمان فرآیند، بازده استخراج را نیز بالا می‌برد. سیاف‌فتح الله و همکارانش [۵۴] به منظور بهینه‌سازی شرایط استخراج ایندیگو، از مایکروویو با حداکثر توان ۸۰۰ وات و فرکانس ۲/۴۵ گیگاهرتز استفاده کردند. در واقع در این روش، تابش‌های مایکروویو به بستر گیاه منتقل می‌شود که حلالیت حلال را افزایش داده و کشش سطحی را نیز کاهش می‌دهد. محققین در این پژوهش، تاثیر دما و مدت زمان استخراج را مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. در این آزمایش، در زمان ۷۰ دقیقه برای استخراج، نسبت بیشتر مواد به مقدار حلال در میزان دمای بالا، عملکرد بهتری نشان داد، بنابراین استفاده از دمای پایین‌تر را توصیه نکرده‌اند، به خصوص در نسبت بالای مواد/حلال، زیرا می‌تواند عملکرد ماده رنگزای ایندیگو را کاهش دهد. بنابراین ماده رنگزا را نمی‌توان به صورت حداکثری استخراج کرد. یکی از مزایای استفاده از استخراج به کمک مایکروویو زمان کوتاه‌تر در مقایسه با روش معمولی است. بر اساس بهینه‌سازی مدل، شرایط بهینه استخراج فرآیند در دمای استخراج ۶۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت مواد به حلال ۰/۰۲ گرم بر میلی لیتر و زمان استخراج ۵۰ دقیقه بود. این شرایط تایید شده و بازده واقعی با بازده پیش‌بینی شده بسیار نزدیک بود. در تعیین کیفیت مواد رنگزا به‌دست‌آمده با استفاده از روش‌های استخراج به کمک مایکروویو، آزمایش FT-IR برای تعیین ویژگی‌های گروه‌های عاملی موجود در عصاره ماده رنگزای نیل انجام شد که در نهایت مشاهده شد عصاره برگ گیاه نیل دارای پنی‌لین جی پتاسیم ۴۷/۹۷ درصد، کرینات کلسیم ۴۰/۵۲ درصد و نیل ۳۹/۱۱ درصد است که در واقع نشان داد عصاره حاوی نیل می‌باشد.

تولید ماده رنگزای طبیعی ایندیگو از گیاه نیل نیاز به تخمیر



شکل ۵: میزان جذب pH [۴۳].

Figure 5: pH Absorption Value [43].

در این پژوهش تأثیر سه دما، دمای اتاق (۲۵±۲) درجه سانتی‌گراد، دمای یخچال (۲±۲) درجه سانتی‌گراد، دمای بالا (۴۰) درجه سانتی‌گراد بر جذب نیز مورد بررسی قرار گرفت. نگهداری ماده تخمیر در دمای یخچال دارای سطح پایداری بهتری نسبت به دمای بالا است. این مطابق با ماهیت مواد رنگزا نیلی است که مستعد نور روشن هستند. مقاومت رنگی رنگ‌های نیلی برای نور روشن روز، خوب نیست به طوری که در مواجهه با نور روشن رنگ‌های نیلی محو می‌شوند. تغییر رنگی که در ذخیره‌سازی نور روشن رخ می‌دهد بسیار قابل توجه است. در نهایت می‌توان این گونه جمع‌بندی کرد که نگهداری عصاره نیل در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد باعث روشن شدن رنگ عصاره نیل می‌شود. در حالی که تاثیر pH بر عصاره نیل در ایجاد رنگ آبی مهم است. رنگ آبی روی خمیر نیل قلیایی ایجاد می‌شود، اما در حالت اسیدی، رنگ روی سطح محلول به رنگ بنفش شفاف در می‌آید.

از آنجایی که فرآیند تخمیر رنگ‌های نیل^۱ را می‌توان با استفاده از مواد شیمیایی یا طبیعی انجام داد، در یک آزمایش، هندراوان^۲ و ستیوفیترا^۳ [۵۳] از هیدروسولفیت سدیم در تخمیر شیمیایی و از شکر قهوه‌ای در تخمیر طبیعی برای تولید ماده رنگزای ایندیگو استفاده کردند. این مطالعه با هدف یافتن مزایا و معایب دو روش طبیعی و شیمیایی در ماده رنگزای نهایی تولید شده انجام شد. برای به دست آوردن خمیر نیل، از روش خیساندن به مدت ۲۴ ساعت، اضافه کردن آهک و سپس هوادهی استفاده شد. سپس خمیر برای تخمیر با هیدروسولفیت سدیم و شکر قهوه‌ای آماده شد. پس از تجزیه و تحلیل هر دو آزمایش محققین نتیجه گرفتند که فرآیند پیچیده‌تر و زمان صرف شده در روش تخمیر طبیعی، ارزش و قیمت محصول ساخته شده با آن را بالاتر خواهد برد و می‌توان به عنوان کالای ارگانیک، پایدار و همینطور دوست‌دار محیط‌زیست از آن نام

