

بررسی افزایش کارآیی استخراج عصاره‌ی چغندر قرمز به کمک امواج فراصوت و بتاسیکلودکسترین

پریزاد توتونچی^۱، لیلا روفه گری نژاد^{۲*}، حامد همیشه کار^۳، آیناز علیزاده^۲

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳- استاد مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۷)

چکیده

چغندر قرمز به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعالی مثل ترکیبات فنلی و بتالائینی دارای خواص تغذیه‌ای و سلامتی بخش می‌باشد. بنابراین بهبود بازده استخراج و پایداری ترکیبات زیست فعال چغندر قرمز مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در مطالعه حاضر از روش استخراج به کمک امواج فراصوت و بتاسیکلودکسترین برای استخراج عصاره‌ی چغندر قرمز استفاده گردید و عصاره‌های خشک شده با روش خشک کردن انجمادی توسط FTIR و اسپکترومتری UV-Vis مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های استخراج شده با حلال آب حاوی ۵ درصد بتاسیکلودکسترین بیشترین مقدار بتانین ($2/24 \pm 0/04$ میلی‌گرم بر ماده‌ی خشک)، فنل کل ($1/28 \pm 20/03$ میلی‌گرم اسید گالیک بر ماده‌ی خشک) و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH ($4/94 \pm 59/87$ درصد) را نسبت به سایر نمونه‌ها نشان دادند. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت که روش استخراج با کمک امواج فراصوت و بتاسیکلودکسترین تکنیک مناسبی برای استخراج و بهبود پایداری ترکیبات فعال چغندر قرمز برای کاربرد این ترکیبات در تولید محصولات غذایی و زمینه‌های دارویی و پزشکی می‌باشد.

کلید واژگان: استخراج، بتاسیکلودکسترین، بتانین، پایداری، ترکیبات فنلی، چغندر قرمز

*مسئول مکاتبات: l.rofegari@yahoo.com

۱- مقدمه

چغندر قرمز (*Beta vulgaris*) گیاهی از تیره اسفناج می‌باشد، که به طور عمده در آسیا و اروپا کشت می‌شود [۱]. وجود مقادیر بالای ترکیبات زیست فعال از جمله بتالائین‌ها، پلی فنل‌ها، کاروتنوئیدها و فلاونوئیدها این گیاه را دارای خواص بالقوه سلامتی بخش کرده است [۲]. بتالائین‌ها ترکیبات رنگین نیتروژن‌دار محلول در آب هستند که شامل دو گروه رنگی بتاسیانین‌های قرمز و بتاگزانتین‌های زرد رنگ می‌باشند [۳]. بتانین قسمت عمده بتالائین‌ها (۷۵-۹۵٪) را تشکیل می‌دهد، که توسط اتحادیه اروپا به عنوان یک رنگ غذایی تحت عنوان E162 معرفی شده است [۴]. همچنین سازمان غذا و دارو ایالات متحده (FDA¹) این رنگدانه را برای مصرف در محصولات لبنی مانند ماست، بستنی و برخی دیگر از محصولات غذایی مثل آب‌نبات، پاستیل، دسرهای ژلاتینی، پودرهای آماده نوشیدنی، سس و فرآورده‌های گوشتی پیشنهاد داده است [۵]. بتالائین‌ها شامل گروه‌های فنلی و آمینی حلقوی بوده و دارای فعالیت بالای مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۶]. بتالائین‌ها در غلظت‌های پایین مانع پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش فعالیت آنزیم‌های کبد شده و دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی نیز می‌باشند [۷]. همچنین این ترکیبات با تحریک انسولین بعد از مصرف مواد غذایی باعث کاهش قابل توجهی از قند خون می‌شوند [۸]. با وجود این ویژگی‌ها، پایداری بتالائین‌ها و ترکیبان فنلی چغندر قرمز به شدت تحت تأثیر فاکتورهایی مانند فعالیت آبی، نور، آنزیم، pH، درجه حرارت، یون‌های فلزی و اکسیژن قرار دارد [۹]. بنابراین پایداری پایین این ترکیبات چالش بزرگی برای استخراج، فرآوری و نگه‌داری عصاره چغندر قرمز می‌باشد [۱۰].

روش معمول استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع گیاهی روش استخراج جامد-مایع با حلال‌های آلی و حرارت می‌باشد [۱۱]. معایب عمده این روش زمان فرآیند طولانی، تخریب ترکیبات زیست فعال در طول فرآیند و کاربرد حلال‌های آلی سمی می‌باشد [۱۲]. این معایب باعث ابداع روش‌های نوین سبز برای استخراج ترکیبات زیست فعال شده است [۱۱].

استخراج به کمک امواج فراصوت به عنوان روشی نوین بر اساس مکانیسم کاویتاسیون باعث افزایش کارایی استخراج می‌شود [۱۳]. مطالعات متعددی از روش استخراج به کمک امواج فراصوت برای استخراج بتالائین‌ها و ترکیبات فنلی از منابع گیاهی مثل پوست کینوا رنگی [۱۱]، تفاله چغندر [۱۴] و چغندر قرمز [۱۳] استفاده کرده‌اند. با این حال ترکیب روش استخراج با کمک امواج فراصوت با سایر روش‌ها کارایی استخراج را بدون اثر منفی بر پایداری ترکیبات زیست فعال افزایش می‌دهد [۱۲].

