

بهبه‌یابی شرایط استخراج بتاسیانین از چغندر قرمز با استفاده از سیال فوق بحرانی به روش سطح پاسخ

محبوبه ضرابی اول^۱، علی محمدی ثانی^۲ و مسعود نجف نجفی^{۳*}

۱ و ۲- به ترتیب: دانش آموخته کارشناسی ارشد؛ و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
۳- دانشیار صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۵

چکیده

برای بهبود یابی شرایط استخراج بتاسیانین از چغندر قرمز (*Beta vulgaris*) با استفاده از روش سطح پاسخ، سه متغیر مستقل دما (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس)، زمان (۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه) و فشار (۹۰، ۱۳۵ و ۱۸۰ بار) برای مدل‌سازی به کار گرفته شد و پس از آن از طرح باکس-بنکن استفاده گردید. بهبود یابی شرایط استخراج بر مبنای حداکثر راندمان استخراج، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی، بیشترین مقدار بتاسیانین و کمترین شاخص IC₅₀ تعیین شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که افزایش دما (از ۴۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس)، زمان (از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه) و فشار (از ۹۰ تا ۱۳۵ بار) به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) راندمان استخراج را افزایش می‌دهند. افزایش فشار از ۹۰ تا ۱۳۵ بار، دما از ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس و زمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) سبب افزایش مقدار فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار بتاسیانین عصاره گردید. شرایط بهبود یافته استخراج دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی در دمای ۵۸/۷۴ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۶۰ دقیقه در فشار ۱۳۲/۹۹ بار برای عصاره چغندر قرمز انتخاب شد. تحت این شرایط راندمان استخراج ۱/۸۷، ترکیبات فنلی ۳۵/۶۷، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۰/۱۲+ و مقدار بتاسیانین ۳/۳۴ به دست آمد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان، بتاسیانین، رنگ خوراکی، طرح باکس بانکن

مقدمه

غذایی که می‌خورند لذت ببرند. امروزه قوانین سختگیرانه‌ای در خصوص استفاده از رنگ‌های خوراکی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی وضع شده است. اتحادیه اروپا و بسیاری از

یکی از اصلی‌ترین ویژگی‌های ارزیابی کیفیت مواد غذایی، رنگ آن است. با استفاده از رنگ‌های جذاب، مصرف‌کنندگان می‌توانند از طعم و مزه

زمان استخراج طولانی، آلودگی محصول به حلال و راندمان نسبتاً پایین سبب شده تا محققان توجه خود را معطوف فناوری‌های نوینی کنند که سبب بهبود کارایی استخراج از طریق بهبود انتقال جرم می‌شوند و این روش‌ها معمولاً دوست‌دار محیط زیست نیز هستند. استخراج بتالائین‌ها از چغندر قرمز با چندین روش گزارش شده است مانند: استخراج به روش انتشار، اولترافیلتراسیون و اسمز معکوس، میدان الکتریکی با شدت پایین، استخراج آب دو فازی، میدان الکتریکی پالسی، روش تسهیل شده با پرتو گاما و روش تسهیل شده با مایکروویو و فراصوت با راندمان استحصال‌های متفاوت (Azeredo, 2009; Ravichandran *et al.*, 2012). یکی از روش‌هایی که برای تولید مواد مفید و ضروری از مخلوط‌ها و مواد مرکب مورد توجه قرار گرفته است و امروزه به کار می‌رود، استخراج با سیال فوق بحرانی است. سیال فوق بحرانی، ماده‌ای است که در دماها و فشارهای بالاتر از نقطه بحرانی به صورت گاز یا مایع نیست بلکه حد واسط این دو حالت است، به طوری که از لحاظ خصوصیات نفوذپذیری مانند گازها و از لحاظ قدرت انحلال مواد مانند مایعات است. حلالیت مواد در این فاز با تغییر چگالی، که خود تحت کنترل دما و فشار است، تغییر می‌کند و بعد از نفوذ ماده مورد نظر به داخل فاز، در انتهای عصاره‌گیری می‌توان با تغییر دما و فشار، فاز فوق بحرانی را به صورت گاز خارج کرد و عصاره را بدون حلال به دست آورد (Coelho *et al.*, 2012). سیال‌های فوق بحرانی قدرت استخراج قابل مقایسه‌ای با روش‌های قدیمی استخراج با مایع را دارند، درحالی که کینتیک استخراج شبیه گاز از خود ارائه می‌دهند (Shrigod *et al.*, 2016). سیال فوق بحرانی قادر است در طول سطح مشترک پخش شود