¹ indigofera

² Hendrawan

³ Setiofitria

فرآیند تخمیر گیاه نیل با استفاده از سه سویه: *Aspergillus niger*، *Trichoderma reesei* و *Sclerotium rolfsii* ارزیابی کردند. تولید بیوژنیک ایندیگو جایگزینی برای فرآیندهای شیمیایی است که یک فرآیند سازگار با محیط‌زیست و پایدار می‌باشد و علاوه بر این می‌تواند بازدهی محصول را نیز افزایش بدهد. در یک جنبه گسترده‌تر، تحریک‌کننده‌ها^۴ به دو صورت زنده^۵ و غیر زنده^۶ وجود دارند. تحریک‌کننده‌های بایوتیک عمدتاً از گیاهان و میکروب‌ها و تحریک‌کننده‌های آب‌یوتیک از ساختارهای شیمیایی تشکیل شده‌اند. تحریک‌کننده‌های قارچی که در این تحقیق از آن‌ها استفاده شد، از نوع بایوتیک (زنده) بودند که به عنوان یکی از روش‌های برجسته برای افزایش بازده ترکیبات متابولیک از طریق تسریع مسیر بیوسنتز ترکیبات مهم زیستی شناخته شده‌اند. در روش ذکر شده به دلیل نیاز به انرژی کم و شرایط واکنش ملایم، راه‌های جدیدی را برای تولید میکروبی ایندیگو با محیطی خوش خیم فراهم کرد. در این پژوهش تمام آزمایش‌ها در یک راکتور پلی پروپیلن ساخته شده با ظرفیت ۵۰۰ میلی لیتر انجام شد. عوامل مختلف یعنی pH، پتانسیل احیا و دمای آب قبل از افزودن به راکتور، اندازه‌گیری شدند. سه عصاره قارچی مختلف در آزمایش‌های جداگانه در مقادیر حجمی ۱، ۵ و ۱۰ درصد (v/v) به عنوان تحریک‌کننده اضافه شدند. نمونه‌های شاهد فاقد محرک‌های قارچی بودند. تخمیر و مراحل بعدی برای تولید ماده رنگزا در شرایط ثابت با حفظ تمام عوامل دیگر انجام شد. نتایج تاثیر تحریک‌کننده‌ها بر روی بازده ایندیگو نشان داد که عصاره‌های *A. niger* و *S. rolfsii* باعث افزایش عملکرد نیل شدند، در حالی که *T. reesei* اثر بازدارندگی جزئی داشت. استخراج با عصاره *A. niger* بیشینه مقدار ایندیگو (۴/۸۸ میلی گرم) را در مقدار ۱۰ درصد ایجاد کرد که ۴ برابر بیشتر از مقدار نسخه شاهد بود.

هوادهی یا اکسیدشدن یکی از مراحل ضروری در طی فرآیند تولید ماده رنگزای طبیعی ایندیگو از گیاه نیل است. با این حال، فقدان اطلاعات علمی برای تعیین شرایط هوادهی کافی در تولید ماده رنگزای طبیعی یکی از محدودیت‌های قابل توجه در این فرآیند است. بنابراین، پاتانیک^۷ و همکارانش [۵۷] در مطالعه حاضر بر انتخاب عوامل مناسب برای ارزیابی اکسیدشدن بهینه برای تشکیل ماده رنگزای ایندیگو تلاش نمودند. اثر عوامل اکسیدشدن مستقیم، مانند اکسیژن محلول (DO)، پتانسیل اکسیدشدن احیا (ORP) و pH و عوامل غیرمستقیم شامل اندازه ی ذرات گیاه نیل بر تشکیل ماده رنگزای ایندیگو، ارزیابی شد. در این آزمایش، برای استخراج ماده رنگزا از همان روش مرسوم خیساندن (۱۶ ساعت و دمای ۳۰ درجه

گیاه، اکسیدشدن، جمع‌آوری محصول اکسیده شده (ایندیگو)، صاف کردن و بازیابی دارد. در مطالعه‌ای که سارانجی^۱ و همکارانش [۵۵] انجام دادند، نقش پارامترهای فیزیکی و شیمیایی را در طول تخمیر با توجه به عملکرد محصول بررسی کرده‌اند. این مطالعه نشان می‌دهد که نسبت آب به گیاه، مدت زمان تخمیر، pH، غلظت اکسیژن محلول، پتانسیل اکسید-احیا (ORP^۲) و درجه حرارت (۲۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد) در طول تخمیر، اکسیدشدن و بازیابی ماده رنگزا به طور مستقیم یا غیرمستقیم با عملکرد ماده رنگزا ارتباط دارند. این آزمایشات تحت دوره‌های مختلف تخمیر در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت و با مقدار ثابت گیاه به آب (۱:۱۰) انجام شد. هر آزمایش در چهار درجه حرارت مختلف، یعنی ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بعد از اندازه‌گیری شرایط دوره نهفته و درجه حرارت، در مرحله بعدی اکسیدشدن به مدت بیست دقیقه برای هر یک از نمونه‌ها انجام شد. محیط تخمیر اکسید شده با حضور میکروارگانیسم‌ها در لوله‌های Oak Ridge جمع‌آوری و برای ته‌نشین شدن ماده رنگزا در حضور میکروارگانیسم‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بازده ایندیگوی ته‌نشین شده (ماده رنگزای خام) بر حسب میلی گرم با کم کردن وزن لوله‌های خالی یکسان از وزن لوله‌های خشک شده در آون حاوی ایندیگو تعیین شد. در طی فرآیند تخمیر، pH نقش مهمی در تخمیر کامل یا جزئی نمونه‌ها دارد. این امر بر رهاسازی ایندیکان از گیاه نیل تأثیر می‌گذارد در نتیجه بر عملکرد ماده رنگزا تأثیر می‌گذارد. اکسیژن محلول نقش مهمی در بخش‌های مختلف تخمیر دارد. این اکسیژن توسط میکروفلور موجود در محلول که واسطه تخمیر نیل است جذب می‌شود. میکروب‌ها در مراحل آزادسازی ایندیکان به محلول و همچنین تبدیل پیش ساز «ایندیکان» به «ایندوکسیل» شرکت می‌کنند. بنابراین، سطح بهینه اکسیژن محلول برای حمایت از فعالیت متابولیک و تغییر جریان متابولیک میکروب‌های موجود در محلول مهم است. کاهش اکسیژن محلول پس از تخمیر و اکسیداسیون، این اصل را توجیه می‌کند که با ظهور واکنش، اکسیژن محلول یک محلول مطابق با حضور و عملکرد میکروب‌ها در محلول کاهش می‌یابد. در نهایت می‌توان گفت نتایج نشان‌دهنده تغییرات قابل توجهی در عملکرد ماده رنگزا با تغییر در مدت زمان تخمیر بود. با افزایش دما، عملکرد افزایش یافت و حداکثر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود. مدت زمان تخمیر ۱۲ ساعته بیشینه عملکرد ماده رنگزا را نشان داد.