سیکلودکسترین‌ها با ابعاد و حفرات نانو مجموعه‌ای از الیگوساکاریدها هستند که توسط اصلاح آنزیمی انواع نشاسته در مقیاس صنعتی و با خلوص بالا تولید می‌شوند [۱۵]. این الیگوساکاریدهای حلقوی شامل ۱۶-۳ واحد گلوکزی بوده و انواع متداول آن‌ها α -سیکلودکترین، β -سیکلودکترین و γ -سیکلودکترین می‌باشد [۱۶]. β -سیکلودکسترین‌ها با توجه به قیمت پایین، سازگاری بهتر با بدن انسان و واکنش ساده‌تر نسبت به دو نوع دیگر به طور گسترده‌تری مورد توجه قرار گرفته است [۱۷]. سیکلودکسترین‌ها با توجه به ساختار فضایی خود ویژگی‌های جالب و منحصره‌فردی دارند، به طوری که سطح خارجی سیکلودکسترین‌ها آب‌دوست بوده و سطح داخلی آن آب‌گریز می‌باشد [۱۸]. به همین دلیل سیکلودکسترین‌ها کاربرد وسیعی در استخراج ترکیبات فعال و ایجاد کمپلکس با گستره وسیعی از ترکیبات دارند [۱۹]. به طوری که ترکیبات هیدروفیل همانند بتالائین‌ها و آنتوسیانین‌ها با سطح خارجی سیکلودکسترین‌ها تشکیل پیوند داده و ترکیبات هیدروفوب نیز در سطح داخلی سیکلودکسترین‌ها قرار می‌گیرند که این تمایل برای تشکیل پیوند بین ترکیبات فعال و سیکلودکسترین‌ها باعث افزایش کارایی استخراج این ترکیبات فعال از منابع گیاهی شده و باعث تشکیل کمپلکس می‌گردد [۲۰]. ایجاد کمپلکس میان سیکلودکسترین‌ها و ترکیبات زیست فعال علاوه بر افزایش پایداری این ترکیبات در برابر شرایط محیطی، همچنین باعث افزایش زیست دسترسی این ترکیبات نیز می‌شود [۱۶]. در سال‌های اخیر از بتا سیکلودکسترین برای افزایش کارایی استخراج ترکیبات زیست فعال از انار [۱۶]، تفاله زیتون [۱۲] و تفاله انگور قرمز [۲۱] استفاده شده است.

گردیده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (مدل PIT320، ساخت کشور ایران) گردید [۲۲]. برای تشکیل کمپلکس، بتاسیکلودکسترین (۱ و ۵ درصد) به عصاره اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت با همزن مغناطیسی همگن گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با ۷۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شده و محلول رویی حاصل توسط خشک‌کن انجمادی خشک شد. عصاره‌ی بدون بتاسیکلودکسترین نیز تحت همان شرایط با خشک‌کن انجمادی (مدل Laboconco، ساخت کشور آمریکا) خشک گردید. پودرهای عصاره خشک شده در ظرف‌های پلاستیکی در بسته در دمای اتاق تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند [۱۵ و ۱۷].

۲-۲-۲- استخراج و تشکیل کمپلکس همزمان

عصاره‌ی چغندر قرمز با بتاسیکلودکسترین
در این قسمت برای استخراج و تشکیل کمپلکس همزمان عصاره‌ی چغندر قرمز با سیکلودکسترین، پودر خشک شده‌ی چغندر قرمز با محلول ۱ و ۵ درصد بتاسیکلودکسترین و آب مقطر یا اتانول ۸۰ درصد به نسبت ۱ به ۱۰ به مدت ۳ ساعت با همزن مغناطیسی مخلوط گردیده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه بدون اعمال حرارت در حمام اولتراسونیک با فرکانس ۲۸ کیلوهرتز قرار گردید. عصاره بدست آمده با کاغذ صافی واتمن و پمپ خلأ صاف گردیده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. در آخر عصاره حاصل با روش خشک کردن انجمادی خشک گردیده و پودر عصاره‌ی چغندر قرمز حاصل شد [۱۶].

تاکنون در مطالعه‌ای کاربرد بتاسیکلودکسترین را برای استخراج عصاره‌ی چغندر قرمز مورد توجه قرار نگرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی استخراج عصاره‌ی چغندر قرمز با روش استخراج به کمک فراصوت و بتاسیکلودکسترین می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

بتانین، بتاسیکلودکسترین، DPPH، فولین سیوکالتو (Sigma)، ایالات متحده آمریکا) و اتانول (Merck، آلمان) تهیه گردید. چغندر قرمز مورد استفاده نیز در بهمن ماه ۱۳۹۷ از بازار محلی سطح شهر تبریز خریداری شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- استخراج عصاره‌ی چغندر قرمز با حلال و

تشکیل کمپلکس با بتاسیکلودکسترین

چغندر قرمز بعد از شستشو و پوست‌گیری به صورت خلال در آمده، در محل تاریک و در دمای اتاق به مدت یک هفته تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید و سپس با آسیاب به صورت پودر در آمد. برای استخراج عصاره، پودر چغندر قرمز تهیه شده به نسبت ۱ به ۱۰ با دو محلول آب مقطر و اتانول ۸۰ درصد به مدت ۳ ساعت با همزن مغناطیسی (مدل Heidolph، ساخت کشور آلمان) مخلوط گردیده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه بدون اعمال حرارت در حمام اولتراسونیک (مدل Parsonic 30s، ساخت کشور ایران) با فرکانس ۲۸ کیلوهرتز قرار گرفت. عصاره بدست آمده با کاغذ صافی واتمن و پمپ خلأ (مدل Milipore، ساخت کشور فرانسه) صاف

Table 1 Red beet extract samples

Sample name	Solvent	β -cyclodextrin concentration (%)	Complex formation type
W	Water	-	-
W/BCD1	Water	1	After extraction
W/BCD5	Water	5	After extraction
E	Ethanol	-	-
E/BCD1	Ethanol	1	After extraction
E/BCD5	Ethanol	5	After extraction
WBCD1	Water	1	With extraction
WBCD5	Water	5	With extraction
EBCD1	Ethanol	1	With extraction
EBCD5	Ethanol	5	With extraction