کشورها استفاده از رنگ‌های سنتزی را به عنوان افزودنی در این صنایع محدود کرده‌اند. به همین دلیل، تقاضا برای رنگ‌های طبیعی افزایش یافته است و استخراج رنگ‌های طبیعی با روش‌های نوین سازگار با محیط زیست و سالم از منابع مختلف، به دلیل اشکالاتی که در روش‌های معمولی استخراج وجود دارد، مورد توجه محققان قرار گرفته است (Borges *et al.*, 2012).

چغندر قرمز (*Beta vulgaris* L.) گیاهی از تیره اسفناج (Chenopodiaceae) است. ترکیبات زیست فعال موجود در چغندر قرمز (بتالائین و ترکیبات فنلی) خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند و فساد اکسیداتیو چربی‌ها را کاهش می‌دهند (Fakhari *et al.*, 2010). بتالائین‌ها، عامل رنگ قرمز و زرد چغندر قرمز هستند. بتالائین‌ها در محدوده pH بین ۷ تا ۳ پایدار هستند که مزیت آنها نسبت به آنتوسیانین‌ها محسوب می‌شود، اما پایداری حرارتی آنها پایین است. بتالائین‌های چغندر قرمز متشکل از دو گروه عمده یعنی بتا گزانتین (مثل ولگاگزانتین I و II) و بتاسیانین‌ها (بتانین و ایزوبتانین) هستند که به ترتیب رنگ زرد و طیف بنفش- قرمز را ایجاد می‌کنند. در بین اینها، بتانین، ایزوبتانین و ولگاگزانتین-I حدود ۹۵ درصد رنگدانه‌های چغندر قرمز را تشکیل می‌دهند. همانند رنگدانه‌های طبیعی، بتالائین‌ها نیز برای استفاده در مواد غذایی به عنوان رنگدانه در آمریکا و اتحادیه اروپا پذیرفته شده‌اند (Herbach *et al.*, 2006; Sumaya-Martínez *et al.*, 2011). بتالائین‌ها، معمولاً با آب استخراج می‌شوند اگرچه که استفاده از حلال‌هایی مانند متانول و اتانول نیز برای بهبود استخراج توصیه می‌شود (Delgado-Vargas *et al.*, 2000) با این همه، مشکلات سیستم‌های استخراج متداول مانند

که این عمل نسبت به مایعات واقعی راحت تر است، زیرا آنها دارای کشش سطحی کمتری نسبت به مایعات هستند. با این همه، سیالی فوق بحرانی مانند مایعات این توانایی را دارد که می تواند موادی را که در خود حل شده اند جدا کند درحالی که گازها این توانایی را ندارند (Shrigod *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017). انتخاب حلال مهم ترین موضوع در طراحی فرایند استخراج فوق بحرانی است. حلال هایی که به عنوان سیال فوق بحرانی استفاده می شوند باید دارای خصوصیات باشند مانند: حلالت خوب، بی اثر بودن بر فرآورده ها، جداسازی آسان از نمونه، ارزان بودن و فشار بحرانی پایین. علاوه بر شرایط یاد شده، سازگاری با محیط زیست از نکات مورد توجه در انتخاب سیال فوق بحرانی به شمار می آید که در این میان دی اکسید کربن بسیار مورد استقبال قرار گرفته است زیرا این ماده دارای نقطه بحرانی پایین (دمای ۳۱/۱ درجه سلسیوس و فشار ۷۳/۸ بار)، ارزان قیمت، پایدار، غیر قابل اشتعال و از نظر زیست محیطی نیز قابل پذیرش است و به راحتی به سیستم برگردانده می شود (Su *et al.*, 2010). برای استخراج ترکیبات غیرقطبی و قطبی به ترتیب می توان از دی اکسید کربن و حلال های کمکی مانند متانول استفاده کرد. حلال کمکی در فرایند استخراج فوق بحرانی، سبب افزایش قطبیت سیال فوق بحرانی مانند دی اکسید کربن می شود و معمولاً هنگامی استفاده می شود که جزء حل شونده قطبی باشد و قدرت انحلال سیال فوق بحرانی غیرقطبی با تغییر دما و فشار افزایش پیدا نکند. حلال های کمکی همچنین با ایجاد برهم کنش خاص روی ترکیبات مورد نظر قدرت انتخاب پذیری حلال و سرعت استخراج را افزایش می دهند