در آزمایشی سایکات دوتا^۳ و همکارانش [۵۶] نقش تحریک‌کننده‌های قارچی را بر عملکرد ماده رنگزای ایندیگو در طی

⁴ Elicitors

⁵ Biotic

⁶ Abiotic

⁷ Pattanaik

¹ Sarangi

² Oxidation Reduction Potential

³ Dutta S

دیده انجام شد و این عملیات تا ۱۰۰ روز ادامه یافت تا محصول کمپوست و تخمیر شده به نام سوکومو تولید شود. دومین فرآیند تخمیر با سوکومو در مخازن Aizome، ادامه می‌یابد. در فرآیند تهیه سوسپانسیون‌های رنگی، نیل نامحلول از نظر میکروبی به لوکوی ایندیگو محلول در آب تبدیل می‌شود. احیای نیل به لوکوی ایندیگو توسط میکروارگانیسم‌ها در سوسپانسیون‌های بسیار قلیایی (۵/۱۰- pH= ۱۰/۳) که با عصاره خاکستر چوب، آهک خرد شده، سبوس گندم، ساک ژاپنی و غیره تهیه می‌شوند، کاتالیز شد. هنگامی که لوکوی ایندیگو توسط الیاف نساجی جذب شدند در معرض هوا قرار گرفتند که مجدداً به نیل اکسید می‌شود و در الیاف تثبیت می‌شوند. در مطالعه‌ای که پاتانیک^۳ و همکارانش [۵۹] بر روی ارزش‌گذاری زیست توده *Indigofera tinctoria* L. حاصل از فرآیند استخراج ماده رنگزای ایندیگو انجام دادند، مراحل استخراج از گیاه نیل، را این گونه شرح دادند:

فرآیند استخراج به طور کلی در سه مرحله انجام می‌شود؛ خیساندن، کوبیدن و بازیابی ماده رنگزا. در فرآیند خیساندن، زیست توده گیاهی تازه برداشت شده حاوی ایندیکان به مدت ۱۰ تا ۱۵ ساعت در آب غوطه‌ور می‌شود. در طی این فرآیند، ایندیکان به گلوکز و ایندوکسی آبکافت می‌شود. این امر رنگ کلی مایع تخمیر شده را به زرد مایل به سبز تغییر می‌دهد که ماده رنگزای استخراج شده را می‌شود. در فرآیند کوبیدن، محلول تخمیر شده از خیساندن گیاه به صورت مکانیکی هوادهی می‌شود، که غلظت اکسیژن محلول را افزایش می‌دهد و باعث عکس‌العمل خود به خود مولکول‌های اندوکسیل ناپایدار به ماده رنگزای ایندیگو می‌شود. در مرحله آخر ماده رنگزای ته‌نشین شده را جمع‌آوری کرده و در دیگ مسی می‌جوشانند که به تصفیه مولکول ماده رنگزا کمک می‌کند. ماده رنگزای بازیافت شده صاف و به شکل کیک فشرده شده و در آفتاب خشک می‌شود. سپس در دمای اتاق نگهداری می‌شود. مراحل استخراج در شکل شماره ۶ نشان داده شده است.

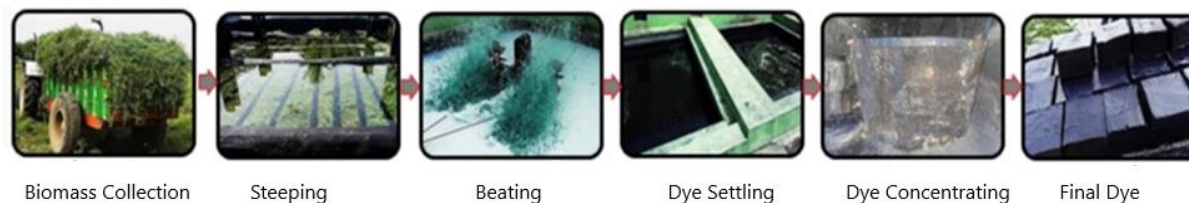
در تحقیقی که راجان^۴ و همکارش [۶۰] بر روی حساس‌کننده‌های حساس‌کننده‌های ماده رنگزای طبیعی جدید از گیاه نیل^۵ در سلول‌های خورشیدی حساس به رنگ (DSSC^۶) انجام دادند، از سه روش برای استخراج گیاه نیل بهره بردند. روش سرد، روش سوکسله برای برگ‌های خشک و روش تخمیر برای برگ‌های تازه. برای روش سرد، حدود ۱ گرم از برگ‌های خشک و پودر شده و همین‌طور شاخه‌ها را در ۵۰ میلی لیتر متانل خیساندند، به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق هم زده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شدند.

سانتی‌گراد) و آنکوبه کردن استفاده شده است. در آزمایش‌های اولیه، از یک کمپرسور هوا با سیستم پاششی برای ارائه هوای پراکنده اتمسفر به سیستم اکسیدشدن استفاده شد. اکسیدشدن در یک شیشه یک لیتری (حجم مفید ۷۰۰ میلی لیتر) در دمای اتاق 2 ± 28 درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای مشاهده عوامل تنظیم‌کننده برای شناسایی تشکیل ایندیگو، از روش "یک عامل در یک زمان"^۱ استفاده شد. با حفظ مدت زمان اکسیداسیون ۳۰ دقیقه، اثر هوادهی با مقایسه عملکرد در سرعت‌های هوادهی مختلف ۰ تا ۱۰ بررسی شد. به طور مشابه، با سرعت هوادهی ثابت ۳، اکسیدشدن در ۸ بازه زمانی مختلف یعنی (۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) انجام شد. هوادهی عامل اصلی اکسیدشدن است که مولکول‌های ایندوکسیل را به ایندیگو تبدیل می‌کند. برای بهینه‌سازی هوادهی، سرعت و مدت زمان آن حائز اهمیت است. مشاهده شد که عوامل اکسیدشدن و pH با توجه به افزایش سرعت جریان هوا به طور پیوسته در حال افزایش بودند. افزایش سرعت جریان هوا منجر به افزایش بازده ماده رنگزای ایندیگو شده از این رو، افزایش بازده ماده رنگزا می‌تواند به دلیل افزایش عرضه اکسیژن اتمسفر به سیستم با سرعت هوادهی بالاتر باشد که به تبدیل ایندوکسیل به ایندیگو یا به تراکم آن کمک می‌کند؛ بنابراین، نرخ هوادهی ۳ را به عنوان نرخ هوادهی بهینه برای آزمایش‌ها در نظر گرفتند. از لحاظ میزان ذرات، توزیع نسبتاً یکنواخت ذرات با اندازه کوچک‌تر از ۱۰۰ میکرومتر در یک دوره زمانی هوادهی ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه توجیه می‌کند هر چه تعداد ذرات موجود در محیط تخمیر شده بیشتر باشد، زمان کمتری برای جمع شدن طول می‌کشد. علاوه بر این، اندازه ذرات $100 \leq$ میکرومتر به عنوان حداقل اندازه ذرات برای مشاهده چشمی و ته‌نشینی در نظر گرفته شد، بنابراین اندازه ذرات در طول هوادهی می‌تواند تا ۱۰۰ میکرومتر ثابت شود. در نهایت می‌توان گفت که ارتباط عوامل مختلف در هوادهی و ارتباط آن‌ها برای افزایش بازده ماده رنگزا در مقیاس بزرگ و صنعتی همچنان بسیار چالش برانگیز بنظر می‌آید.