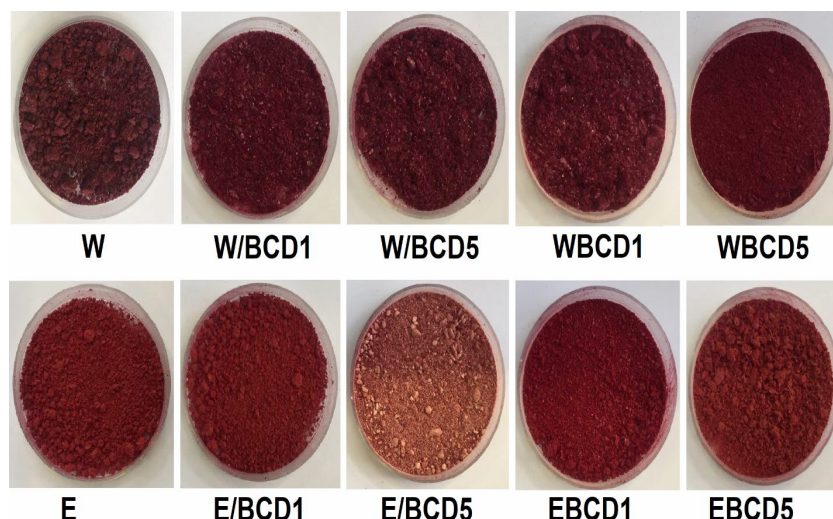


Fig 1 photograph images of red beet extract powders.

از محلول پودرهای تهیه شده (۲۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) با ۰/۸ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ درصد سدیم کربنات و ۲ میلی‌لیتر معرف فولین سیوالتو مخلوط شده و سانتی‌فورژ گردید. جذب نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگاهداری در دمای محیط، توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر، خوانده شد. با قرار دادن نتایج حاصل در منحنی کالیبراسیون، میزان فنل کل موجود در نمونه‌های مورد بررسی بر حسب میلی‌گرم، گالیک اسید به دست آمد [۲۳].

۲-۲-۶- بررسی میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پودر عصاره‌های استخراج شده تحت شرایط استاندارد با استفاده از روش DPPH تعیین گردید. ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از نمونه‌های تهیه شده در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل شده و سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول با ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی حاوی DPPH (۰/۰۱mM) مخلوط گردید. سپس تغییرات جذب بعد از ۴۵ دقیقه نگاهداری در تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر نور مرئی خوانده شده و با قرار دادن مقادیر بدست آمده در رابطه زیر درصد بازدارندگی DPPH به دست آمد [۲۴]:

معادله (۱)

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} = \text{درصد بازدارندگی}$$

جذب کنترل

۲-۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل

۲-۲-۳- ارزیابی با طیف سنجی تبدیل فوریه مادون

قرمز (FTIR)

برای بررسی ساختار شیمیایی نمونه‌های پودر از آنالیز FTIR (مدل Bruker، ساخت کشور آلمان) استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از متد قرص پتاسیم بروماید (KBR pellet method) آماده شدند. ۳ میلی‌گرم از نمونه‌ها بر روی قرص پتاسیم بروماید ریخته شده و در نهایت به صورت قرص کوچک‌تر با ضخامت ۱ میلی‌متر فشرده شد. در نهایت طیف FTIR نمونه‌های پودر، با استفاده از یک طیف‌سنج مادون قرمز با رزولیشن ۴ در محدوده ۴۰۰۰ تا ۴۰۰cm⁻¹ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۲-۴- بررسی میزان بتانین

ابتدا نمونه‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی (مدل Ultrospec 2000 ساخت کشور انگلیس) اسکن گردید. سپس برای تعیین میزان بتانین پودر عصاره‌های استخراج شده، ابتدا با استفاده از استاندارد بتانین و دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی (حداکثر جذب بتانین در طول موج ۵۳۸ نانومتر)، منحنی استاندارد بتانین رسم شد. سپس با بهره‌گیری از این منحنی مقادیر بتانین عصاره‌های استخراج شده محاسبه گردید [۵].

۲-۲-۵- بررسی میزان فنل کل

برای این منظور ابتدا منحنی کالیبراسیون توسط مقادیر مختلف اسیدگالیک بر حسب میلی‌گرم رسم گردید. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر

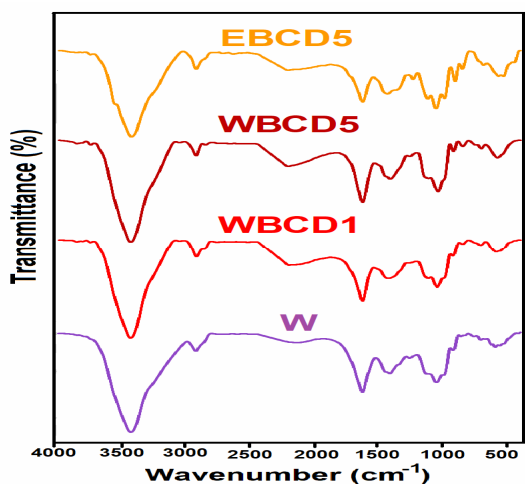


Fig 2 Fourier transforms infrared (FT-IR) spectra of W, WBCD1, WBCD5 and EBCD5 samples. W: water, E: Ethanol, BCD: β -cyclodextrin.

۳-۲- بررسی میزان بتانین

تصویر اسکن نمونه‌های عصاره پودر شده با اسپکتروفتومتر UV-Vis در شکل ۳ نشان داده شده است. طیف‌های حاصل از نمونه‌های عصاره دو پیک قوی در دو طول موج‌های ۴۷۸ و ۵۳۸ نانومتر نشان دادند که با توجه به این که این دو طول موج به ترتیب ماکزیم جذب دو ترکیب بتاگراتین و بتانین می‌باشد، بنابراین نتیجه گواه حضور این دو ترکیب فعال در نمونه‌ها می‌باشد [۱۳]. بیشترین و کمترین میزان جذب در این دو طول موج (۴۷۸ و ۵۳۸ نانومتر) به ترتیب مربوط به نمونه‌های WBCD5 و E/BCD5 می‌باشد.