(Nematollahi *et al.*, 2013). استخراج با دی اکسید کربن فوق بحرانی به دلیل داشتن مزایایی مانند غیر سمی بودن، خلوص بالا، سرعت عملیات، صرفه جویی در مصرف حلال و قیمت پایین مورد استقبال قرار گرفته است. از جمله تحقیقات در این زمینه می توان از مدل سازی استخراج فوق بحرانی مانتول از برگ درخت چنار (Ghoreishi & Sharifi, 2001)، استخراج مانتول از برگ زیتون (Ghoreishi *et al.*, 2009) و استخراج آنتی اکسید اپی گالوکاتچین گالات از برگ چای سبز (Ghoreishi & Heidari 2012) نام برد.

هدف از این پژوهش استفاده از دی اکسید کربن فوق بحرانی و بهینه یابی شرایط استخراج ترکیبات رنگی و زیست فعال موجود در چغندر قرمز است.

مواد و روش ها

مواد

چغندر قرمز از بازار محلی در مشهد خریداری شد. اتانول، متانول، معرف فولین سیوکالچو، سدیم کربنات و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. رادیکال آزاد DPPH^۱ نیز از شرکت سیگما (آلمان) تهیه شد.

آماده سازی چغندر قرمز

جنس و گونه چغندر قرمز (*Beta Vulgaris* var. *conditiva*) توسط مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تأیید شد. از آب برای شستشوی ریشه های چغندر قند استفاده گردید. چغندر قرمز پس از پوست گیری به صورت اسلایس های یکسان و یکنواخت برش داده شد و در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) به مدت یک هفته تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. اسلایس های خشک شده با آسیاب خانگی به صورت پودر درآمد.

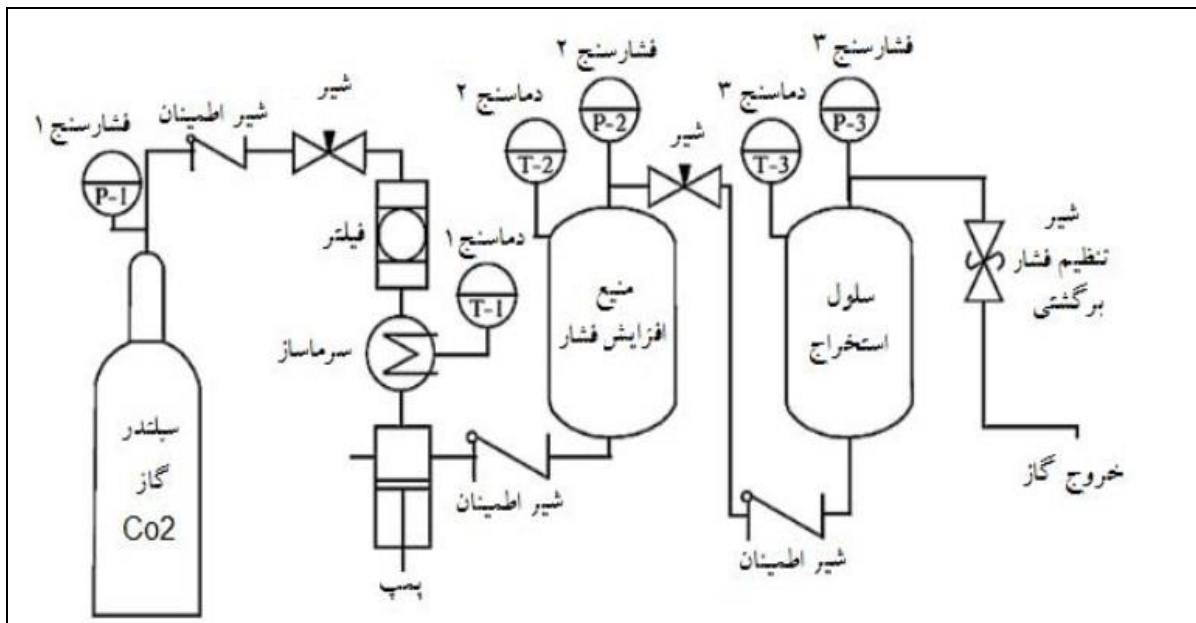
استخراج عصاره چغندر قرمز با سیال فوق بحرانی