در یک مطالعه‌ی ولتامتری که کازومی^۲ و همکارانش [۵۸] به منظور درک مکانیکی احیای ایندیگو در تخمیر آن داشتند، روش استخراج سنتی در ژاپن را اینگونه شرح دادند:

رنگرزی سنتی نیل شامل دو مرحله مهم است: تهیه مواد رنگزا (به نام سوکومو) و سوسپانسیون‌های رنگ، که هر دو شامل مراحل تخمیر توسط میکروارگانیسم‌ها هستند. گیاهان نیل به روش بیوسنتز، ایندوکسیل را به ایندیکان که پیش ساز ایندیگو است، تبدیل می‌کنند. بنابراین اولین فرآیند تخمیر تبدیل ایندیکان به ایندیگو برای تهیه ماده رنگزای ایندیگو است. تخمیر اکسیدشدنی میکروبی برگ‌ها در شرایط هوایی و در دمای مناسب با روش‌های پیچیده صنعت‌گران آموزش

^۳ Pattanaik^۴ Rajan^۵ *Indigofera tinctoria*^۶ Dye Sensitive Solar Cell^۱ OFAT^۲ Nakagawa K



شکل ۶: فرآیند استخراج ایندیگو [۵۹]

Figure 6: Indigo extraction process [59].

پیش‌ساز ایندیگو از گیاه وسمه انجام داده بودند، روش استخراج خود را اینگونه شرح دادند، در روش استاندارد، برگ‌های تازه در هاون آسیاب شدند و در استن/اسید استیک ۱ درصد حجمی (۱۰ میلی‌لیتر بر گرم برگ‌های تازه) معلق شدند و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت هم زدند. پس از صاف کردن، استن تحت فشار کاهش یافته تبخیر شد. باقیمانده در حجم کمی از متانول حل شد و توسط TLC و HPLC-MS آنالیز شد. غلظت رنگدانه و بازده پیش‌نشانگرهای نیل تولید شده از *I. tinctoria* با آنالیز HPLC اشاره به منحنی استاندارد محصولات محلول در متانول اندازه‌گیری شد. نتایج HPLC تایید کرد که کمیت پیش‌سازهای ایندیگو به ارقام و دوره برداشت گیاه وابسته است. برای اولین بار نشان داده شد که برگ‌های جوان *I. tinctoria*، برداشت شده از ژوئن، علاوه بر ایندیکان^۳ و ایستان بی^۴، یک پیش‌ساز جدید ایندیگو تولید کرد. نام ایستان سی^۵ برای توصیف این کاوشگر جدید ایندیگو در گیاه وسمه پیشنهاد شده است.

کری گیلبرت^۶ و همکارانش [۲۱] ایندیگو را با جوشاندن برگ‌ها در آب به مدت چند دقیقه، خنک کردن عصاره‌ی آن تا دمای اتاق و افزودن محلول آمونیاک و سپس هواده‌ی از گیاه وسمه استخراج کردند. همچنین گزارش نمودند که با صاف کردن عصاره‌ی بدست آمده می‌توان ایندیگوی تمیزی داشت ولی نمی‌توان از این روش در مقیاس بزرگ و تجاری استفاده کرد چون از لحاظ مصرف انرژی مقرون به صرفه نیست. در نتیجه در این مطالعه، دو روش برای بهبود فرآیند استخراج ایندیگو از این گیاه در مقیاس احتمالا تجاری پیشنهاد می‌دهند: استخراج در مقیاس آزمایشگاهی و دیگری مقیاس آزمایشی. محققین با استفاده از اطلاعات به دست آمده از استخراج در مقیاس آزمایشگاهی، یک کارخانه‌ی آزمایشی طراحی کردند. با این حال، در بزرگ کردن مقادیر برگ با برخی مشکلات مواجه شد. نتایجی که در پژوهش حاصل شد، نشان می‌دهد که عملکرد مناسب ایندیگو در مقیاس بزرگ می‌تواند به دست آید، اگرچه این سیستم

بقایای جامد با استفاده از کاغذ صافی صاف شده و با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به دقت به ظروف دربسته منتقل شد و برای محافظت در برابر نور با ورقه آلومینیمی پیچیده و برای استفاده بیشتر در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. دو گرم از برگ و ریشه‌های پودر شده برای استخراج سوکسله با متانول استفاده شد. دما در طول فرآیند ۶۰ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۱۰ ساعت بود. عصاره‌ها جمع‌آوری و با استفاده از یک اپراتور چرخشی به یک چهارم حجم اولیه، تغلیظ شد. برای استخراج با آب به روش تخمیر، ۲۵۰ گرم از برگ‌های تازه و شاخه‌های جوان جمع‌آوری و با آب مقطر شسته شدند. برگ‌ها و جوانه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در pH=۱۱ آب تخمیر شدند سپس دو برابر حجم محلول، هیدروکسید کلسیم Ca(OH)_2 به عصاره اضافه و به مدت ۱ ساعت هواده‌ی و سپس به مدت یک ساعت جوشانده شد. رسوب جمع‌آوری شده دو بار با محلول Ca(OH)_2 شسته و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۹۸۲۰ دور در سانتریفیوژ قرار گرفته و سپس در خلأ خشک شد. محصول خام آبی مایل به سیاه بدست آمده از گیاه نیل دارای بازده پودر نیل خام ۲/۶ گرم بود.