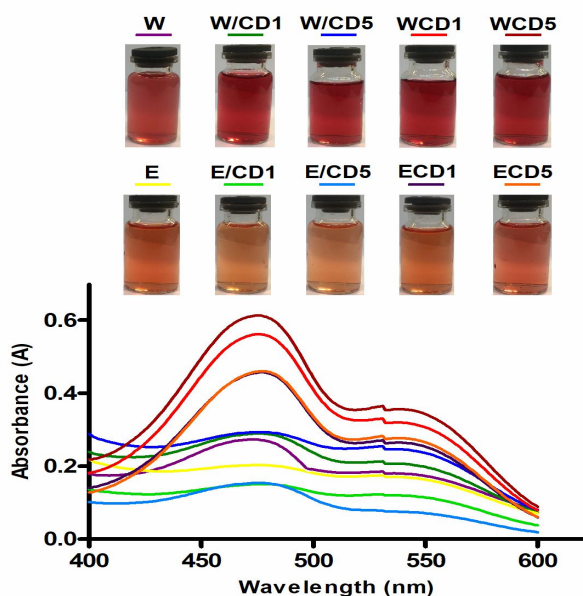


Fig 3 UV-Vis spectra of powder samples. W: water, E: Ethanol, BCD: β -cyclodextrin.

خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS در سطح احتمال ۹۵٪ ($P < 0.05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- یابی با طیف سنجی تبدیل فوریه مادون

قرمز

طیف‌های حاصل از ارزیابی با FTIR در شکل ۲ نشان داده شده است. طیف‌های حاصل از تمامی نمونه‌ها پیک‌های قابل ملاحظه‌ای در نواحی 3400 ، 1600 ، 2900 ، 3400 cm^{-1} ، 1400 ، 1050 ، 920 و 850 نشان دادند. پیک گسترده و قوی مشاهده شده در 3400 cm^{-1} نشان‌دهنده‌ی حالت ارتعاش کششی گروه O-H می‌باشد، پیک نزدیک ناحیه‌ی 2900 cm^{-1} نیز مربوط به ارتعاش گروه C-H می‌باشد [۲۰]. همچنین پیک‌های مشاهده شده در 1600 cm^{-1} و 1400 به ترتیب بیانگر حضور گروه‌های C=C و C-C می‌باشد [۲۵]. پیک‌های ناحیه‌های 1050 cm^{-1} و 920 را نیز می‌توان به ترتیب به حالت کششی C-N آمین و حالت کششی کربوکسیلیک اسیدها نسبت داد [۲۰]. حضور گروه‌های آمینی N-H نیز با پیک مشاهده شده در 850 cm^{-1} تایید شد. طیف حاصل از نمونه‌ی استخراج شده با آب خالص پیک معنی‌داری را در 1264 cm^{-1} نشان داد که می‌تواند بیانگر حالت ارتعاشی C-O کربوکسیلیک اسیدها باشد [۲۶]. با این حال این پیک نمونه‌های WBCD1 و EBCD5 به ترتیب به نواحی 1121 و 1125 شیفیت یافته است. این نتایج را می‌توان به پیوندهای احتمالی (پیندهای هیدروژنی) بین گروه‌های OH بتاسیکلودکسترین و گروه‌های کربوکسیلیک اسید ترکیب بتانین موجود در عصاره چغندر قرمز نسبت داد. همچنین طیف حاصل از نمونه‌ی EBCD5 پیک معنی‌داری در ناحیه 1238 cm^{-1} که بیانگر حالت ارتعاشی C-O گروه‌های الکلی می‌باشد را نشان داد، این پیک را می‌توان به حلال مورد استفاده در استخراج این نمونه که الکل ۸۰ درصد بود نسبت داد.

در راستای این نتایج، Albahari و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که استخراج با کمک امواج فراصوت و سیکلودکسترین بازده استخراج ترکیبات فنلی تفاله زیتون را از طریق تشکیل کمپلکس سیکلودکسترین- پلی‌فنل‌ها افزایش داد [۱۲]. در مطالعه‌ای دیگر استخراج با حلال حاوی سیکلودکسترین میزان استخراج کاتچین و اپی‌کاتچین را از تفاله انگور قرمز افزایش داد [۲۱].