بتاسیانین توسط دستگاه استخراج با سیال فوق بحرانی که در آزمایشگاه دانشکده مهندسی دانشگاه فردوسی مشهد طراحی و ساخته شده، استخراج شد که طرحواره آن در شکل ۱ آمده است. حلال استخراج دی اکسید کربن بود که در درون سیلندر ۴۵ کیلوگرمی (خوراکیان، جاده قوچان، ایران) قرار داشت. برای هر بار استخراج، ۵ گرم نمونه پودری (با اندازه ذرات بزرگتر از ۰/۶ میلی-متر، مش ۳۰) در کاغذ صافی پیچیده و درون مخزنی قرار داده شد که برای استخراج تعبیه شده بود. از آنجایی که بتاسیانین‌ها ترکیبات قطبی هستند، استفاده از حلال کمکی می‌تواند بازده استخراج را بهبود بخشد. در این مطالعه، ۱۰ درصد حلال مشترک (اتانول/آب، ۹۰/۱۰ حجمی/حجمی) بدین منظور در نظر گرفته

شد. این نسبت حلال بر اساس مطالعه اولیه انتخاب شد. آزمایش استخراج سه بار تکرار شد. همه نمونه‌های عصاره با استفاده روتاری تحت خلأ (Laborota 4000, Schwabach, Germany) برای تبخیر باقیمانده حلال آلی تغلیظ شدند. عصاره‌های تغلیظ شده حاصل برای مطالعات بیشتر با استفاده از خشک کن انجمادی خشک گردیدند.

راندمان استخراج عصاره

برای اندازه‌گیری راندمان استخراج عصاره چغندر قرمز، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره در آون تحت خلأ در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. میزان راندمان از طریق وزن ماده خشک به مقدار اولیه پودر محاسبه و به صورت درصد گزارش شد (Moßhammer *et al.*, 2005).



شکل ۱ - طرحواره دستگاه استخراج به کمک سیال فوق بحرانی

اندازه‌گیری میزان بتاسیانین

کالیبراسیون استفاده و شاخص IC₅₀ برای هر عصاره تعیین شد. شاخص IC₅₀ به‌عنوان حداقل غلظتی تعریف می‌شود که قادر است ۵۰ درصد فعالیت رادیکال DPPH را کاهش دهد. مقدار IC₅₀ برای هر نمونه به صورت g/mL بیان شد (Roussos, 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

شرایط استخراج با دی اکسید کربن فوق بحرانی برای عصاره چغندر قرمز با روش سطح پاسخ^۲ با استفاده از طرح باکس-بنکن توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت^۳ (نسخه ۱۰) بهینه‌یابی شد. این پژوهش بر اساس ۳ سطح استفاده از زمان استخراج (۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه)، ۳ سطح دمای استخراج (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس) و ۳ سطح فشار (۹۰، ۱۳۵ و ۱۸۰ بار) و ۵ تکرار در نقطه مرکز اجرا شد، از این رو حجم نمونه‌های مورد بررسی برابر با ۱۷ است. تیمارهای حاصل از این طرح در جدول ۱ ارائه شده است. مدل رگرسیونی درجه دوم برای پیش بینی پاسخ‌ها (راندمان استخراج، مقدار فنل کل، مقدار بتاسیانین و IC₅₀) فرض شد که به صورت رابطه (۱) بیان می‌شود.

$$Y_i = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3 + A_{11}X_{12} + A_{22}X_{22} + A_{33}X_{32} \quad (1)$$

که در آن،

Y_i = متغیرهای وابسته (Y_1): راندمان استخراج عصاره؛ Y_2 = مقدار فنل کل؛ Y_3 = مقدار بتاسیانین؛ و Y_4 = شاخص IC₅₀؛ A_0 = شاخص پاسخ برآزش شده در نقطه مرکز طرح معادل نقطه (۰، ۰، ۰)؛ A_1 ، A_2 و A_3 = ضریب‌های خطی؛ A_{12} ، A_{13} و A_{23} = ضریب‌های متقابل طرح؛ A_{11} ، A_{22} و A_{33} = ضریب‌های درجه دوم؛ و X = متغیرهای مستقل