در مطالعه‌ای فیلیپ^۱ و همکارانش [۶۱] بر روی رفتار محدودکننده‌ی نوری ماده رنگزای طبیعی استخراج شده از گیاه نیل پرداختند. در این تحقیق از روش فراصوت برای استخراج ایندیگو از پودر آن بهره بردند. برای استخراج ماده رنگزا، ابتدا پودر را با آب مقطر مخلوط کرده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه فراصوت قرار گرفت. محلول کلونیدی به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی جمع‌آوری شد. فیلتراسیون با استفاده از کاغذ صافی انجام گرفت تا مایع شفاف نوری با رنگ بنفش کم‌رنگ به دست آید که سپس در یخچال در دمای پایین ۴ درجه سانتی‌گراد برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

۵-۲- وسمه

در مطالعه‌ای که ماگارد^۲ و همکارانش [۱۹] به منظور شناسایی

^۳ indican

^۴ Istan B

^۵ Istan C

^۶ Gilbert

^۱ Philip

^۲ Maugard

نتایج تحقیق نشان داده که میزان ایندیگوی بدست آمده در I. tinctoria (وسمه) و I. candolleana نسبت به subsp. corymbosa بیشتر بود در حالی که ایندیگو را نمی‌توان در I. buschiana تشخیص داد. نتایج نشان داد که عملکرد و کمیت ایندیگو به عوامل ژنتیکی، زمان برداشت و شرایط استخراج بستگی دارد. رنگ استخراج شده از I. candolleana با I. tinctoria (وسمه) قابل مقایسه بود. بنابراین، I. candolleana می‌تواند یک گیاه امیدوارکننده برای رنگرزی با ایندیگو باشد.

بارانی و همکارانش [۴۸]، در مطالعه‌ای که به منظور بهینه‌سازی رنگرزی الیاف پشم با گیاه وسمه به وسیله روش سطح پاسخ^۴ انجام دادند، استخراج ایندیگو از گیاه وسمه را اینگونه بیان می‌کنند. ایندیگو پس از استخراج پیش‌سازها از برگ‌های گیاه وسمه تولید می‌شود. این ترکیبات با خیساندن برگ‌ها در آب گرم استخراج می‌شوند. با اضافه کردن قلیایی به آب، ایندوکسیل آزاد می‌شود که پس از هوادهی شدید، ایندیگو تولید می‌کند. برای تولید ایندیگو از پیش‌سازها، نصف کربوهیدرات از گروه ایندوکسیل آبکافت می‌شود و دو مولکول ایندوکسیل حاصل در واکنش اکسیدشدن با یکدیگر ترکیب می‌شوند تا ایندیگو را تولید کنند که از محلول به صورت رسوب قابل استخراج و بازیافت است. در این تحقیق استخراج ماده رنگزا به شرح زیر انجام شد: برگ‌های وسمه که به خوبی آسیاب شده بودند، با توجه به زمان پیشنهادی طرح آزمایشی در محلول آبی در مکانی تاریک نگهداری شدند و سپس از این محلول برای تهیه هر حمام رنگرزی استفاده شد.

در تحلیل و تجزیه‌ای که ژو^۵ و همکارانش [۶۲]، از گیاه وسمه با با رویکردهای تحلیلی جدید HPLC، MS و NMR انجام دادند، استخراج از این گیاه را اینگونه مطرح کردند. مواد تازه برداشت شده از گیاه را به قطعات کوچک به طول ۲-۳ سانتی‌متر بریده و بلافاصله با نیتروژن مایع منجمد شد. قبل از استخراج، برگ‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. دما، رطوبت نسبی و کاهش وزن در طول فرآیند خشک کردن کنترل شد. وزن ثابت پس از ۳-۴ روز به دست آمد. نمونه‌های برگ خشک شده در دمای اتاق به مدت چند روز در بطری‌های شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ در تاریکی نگهداری شدند. بلافاصله قبل از استخراج، مواد برگ خشک شده آسیاب شدند. ۱ گرم نمونه منجمد و پودر شده با استفاده از روش استخراج مایع تحت فشار (PLE) با دستگاه ASE 200 استخراج شد.

۶- نتیجه‌گیری

مطالعات انجام گرفته نشان داد که موضوع استخراج ماده رنگزا از

آزمایشی فقط امکان پردازش تا ۱۰۰ کیلوگرم برگ را دارد اما این روش برای استفاده در مقیاس بسیار بزرگ‌تر مناسب است و می‌تواند برگ‌های یک هکتار یا بیشتر از وسمه را پردازش کند. محققین اعلام نمودند، فرآیند بکار گرفته شده با موفقیت کامل برای تولید ایندیگو از گیاه وسمه برای استفاده در صنعت نساجی استفاده شده و مشکلات مربوط به استخراج ایندیگو از مواد گیاهی، مانند جابجایی مقادیر زیادی از مواد گیاهی برداشت شده از مزرعه، استخراج پیش‌سازها از مواد گیاهی و حذف محصول از محلول، برطرف شده است.