۳-۳- بررسی میزان فنل کل

میزان فنل کل عصاره‌های استخراج شده به منظور بررسی میزان بازده استخراج ترکیبات فنلی اندازه‌گیری شد، که نتایج حاصل در نمودار شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، میزان فنل کل نمونه‌ی استخراج شده با آب خالص $1/43 \pm 11/88$ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم ماده‌ی خشک بود. افزودن ۱ و ۵ درصد بتاسیکلودکسترین به حلال آب به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) میزان فنل کل را به ترتیب به مقادیر $1/40 \pm 15/80$ و $1/28 \pm 20/03$ میلی‌گرم اسید گالیک بر ماده‌ی خشک افزایش داد. میزان فنل کل نمونه‌ی استخراج شده با اتانول ۸۰ درصد نیز $1/08 \pm 9/53$ میلی‌گرم اسید گالیک بر ماده‌ی خشک بود و این مقدار برای نمونه‌های استخراج شده با اتانول ۸۰ درصد حاوی ۱ و ۵ درصد بتاسیکلودکسترین به ترتیب $1/63 \pm 14/74$ و $2/13 \pm 16/41$ میلی‌گرم اسید گالیک بر ماده‌ی خشک بود. بنابراین، حلال آب نسبت به حلال اتانول عملکرد بهتری در استخراج ترکیبات فنلی داشته است. با توجه به نتایج، افزودن بتاسیکلودکسترین به هر دو حلال آب و اتانول ۸۰ درصد میزان استخراج ترکیبات فنلی را افزایش داد که خود این اثر نیز با افزایش غلظت بتاسیکلودکسترین افزایش یافت. این یافته‌ها را می‌توان به پتانسیل بتاسیکلودکسترین برای تشکیل کمپلکس با ترکیبات فنلی نسبت داد که باعث افزایش بازده استخراج این ترکیبات به دلیل افزایش حلالیت و پایداری آن‌ها در طول فرآیند استخراج شد. همچنین افزودن بتاسیکلودکسترین بعد از فرآیند استخراج در عصاره‌های استخراج شده با آب تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد ($p > 0/05$) ولی در عصاره‌های استخراج شده با اتانول باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) میزان ترکیبات فنلی عصاره‌های مذکور شد. با توجه به نتایج حاصل، کمترین و بیشترین میزان فنل کل مربوط به نمونه‌های E/BCD5 و WBCD5 بود. در این راستا، مطالعات گذشته گزارش

نمودار شکل ۴ نیز میزان بتانین محاسبه شده‌ی نمونه‌های عصاره را نشان می‌دهد که با توجه به این شکل روند میزان بتانین در بین نمونه‌ها به شکل زیر می‌باشد:

WBCD5 > WBCD1 > EBCD5 > EBCD1 > W/BCD5 > W/BCD1 > W > E > E/BCD1 > E/BCD5

با توجه به نتایج می‌توان گفت که حلال آب نسبت به اتانول ۸۰ درصد در همه شرایط استخراج عملکرد خوبی در میزان استخراج بتانین داشته است. از سویی دیگر افزودن بتاسیکلودکسترین به هر دو حلال استخراج (آب و اتانول ۸۰ درصد) به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) میزان استخراج ترکیبات بتانینی را افزایش داده است. همچنین افزودن بتاسیکلودکسترین بعد از فرآیند استخراج در عصاره‌های استخراج شده با آب به طور معنی‌داری باعث افزایش میزان بتانین عصاره‌ها شده ($p < 0/05$) ولی در عصاره‌های استخراج شده با اتانول باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) میزان بتانین عصاره‌های مذکور گردید. بتاسیکلودکسترین دارای قابلیت تشکیل کمپلکس با گستره وسیعی از ترکیبات زیست فعال را دارد (هیدروفیل یا هیدروفوب)، که ترکیبات هیدروفیل مثل بتانین با سطح بیرونی بتاسیکلودکسترین توسط پیوند هیدروژنی کمپلکس تشکیل می‌دهد [۱۸] این پدیده‌ی ذکر شده در قسمت نتایج ارزیابی با FTIR با نشان دادن تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه‌های OH بتاسیکلودکسترین و گروه‌های کربوکسیل بتانین ثابت شده است. با توجه به این یافته‌ها، بهبود بازده استخراج بتانین با این روش را می‌توان با افزایش پایداری بتانین در طی استخراج و خشک کردن توجیه کرد.

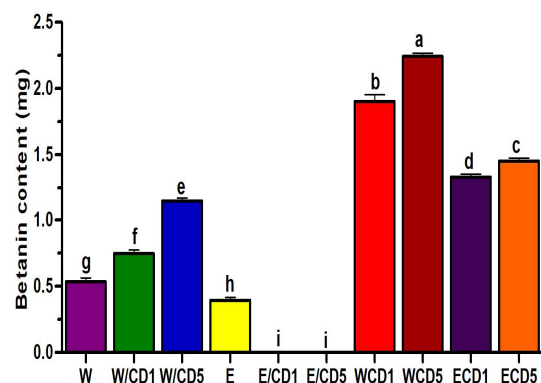


Fig 4 Betanin content of powder samples. Data are expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$) and different letters show significant difference at the 5% level in Duncan's test ($p < 0.05$). W: water, E: Ethanol, BCD: β -cyclodextrin.

بستگی دارد، که ترکیبات فنلی نسبت به بتالائین‌ها دارای توانایی بیشتری برای مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشند؛ با این حال بتالائین‌ها نیز دارای توانایی بالایی برای کاهش یون‌های فلزی می‌باشند [۲]. بنابراین نتایج حاصل از ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نتایج حاصل از ارزیابی میزان بتانین و فنل کل را نیز تایید می‌کند. به طور کلی، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش استخراج به کمک بتاسیکلودکسترین می‌تواند به چند مکانیسم مربوط باشد که عبارتند از: ۱) تشکیل کمپلکس با بتالائین‌ها و افزایش بازده استخراج آن‌ها؛ ۲) افزایش بازده استخراج پلی‌فنل‌ها به دلیل تشکیل کمپلکس با آن‌ها و افزایش حلالیت آن‌ها؛ ۳) بهبود پایداری بتالائین‌ها و ترکیبات فنلی در طول فرآیند استخراج و خشک کردن. در این راستا، El Darra و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج شده با بتاسیکلودکسترین از تفاله هلو به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های استخراج شده با حلال اتانول بود؛ که این نتایج به اثر حفاظتی بتاسیکلودکسترین برای ترکیبات فنلی در برابر تخریب حرارتی، نور و اکسیداسیون نسبت داده شده است [۲۸].