رنگدانه بتاسیانین در محدوده طول موج ۵۳۴-۵۲۲ نانومتر دارای بیشترین میزان جذب در اسپکتروفتومتر است. برای اندازه‌گیری میزان بتاسیانین، جذب هر نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و مقدار بتاسیانین به صورت میکروگرم در گرم بیان شد (Moßhammer *et al.*, 2005).

ارزیابی میزان فنل کل

به‌منظور تعیین مقدار ترکیبات فنلی عصاره از روش فولین سیوکالچو^۱ استفاده شد. برای این منظور ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه به ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچو اضافه شد که با نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شده بود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه در دمای محیط، ۰/۷۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۲ درصد به مخلوط فوق اضافه شد. بعد از ۴۵ دقیقه نگهداری نمونه در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر (UV-VIS Shimatzo، مدل UV-160A، ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد. از غلظت‌های مختلف اسید گالیک (۱۰۰-۰ ppm) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. مقدار ترکیبات فنلی عصاره به صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر میلی‌لیتر (mg GAE/mL) بیان شد (Lu *et al.*, 2011).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف عصاره چغندر قرمز از طریق واکنش مهار رادیکال آزاد DPPH تعیین شد. برای این منظور مقدار مشخصی از عصاره با محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH مخلوط و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه در تاریکی جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. از غلظت‌های مختلف DPPH (۱۰۰-۰ ppm) برای رسم نمودار

(X_1 = دمای استخراج، X_2 = زمان استخراج و X_3 = اطمینان ۹۵ درصد اجرا و کارایی مدل به فشار).
 وسیله R^2 و $adjusted-R^2$ محاسبه و ارزیابی
 آزمون معنی‌داری براساس خطای کل در سطح شد.

جدول ۱- تیمارهای تصادفی آزمایش در طرح باکس-بنکن

تیمار	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	فشار (بار)
۱	۸۰	۴۰	۹۰
۲	۶۰	۴۰	۱۳۵
۳	۶۰	۶۰	۱۸۰
۴	۸۰	۲۰	۱۳۵
۵	۶۰	۴۰	۱۳۵
۶	۶۰	۲۰	۹۰
۷	۴۰	۴۰	۹۰
۸	۸۰	۴۰	۱۸۰
۹	۸۰	۶۰	۱۳۵
۱۰	۶۰	۲۰	۱۸۰
۱۱	۴۰	۲۰	۱۳۵
۱۲	۶۰	۴۰	۱۳۵
۱۳	۶۰	۴۰	۱۳۵
۱۴	۶۰	۴۰	۱۳۵
۱۵	۴۰	۴۰	۱۸۰
۱۶	۶۰	۶۰	۹۰
۱۷	۴۰	۶۰	۱۳۵

نتایج و بحث

استخراج و بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره چغندر قرمز

شرایط استخراج براساس روش سطح پاسخ و نتایج بررسی تأثیر فرآیند استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی (CO_2) روی راندمان استخراج عصاره چغندر قرمز و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار فنلی و مقدار بتاسیانین عصاره بهینه‌یابی شد و نتایج تحلیل آماری بهینه‌یابی براساس طرح باکس-بنکن گزارش شد. نتایج حاصل از این مطالعه

برای بررسی تأثیر شرایط فرآیند استخراج (دما، زمان و فشار استخراج) بر راندمان استخراج عصاره چغندر قرمز و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار ترکیبات فنلی و مقدار بتاسیانین آن به صورت تصاویر سه بعدی و دو بعدی ارائه شده است و در ادامه به ارزیابی هر یک از این نتایج پرداخته خواهد شد. نتایج حاصل از تحلیل واریانس داده‌ها (جدول ANOVA) مربوط به هر پاسخ و همچنین ضریب‌های مدل رگرسیونی معادل درجه دوم برای هر یک از پاسخ‌ها به ترتیب در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس متغیرهای وابسته در استخراج عصاره چغندر قرمز