فیلیپ جان^۱ و همکارانش [۲۹] در فرآیند تشکیل ایندیگو از گیاه وسمه به منظور تولید ایندیگوی خالص‌تر، به عنوان بخشی از یک مطالعه گسترده‌تر برای تعیین اینکه آیا رزین‌های قوی جاذب ممکن است در مقیاس بزرگ استخراج در پیش‌سازهای ایندیگو مفید باشند، از دو رزین در فرآیند استخراج استفاده کرده‌اند. Amberlite XAD16 غیر یونی برای گرفتن پیش‌سازهای ایندیگوی استخراج شده از برگ‌های خیسانده شده و Amberlyst A-21، یک مبادله یونی ضعیف پایه که در اصل قادر است، آبکافت پیش‌سازها را کاتالیز کند و در نتیجه ایندوکسیل را برای تشکیل ایندیگو آزاد کند. آزمایش‌های اولیه که در آن حجم ۱ لیتر از ایندوکسیل استات (۱ میلی‌مولار) یا عصاره استاندارد از طریق ستون‌های رزین (حاوی ۱ گرم رزین) عبور داده شد، نشان داد که ۳۰ تا ۷۰ درصد از پیش‌سازهای تشکیل‌دهنده ایندیگو می‌توانند توسط رزین‌ها جذب شوند. هنگامی که ستون‌ها با استن، متانل و اتانل شسته شدند، نیل روی رزین‌ها باقی ماند. محلول‌های قرمز دارای بیشینه جذب نامشخص بودند که نشان می‌داد ترکیباتی غیر از ایندیروبین وجود دارد. بنابراین، جاذب‌های رزین به طور بالقوه برای استخراج پیش‌سازهای ایندیگو مفید هستند، اما تجزیه پیش‌سازهای جذب شده محتمل است، و اتصال محکم ایندیگو به رزین، شستشوی ایندیگو را بدون نیاز به حلال‌های ناسازگار با پایداری تولید نیل طبیعی دشوار می‌کند.

کارامان^۲ و دیگر همکارانش [۳۸]، در پژوهشی از چند گونه مختلف گیاه ایساتیس^۳ برای استخراج ایندیگو و استانداردسازی رنگرزی آن با فناوری ساده استفاده کردند. هدف از این مطالعه ایجاد روشی کارآمد و سازگار با محیط‌زیست برای رنگرزی منسوجات با استفاده از ایندیگوی طبیعی و تعیین میزان پتانسیل ایندیگو در گیاهان بود. از این رو، چهار گونه مختلف از جنس Isatis به‌عنوان مواد اولیه و همچنین از دو روش تخمیر و آب گرم با دو pH مختلف برای استخراج بهره برده‌اند. استخراج اجزای ماده رنگزا از مواد گیاهی با آب گرم و تخمیر بدون افزودن مواد شیمیایی یا حلال انجام شد.

¹ John

² Karaman

³ Isatis

⁴ Response Surface Methodology

⁵ Zhou

را پایین آورد و به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسانید. مقدار ایندیگوی استخراج شده نشان داد، تفاوت فاحشی بین روش‌های استخراج سنتی و یا دستگاهی وجود نداشت. البته زمان نقش تعیین‌کننده‌ای در این دو روش متفاوت بود. با توجه به اینکه ماده رنگزای نیل طبیعی و یا حتی مصنوعی از خارج از کشور وارد می‌شود و از آنجا که در بخش‌های مختلفی از کشور مخصوصاً در استان کرمان سطح زیر کشت گیاه نیل بسیار زیاد است می‌توان با طراحی شرایط استخراج ماده رنگزا از گیاه نیل با در نظر گرفتن تجهیزات موجود در هر کارگاهی و یا حتی به شیوه سنتی، وابستگی به واردات این ماده رنگزای ارزشمند را از بین برده و در داخل کشور ماده رنگزای نیل را تولید نمود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر ادامه پژوهش پایان نامه کارشناسی ارشد خانم ماریه ملا است که به همت و همکاری خانم مائده مهدی پور با راهنمایی نویسنده مسئول انجام گرفت.

تعارض منافع

در این مقاله هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

گیاه نیل و وسمه مورد توجه دانشمندان بسیاری در سراسر دنیا قرار گرفته است. اهمیت این موضوع زمانی بیشتر می‌شود که دانشمندان در کشورهایی که گیاه نیل در آنجا کشت می‌شود، پیشرو بوده‌اند. در اغلب تحقیقات صورت گرفته، روش‌های سنتی استخراج مینای طراحی روش‌های پیشرفته بوده‌اند. از آنجا که ساختار ماده رنگزای درون نیل و وسمه به صورت نامحلول در آب می‌باشد، استخراج ماده رنگزا طی ۲ فاز تخمیر و اکسیدشدن تکمیل می‌شود. اصل کلی در تمام روش‌های استخراج تخمیر گیاه نیل یا وسمه جهت استخراج مواد رنگزا بوده است. برای افزایش میزان بازدهی استخراج، عوامل و متغیرهای تاثیرگذار در فرآیند تخمیر، از جمله سرعت هوادهی، درجه حرارت، مدت زمان و pH اهمیت زیادی داشته است. این متغیرها در طراحی روش‌های استخراج به وسیله میکروویو، فراصوت، آنزیمی و استفاده از میکروارگانیسیم‌ها و یا حلال‌های غیرآبی نظیر متانل نیز اهمیت خود را نشان داده است. در هر روش پژوهشی دانشمندان تلاش نموده‌اند تا شرایط بهینه استخراج را طراحی و ارائه نمایند. نتایج کلی تحقیقات صورت گرفته نشان داد: pH قلیایی و مخصوصاً در محدوده ۹-۱۱ و مدت زمان تخمیر بین ۱۲ الی ۲۴ ساعت بیشترین تاثیر را در افزایش بازده داشت. آنچه که در تمامی آزمایشات و تحقیقات انجام شده در زمینه استخراج ماده رنگزا از وسمه به روش آب گرم، مشترک است این است که بعد از گرمادهی در دمای حدود ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت کم باید به سرعت دما