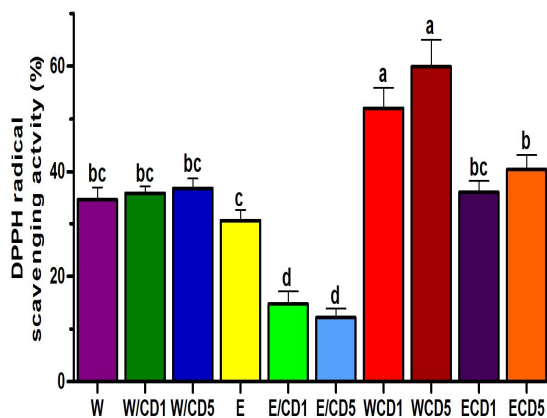


Fig 6 DPPH radical scavenging activity of powder samples. Data are expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$) and different letters show significant difference at the 5% level in Duncan's test ($p < 0.05$). W: water, E: Ethanol, BCD: β -cyclodextrin.

۳-۵- بررسی پارامترهای رنگی

نتایج حاصل از ارزیابی پارامترهای رنگی (L^* ، a^* و b^*) نمونه‌های پودر عصاره در جدول ۲ نشان داده شده است. پارامتر رنگی L^* معادل میزان روشنایی بوده و بین صفر

کرده‌اند که بتاسیکلودکسترین دارای پتانسل بالایی برای استخراج ترکیبات فنلی از میوه انار [۱۶]، *Sideritis scardica* [۲۷] و تفاله هلو [۲۸] می‌باشد.

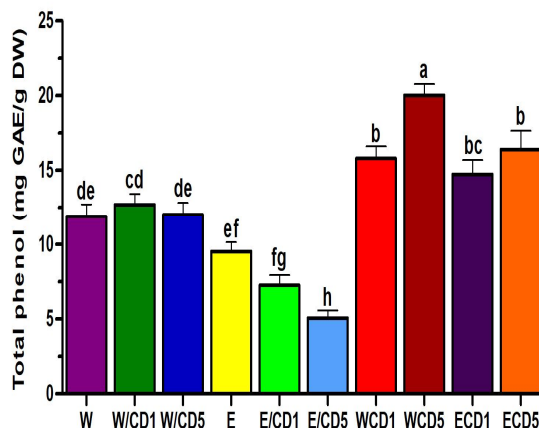


Fig 5 Total phenol content of powder samples. Data are expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$) and different letters show significant difference at the 5% level in Duncan's test ($p < 0.05$). W: water, E: Ethanol, BCD: β -cyclodextrin.

۳-۴- بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی

با هدف ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره، آزمون DPPH برای نمونه‌های عصاره انجام گرفت که نمودار شکل ۶ نتایج حاصل از این ارزیابی را نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت مهار کنندگی نمونه‌های استخراج شده با آب و اتانول ۸۰ درصد به ترتیب $4/03 \pm 34/68$ و $3/54 \pm 30/53$ درصد می‌باشد. افزودن بتاسیکلودکسترین به هر دو حلال معنی‌داری ($p < 0/05$) میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها را افزایش داد. همچنین این اثر با افزایش میزان غلظت بتاسیکلودکسترین در هر دو حلال افزایش یافت. از سویی دیگر افزودن بتاسیکلودکسترین بعد از فرآیند استخراج در عصاره‌های استخراج شده با آب تفاوت معنی‌داری در خاصیت آنتی‌اکسیدانی ایجاد نکرد ($p > 0/05$) ولی در عصاره‌های استخراج شده با اتانول باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مذکور شد. با توجه به این نتایج بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به نمونهی WBCD5 ($4/94 \pm 59/87$ درصد) و کمترین مقدار نیز مربوط به نمونهی E/BCD5 بود. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی چغندر قرمز به میزان بتالائین‌ها و ترکیبات فنلی

استخراج یک روند افزایشی در نمونه‌های عصاره نشان داد. از سویی دیگر افزودن بتاسیکلودکسترین بعد از فرآیند استخراج در عصاره‌های استخراج شده با آب باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) میزان پارامتر a^* شد، ولی در عصاره‌های استخراج شده با اتانول باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) میزان این پارامتر رنگی شد. با توجه به این که عامل رنگ قرمز عصاره‌ی چغندر قرمز وجود رنگدانه بتانین در آن می‌باشد، بنابراین این نتایج می‌تواند مربوط به بازده استخراج بالای بتانین با افزودن بتاسیکلودکسترین باشد که باعث ظهور بیشتر رنگ قرمز در نمونه‌ها می‌شود. در مورد پارامتر رنگی b^* قابل ذکر است که مقادیر مثبت این پارامتر رنگی معادل رنگ زرد و مقادیر منفی آن معادل رنگ آبی می‌باشد. مقدار این پارامتر برای نمونه‌های استخراج شده با اتانول ۸۰ درصد به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از نمونه‌های استخراج شده با آب بود، همچنین افزودن بتاسیکلودکسترین به حلال استخراج نیز به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) باعث افزایش این پارامتر رنگی شد. بتانین‌ها متشکل از دو گروه عمده بتانین قرمز رنگ و بتاگراتین زرد رنگ می‌باشند که جزء بتانین بیشترین مقدار را شامل می‌شود [۹]. بنابراین افزایش مقدار پارامتر b^* با افزودن بتاسیکلودکسترین را می‌توان به افزایش بازده استخراج بتاگراتین نسبت داد.