۷- مراجع

1. R. J. H. Clark, C. J. Cooksey, M. A. M. Daniels, R. Withnall, "Indigo, woad, and Tyrian Purple: important vat dyes from antiquity to the present", *Endeavour*, 17, 191-199, **1993**.
2. S. Sharma, M. N. Chandrababha, "Present status of plant derived indigo dye – A review", *IJRET*, 17, 42-47, **2016**.
3. J. Balfour-Paul, "Indigo", London British museum press, **1998**.
4. S. Warjeet Laitonjam, D. Sujata Wangkheirakpam, "Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifoliosus* Nees. And *Indigofera tinctoria* Linn", *IJPB*, 3, 108-116, **2011**.
5. A. Shahidi, Z. Ahmadi, "review on the methods of extracting dyes from sparks", *J. Stud. Color World*, 11, 17-32, **1400**.
6. H. B. Singh, K. A. Bharati, "Handbook of natural dyes and pigments", Woodhead publishing india, 4-5, **2015**.
7. D. Amiri, "Natural Dyeing and Extraction of Pigments from *Asparagus Plant*", Tehran, Shabahang, 60-61, **1387**.
8. L. Degani, O. Chiantore, Ch. Riedo, "Identification of natural indigo in historical textiles by GC-MS", *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 1695-1704, **2015**.
9. N. F. Iqbal, "Woad and indigo in tension in early modern Europe", *Constellation*, 4, 277-292, **2013**.
10. A. Brattstrom, A. Schapowal, M. A. Kamal, I. Maillet, B. Ryffel, R. Moser, "The plant extract *Isatis tinctoria* L. extract (ITE) inhibits allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in mice", *Phytomed.* 17, 551-556, **2010**.
11. J. Han, X. Jiang, L. Zhang, "Optimization of extraction conditions for polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their in vitro free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN- γ Mrna expression in chicken lymphocytes", *Carbohydr. Polym.* 86, 1320-1326, **2011**.
12. A. Hartl, A. N. P. Gaibor, M. R. Van Bommel, R. Hofmann-de Keijzer, "Searching for blue: Experiments with woad fermentation vats and an explanation of the colours through dye analysis", *J. Archaeol. Sci.: Rep.* 2, 9-39, **2015**.
13. I. Joosten, M. R. Van Bommel, R. Hofmann-de Keijzer, H. Reschreiter, "Micro analysis on hallstatt textiles: color and condition", *Microchem. Acta*, 155, 169-174, **2006**.
14. K. Gromer, "Textile materials and techniques in central

- Europe in the 2nd and 1st millennia BC", Textile society of America symposium proceedings, Paper 914, **2014**.
15. J. Edmonds, "The history of woad and the medieval woad vat", Copies available from the Chiltern open Air Museum, Newland Park, Gorelands Lane, Chalfont St Giles, **1998**.
 16. Iqbal N.F.K, "Ambivalent blues: woad and indigo in tension in early modern Europe", Constellations, 4, 277-290, **2013**.
 17. D. Cardon, "Natural dyes", Archetype, **2007**.
 18. K. G. Gilbert, D. J. Hill, C. Crespo, A. Mas, M. Lewis, D. T. Cooke, "Qualitative analysis of indigo precursors from woad by HPLC and HPLC-MS", Phytochem. Anal. 11, 18-20, **2000**.
 19. TH. Maugard, E. Enaud, P. Choisy, M. Dominique Legoy, "Identification of an indigo precursor from leaves of Isatis tinctoria (Woad)", Phytochem. 58, 897-904, **2001**.
 20. CH. Oberth, B. Schneiderb, H. Graf, M. Hamburger, "The Elusive Indigo Precursors in Woad (Isatis tinctoria L.) Identification of the Major Indigo Precursor, Isatan- A, and a Structure Revision of Isatan B", Chem. Biodivers. 1, 174-182, **2004**.
 21. K.G. Stoker, D.T. Cooke, D. J. Hill, "An improved method for the large-scale processing of woad for possible commercial production of Woad indigo", Agric. Eng. Res. 71, 315-320, **1998**.
 22. J. Song, H. Anaka, K. Imamura, K. Kajitani, K. Nakanishi, "Development of a highly efficient indigo dyeing method using indicant with an immobilized b-glucosidase from Aspergillus Niger", J. Biosci. Bioeng. 110, 281-287, **2010**.
 23. W. B. Jensen, "The leyden and stockholm papyri. greco egyptian chemical documents from the early 4th century AD", Oesper Collections in the History of Chemistry University of Cincinnati, **2008**.
 24. A.N. Padden, V.M. Dillon, J. Edmonds, M.D. Collin, P. John, "An indigo-reducing moderate thermophile from a woad vat, Clostridium isatidis sp. Nov", Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 1025-1031, **1999**.
 25. T. Kokubun, J. Edmonds, P. John, "Indoxyl derivatives in relation to medieval indigo production", Phytochem. 49, 79-87, **1998**.
 26. T. Bechtold, A. Turcanu, S. Geissler, E. Ganglberger, "Process balance and product quality in the production of natural indigo from Polygonum tinctorium Ait. Applying low-technology methods", Bioresour. Technol. 81, 171-177, **2002**.
 27. D. J. Hill, "Preparation of indigo from woad", Beitrage zur Waidtagung, 4/5, 23-26, **1992**.
 28. S.K. Nicholson, P. John, "Bacterial indigo reduction", Biocatal Bio transform, 22, 397-400, **2004**.
 29. P. Garcia-Macias, P. John, "Formation of natural indigo derived from woad in relation to product purity", Agric. Food chem, 52, 7891-7896, **2004**.
 30. K.G. Gilbert, H.G. Maule, B. Rudolph, M. Lewis, H. Vandenburg, E. Sales, "Quantitative analysis of indigo precursors in leaves of Isatis spp. And Polygonum tinctorium", Biotech. Prog. 20, 1289-1292, **2004**.
 31. S. Tozzi, B. Lercari, L.G. Angelini, "Light quality influences indigo precursors production and seed germination in Isatis tinctoria and Isatis indigotica fort", Photochem. Photobiol. 81, 914-919, **2005**.
 32. E. Sales, R. Kanhou, C. Baixauli, A. Giner, D. Cooke, K. Gilbert, I. Arrilaga, J. Segura, R. Ros, "Sowing date, transplanting, plant density and nitrogen fertilization affect indigo production from Isatis species in a Mediterranean region of Spain", Indust. Crop. Prod. 23, 29-39, **2006**.
 33. D. Fischer, "Naturfarben auf wolle und seide- farben ohne giftige zusatze (german edition)", erweiterte Neuauflage edn. Aarau, AT Verlag, **2006**.
 34. J. Balfour-Paul, "Indigo", Archetype Publications Ltd, London, **2006**.
 35. L.G. Angelini, S. Tozzi, N. Nassi, "Differences in leaf yield and indigo precursors production in woad and Chinese woad genotypes", Field Crop. Res. 101, 285-295, **2007**.
 36. R. S. Blackburn, T. Bechtold, P. John, "The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products", Color Technol. 125, 193-207, **2009**.
 37. L. Rocha, C. Carvalho, S. Martins, F. Braga, V. Carnide, "MorpHo-agronomic characterization and variation of indigo precursors in woad", Plant Genet. Resour. 9, 206-209, **2011**.
 38. N. Comlekcioglu, L. Efe, S. Karaman, "Extraction of Indigo from Some Isatis species and Dyeing Standardization Using Low-technology Methods", Brazilian Archives of Biol. Technol. 58, 96-102, **2015**.
 39. N. Chanayath, S. L. Hieochaiphant, S. PHutrakul, "Pigment Extraction Techniques from the Leaves of Indigofera tinctoria Linn. and Bap Hicacanthus cusia Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components", CMU, 1, 149-160, **2002**.
 40. M. N. MacDonald, "Indigo planting in India", Pearsons Magazine. **1900**.
 41. A. G. Perkin, A.E. Everest, "Natural Organic Coloring Matters" Longmans, Green and Co: London, **1918**.
 42. E. Wu, K. Komolpis, H. Y. Wang, "Chemical extraction of indigo from Indigofera tinctoria while attaining biological integrity", Biotechnol. Tech. 13, 567-569, **1999**.
 43. P. G. Putri, E. Warsiki, Sugiarto, "The stability of extract Indigofera tinctoria for color indicator", IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 347, 18-21, **2018**.
 44. O. Adeyanju, S. E. Emmanuel, S. F. Akomolafe, "Extraction of indigo dye (powdered form) from the leaf of Indigofera tinctoria", Inter. J. Phys. Sci. 6, 137-144, **2011**.
 45. K. Son, Y. Shin, D. Yoo, "Effect of pH condition on natural indigo reduction by Yeast (Saccharomyces cerevisiae)", Fibers Polym. 20, 2570-2580, **2019**.
 46. A. Kiyomathi, M. Parvinzadeh Geshti, K. Koranjik, "Introduction of Vesme plant as a natural source of indigo dye in wool dyeing and the effects of auxiliary materials in dyeing", Iran Dye Industries Research Institute, the first specialized seminar on environment and color, **1382**.
 47. M. Hayati, "Dyeing of fibers with natural dyes", Tehran, Institute of applied scientific higher education, **1385**.
 48. H. Barani, M. Nasiri Broumand, "Optimization of dyeing conditions of wool fibers with natural dye Woad", Standard research institute, national conference of applied research and standardization in industrial development, 175-176,

- 1392.
49. H. Purnama, S. Safitri, Sofia Rahmawati, N. Hidayati, "Effect of initial treatment in the preparation of natural indigo dye from *Indigofera tinctoria*. in AIP Conference Proceedings", AIP Publishing LLC, **2017**.
 50. L. Hidayati, D. Ningrum, H. Nugroho, T. Nuringtyas, "Optimization of Extraction Methods and Dyeing Standardization of Nile Leaves (*Indigofera tinctoria* Linn.) as Natural Dyes", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **2018**.
 51. Z. Ahmadi, M. Mola, "Optimization of dye extraction conditions from indigo plant and dyeing quality evaluation", Adv. Mater. New Coat. 8, 2320-2332, **2019**.
 52. D. Dhanraj, S. Kaliaperumal, "Comparative evaluation of various extraction methods on quantity and quality of Indigo dye from *Indigofera tinctoria* L", J. Tropical Agric. 59, **2022**.
 53. A. Hendrawan, N. Setiofitria, "The comparison between chemical and natural extraction in textile dyeing with *Indigofera*", 6th Bandung Creative Movement, **2019**.
 54. A. Q. Syafaatullah, M. Mahfud, "Optimization extraction of *Indigofera tinctoria* L. using microwave-assisted extraction", IOP Conference Series, Materials science and engineering, **2021**.
 55. S. Dutta, S. Roychoudhary, B. K. Sarangi, "Effect of different physico-chemical parameters for natural indigo production during fermentation of *Indigofera* plant biomass", Biotech. 7, 323, **2017**.
 56. S. Dutta, E. M. N. Farag, B. K. Sarangi, "Enhancement of indigo dye yield from *Indigofera* plant biomass by using fungal elicitors during fermentation", Indian J. Exp. Biol. 57, 619-624, **2019**.
 57. L. Pattanaik, S. Naik, P. Hariprasad, S. Padhi, "Influence of various oxidation parameter (s) for natural indigo dye formation from *Indigofera tinctoria* L. biomass", Environ. Challenges, 100157, **2021**.
 58. K. Nakagawa, M. Takeuchi, M. Kikuchi, S. Kiyofuji, M. Kugo, T. Sakamoto, K. Kano, J. Ogawa, E. Sakuradani, "Mechanistic insights into indigo reduction in indigo fermentation: a voltammetric study", Electrochem. Doi: 10.5796/electrochemistry.20-00123, **2021**.
 59. L. Pattanaik, S. N. Naik, P. Hariprasad, "Valorization of waste *Indigofera tinctoria* L. biomass generated from indigo dye extraction process—potential towards biofuels and compost", Biomass Convers. Biorefin. 9, 445–457, **2019**.
 60. A. K. Rajan, L. Cindrella, "Studies on new natural dye sensitizers from *Indigofera tinctoria* in dye-sensitized solar cells", Opt. Mater. 88, 39-47, **2019**.
 61. B. C. Das, N. Reji, R. Philip, "Optical limiting behavior of the natural dye extract from *Indigofera tinctoria* leaves", Opt. Mater. 114, 110925, **2021**.
 62. J. Zhou, F. Qu, "Analysis of the extracts of *Isatis tinctoria* by new analytical approaches of HPLC, MS and NMR", Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. 8, 33-45. **2011**.

How to cite this article:

Z. Ahmadi, M. Mehdipour, M. molla, A Review of the Dye Extraction Methods from the Indigo and Woad Plant, *J. Stud. Color world*, 12, 3(2022), 223-240.

DOR: 20.1001.1.22517278.1401.12.3.2.1