(مشکی) تا صد (انعکاس نور کامل) می‌باشد. مقدار این پارامتر برای نمونه‌های استخراج شده با حلال‌های آب و اتانول ۸۰ درصد به ترتیب $1/68 \pm 22/14$ و $1/59 \pm 27/17$ درصد بود. پارامتر L^* نمونه‌های استخراج شده با حلال آب حاوی بتاسیکلودکسترین اختلاف معنی‌داری با مقدار این پارامتر در نمونه‌ی استخراج شده با آب خالص نشان نداد ($p > 0.05$). با این حال افزودن ۱ درصد بتاسیکلودکسترین به حلال اتانول ۸۰ درصد میزان پارامتر L^* را افزایش داد ولی با افزودن ۵ درصد بتاسیکلودکسترین به حلال ذکر شده هیچ اختلاف معنی‌داری در مقدار پارامتر L^* نمونه‌های عصاره مشاهده نشد ($p > 0.05$). همچنین افزودن بتاسیکلودکسترین بعد از فرآیند استخراج در عصاره‌های استخراج شده با هر دو حلال به جز نمونه‌ی W/BCD1 باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) میزان پارامتر L^* شد. که این پدیده مربوط به رنگ طبیعی بتاسیکلودکسترین (رنگ سفید) می‌باشد که باعث افزایش میزان روشنایی شده است. مقادیر پارامتر رنگی a^* نامحدود بوده و مقادیر مثبت معادل رنگ قرمز و مقادیر منفی معادل رنگ سبز می‌باشد. مقدار این پارامتر برای نمونه‌های استخراج شده با آب و اتانول ۸۰ درصد به ترتیب $1/35 \pm 21/63$ و $1/43 \pm 17/46$ بود. این پارامتر با افزودن بتاسیکلودکسترین به هر دو حلال

Table 2 Color parameters of powder samples.

Powder samples	Color parameters		
	L^*	a^*	b^*
W	22.14 ± 1.68^c	21.63 ± 1.35^d	1.20 ± 0.27^l
W/BCD1	22.19 ± 1.71^c	23.15 ± 0.88^{cd}	0.61 ± 0.09^f
W/BCD5	31.23 ± 1.31^c	24.48 ± 1.01^c	2.16 ± 0.20^c
E	27.17 ± 1.59^d	17.46 ± 1.43^c	5.25 ± 0.36^d
E/BCD1	35.61 ± 1.20^b	13.70 ± 1.02^f	8.35 ± 0.70^b
E/BCD5	42.63 ± 0.98^a	17.37 ± 1.55^c	12.55 ± 0.73^a
WBCD1	21.66 ± 1.69^c	27.19 ± 1.81^b	$.46 \pm 0.05^f$
WBCD5	23.63 ± 0.98^c	29.60 ± 1.25^a	2.46 ± 0.43^c
EBCD1	32.04 ± 1.42^c	16.61 ± 1.16^c	6.27 ± 0.45^c
EBCD5	28.78 ± 1.22^d	22.38 ± 1.72^{cd}	7.83 ± 0.98^b

Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3) and different letters show significant difference at the 5% level in Duncan's test ($p < 0.05$). W: water, E: Ethanol, BCD: β -cyclodextrin.

۴- نتیجه‌گیری

اسپکترومتر UV-Vis مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از ارزیابی میزان بتانین، فنل کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی پودر عصاره‌های استخراج شده نشان داد که استخراج به کمک بتاسیکلودکسترین میزان بازده استخراج بتانین و ترکیبات فنلی را افزایش داد که این پدیده نیز باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های ذکر شده گردید. با

عصاره‌ی چغندر قرمز با موفقیت به روش استخراج با کمک امواج فراصوت و بتاسیکلودکسترین استخراج گردید. عصاره‌های استخراج شده با روش خشک کردن انجمادی خشک گردیده و پودرهای حاصل توسط تکنیک‌های FTIR و

- Materials Science and Engineering C. 97(June 2018): 833–841.
- [8] Indumathi, D., Sujithra, K., Srinivasan, S., & Vinothkumar, V. (2018). Betanin exhibits significant potential as an antihyperglycemic and attenuating the glycoprotein components in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 28(7): 547–554.
- [9] Khan, M. I. (2016a). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: 316-330.
- [10] Mereddy, R., Chan, A., Fanning, K., Nirmal, N., & Sultanbawa, Y. (2017). Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris L.*) using membrane separation technology. *Food Chemistry*. 215: 311–317.
- [11] Laqui-vilca, C., Aguilar-tuesta, S., Mamani-navarro, W., Montaña-bustamante, J., & Condezo-hoyos, L. (2018). Industrial Crops & Products Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) hulls. *Industrial Crops & Products*. 111(May 2017): 606–614.
- [12] Albahari, P., Jug, M., Radić, K., Jurmanović, S., Brnčić, M., Brnčić, S. R., Ferreira, C. F. R. (2018). Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction. *LWT - Food Science and Technology*. 92: 22–31.
- [13] Righi, H., Camila, S., & Bolanho, B. C. (2018). Ultrasonic-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris L.*). *Journal of Food Process Engineering*. 41: 1–6.
- [14] Kushwaha, R., Kumar, V., Vyas, G., & Kaur, J. (2017). Optimization of Different Variable for Eco-friendly Extraction of Betalains and Phytochemicals from Beetroot Pomace. *Waste and Biomass Valorization*. 9: 1485–1494.
- [15] Watson, M. A., Lea, J. M., & Bett-Garber, K. L. (2017). Spray drying of pomegranate juice using maltodextrin/cyclodextrin blends as the wall material. *Food Science and Nutrition*, 5(3): 820–826.
- توجه به این نتایج می‌توان گفت که استخراج با کمک امواج فراصوت و بتاسیکلودکسترین تکنیکی با بازده بالا برای استخراج و بهبود پایداری ترکیبات زیست فعال چغندر قرمز می‌باشد، که باعث کاربرد این ترکیبات در محصولات غذایی فراسودمند و بهره‌مندی از پتانسیل تغذیه‌ای و دارویی آن‌ها می‌گردد.

۵- منابع

- [1] Lourenço, E., Amanda, R., Teodoro, R., Henrique, P., Félix, C., Victória, R., Botrel, D. A. (2017). Stability of spray-dried beetroot extract using oligosaccharides and whey proteins. *Food Chemistry*. 249: 51–59.
- [2] Chhikara, N., Kushwaha, K., Sharma, P., Gat, Y., & Panghal, A. (2019). Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chemistry*. 272(February 2018): 192–200.
- [3] Güneşer, O. (2016). Pigment & color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. *Food Chemistry*. 196: 220-227.
- [4] Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W.-S. (2017). The effect of pH treatment & refrigerated storage on natural colourant preparations (betacyanins) from red pitahaya & their potential application in yoghurt. *LWT-Food Science & Technology*. 80: 437-445.
- [5] Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*. 256(November 2017): 156–162.
- [6] Guerrero-rubio, M. A., Hernández-garcía, S., García-, F., Gandía-herrero, F., Guerrero-rubio, M. A., Hernández-garcía, S., Biología, U. D. De. (2018). Extension of life-span using a RNAi model and in vivo antioxidant effect of Opuntia fruit extracts and pure betalains in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chemistry*. 274: 840–847.
- [7] Amjadi, S., Hamishehkar, H., & Ghorbani, M. (2019). A novel smart PEGylated gelatin nanoparticle for co-delivery of doxorubicin and betanin: A strategy for enhancing the therapeutic efficacy of chemotherapy.

- Journal of food science & technology. 51(9): 2216-2221.
- [23] Charoen, R., Savedboworn, W., Phuditcharnnakun, S., & Khuntawetap, T. (2015). Development of Antioxidant Gummy Jelly Candy Supplemented with Psidium guajava Leaf Extract. King Mongkut's University of Technology North Bangkok International Journal of Applied Science & Technology. 8(2): 145-151.
- [24] Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results. Food Chemistry. 130(4): 1036-1043.
- [25] Galvão, J. G., Silva, V. F., Ferreira, S. G., França, F. R. M., Santos, D. A., Freitas, L. S., Nunes, R. S. (2015). Thermochemica Acta b -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis (L.) Osbeck* essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. Thermochemica Acta. 608: 14-19.
- [26] Sengupta, D., Mondal, B., & Mukherjee, K. (2015). Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Visible light absorption and photosensitizing properties of spinach leaves and beetroot extracted natural dyes. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 148: 85-92.
- [27] Korompokis, K., Igoumenidis, P. E., Mourtzinis, I., & Karathanos, V. T. (2017). Green extraction and simultaneous inclusion complex formation of Sideritis scardica polyphenols. International Food Research Journal, 24(3), 1233-1238.
- [28] El Darra, N., Rajha, H., Debs, E., Saleh, F., El-Ghazzawi, I., Louka, N., & Maroun, R. (2018). Comparative study between Ethanollic and β - Cyclodextrin Assisted Extraction of Polyphenols from Peach Pomace. International Journal of Food Science. 1-17.
- [16] Diamanti, A. C., Igoumenidis, P. E., Mourtzinis, I., Yannakopoulou, K., & Karathanos, V. T. (2017). Green extraction of polyphenols from whole pomegranate fruit using cyclodextrins. Food Chemistry. 214: 61-66.
- [17] Saldanha do Carmo, C., Maia, C., Poejo, J., Lychko, I., Gamito, P., Nogueira, I., Duarte, C. M. M. (2017). Microencapsulation of α -tocopherol with zein and β -cyclodextrin using spray drying for colour stability and shelf-life improvement of fruit beverages. RSC Adv. 7(51): 32065-32075.
- [18] Cai, R., Yuan, Y., Cui, L., Wang, Z., & Yue, T. (2018). Cyclodextrin-assisted Extraction of Phenolic Compounds: Current Research and Future Prospects. Trends in Food Science & Technology. 79: 19-27.
- [19] Fernandes, A., Rocha, M. A. A., Santos, L. M. N. B. F., Brás, J., Oliveira, J., Mateus, N., & de Freitas, V. (2018). Blackberry anthocyanins: β -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. Food Chemistry. 245: 426-431.
- [20] Webber, V., de Siqueira Ferreira, D., Barreto, P. L. M., Weiss-Angeli, V., & Vanderlinde, R. (2018). Preparation and characterization of microparticles of β -cyclodextrin/glutathione and chitosan/glutathione obtained by spray-drying. Food Research International. 105: 432-439.
- [21] López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Guardiola, L., Pérez-Sánchez, H., Fortea, I., Núñez-Delgado, E. (2016). Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. Food Chemistry. 203: 379-385.
- [22] Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M. M. T., Gabr, A. M., Ahmed, A. R., Knorr, D., & Smetanska, I. (2014). Effects of different encapsulation agents & drying process on stability of betalains extract.

Extraction of red beet extract with β -cyclodextrin-enhanced ultrasound assisted extraction

Tutunchi, P. ¹, Roufegarinejad, L. ^{2*}, Hamishehkar, H. ³, Alizadeh, A. ²

1. PhD, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Associated Professor, Department of Food Sciences, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

(Received: 2019/05/04 Accepted:2020/01/07)

Red beet has nutritional and health benefits due to presence of bioactive components such as phenolic and betalain compounds. Thus, the improving of extraction efficiency and stability of red beet compounds has gained the attention of researchers. In this study, β -CD-enhanced ultrasound assisted extraction was used for extraction of red beet extract and the lyophilized extracts were characterized with FTIR and UV-Vis spectrophotometry analyses. The extracted samples with aqueous 5 % β -CD solutions revealed highest content of betanin (2.24 ± 0.04 mg /g DW) and total phenolic compounds (20.03 ± 1.28 mg GAE/g DW) and as well highest DPPH inhibition activity (59.87 ± 4.94 %). In conclusion, the β -CD-enhanced ultrasound assisted extraction is a suitable technique to extraction and stabilize the red beet compounds for applications in functional food, nutraceutical, and medical fields.

Keywords: β -cyclodextrin, Betanin, Extraction, Phenolic Compounds, Red Beet, Stability

*Corresponding Author E-Mail Address: l.rofeghari@yahoo.com