منبع	راندمان (درصد)	مقدار فنل کل (میلی گرم گالیک اسید)	IC ₅₀ (گرم در میلی لیتر)	مقدار بتاسیانین (میکروگرم بر گرم)
Model	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۱۵۷	۰/۰۲۳۶	۰/۰۲۵۱
A	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۲۶۴	۰/۰۱۸۷	۰/۰۴۱۷
B	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۱۰۰	۰/۰۴۴۴۶	۰/۰۲۶۳
C	۰/۰۳۱۹	۰/۰۳۶۱۵	۰/۰۳۸۹	۰/۰۱۵۴
AB	۰/۰۳۱۱	۰/۶۹۱۳	۰/۱۳۸۲	۰/۲۱۶۲
AC	۰/۲۴۴۹	۰/۶۹۱۱	۰/۰۷۵۲	۰/۸۳۲۷
BC	۰/۲۲۸۴	۰/۵۵۴۱	۰/۶۷۷۰	۰/۷۲۰۴
A ²	۰/۹۵۱۹	۰/۰۰۲۴	۰/۰۵۷۱	۰/۰۲۷۷
B ²	۰/۶۹۶۷	۰/۲۱۸۸	۰/۷۳۴۲	۰/۶۹۶۰
C ²	۰/۰۰۰	۰/۰۲۰۳	۰/۲۱۵۷	۰/۰۰۲۶
R ²	۰/۸۹	۰/۸۲۶	۰/۸۹۱۵	۰/۹۱۵۶
Adj-R ²	۰/۵۵۷	۰/۷۴۵	۰/۸۲۴۹	۰/۸۶۹۲
CV	۶/۵۹	۰/۸۴	۴۷۴۴	۸/۳۱

جدول ۳- ضرایب رگرسیونی معادله درجه دوم برای پاسخ‌های استخراج عصاره چغندر قرمز

منبع	راندمان (درصد)	مقدار فنل کل (میلی گرم گالیک اسید)	IC ₅₀ (گرم در میلی لیتر)	مقدار بتاسیانین (میکروگرم بر گرم)
Intercept	۱/۶۳	۳۵/۱۱	۰/۳۸	۳/۱۵
A ₁	۰/۲	-۰/۰۰۱۲۵	۰/۱۲	-۰/۰۵۵
A ₂	۰/۲۵	۰/۳۶	-۰/۰۲۰	۰/۲۳
A ₃	۰/۰۷۴	۰/۱۰۰	۰/۰۵۸	-۰/۱۳
A ₁₂	۰/۱۳	-۰/۳۲	۰/۱۹	-۰/۱۶
A ₁₃	-۰/۰۶۲	۰/۰۶۰	-۰/۲۴	۰/۰۲۵
A ₂₃	۰/۰۶۵	-۰/۰۹۰	۰/۰۵۰	-۰/۰۴۳
A ₁₁	-۰/۰۰۳	-۰/۶۵	۰/۲۶	-۰/۳۱
A ₂₂	۰/۰۱۹	۰/۱۹	۰/۰۴۰	-۰/۰۴۵
A ₃₃	-۰/۳	-۰/۴۲	۰/۱۵	-۰/۵۱

و متقابل دما-زمان در سطح ۹۵ درصد بر راندمان استخراج عصاره نمونه‌ها معنی‌دار هستند. در این پژوهش تأثیر متغیرهای فرآیند استخراج نیز با استفاده از سیال فوق بحرانی (CO₂) یعنی دما (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس)، زمان (۲۰، ۴۰ و ۶۰

تأثیر شرایط استخراج بر راندمان استخراج عصاره

نتایج تجزیه واریانس متغیرهای وابسته (جدول ۲) نشان می‌دهد که اثرهای خطی دما و زمان و اثر درجه دوم فشار در سطح ۹۹ درصد و اثر خطی فشار

نفوذ می‌کند و حلالیت ماده محلول را بهبود می‌بخشد. بر اثر این اتفاق، انتقال جرم و نفوذ حلال به درون ماده گیاهی افزایش پیدا می‌کند و همه این عوامل به بهبود راندمان استخراج می‌انجامند (Prasad *et al.*, 2010; Sonsuzer *et al.*, 2004). کاهش راندمان استخراج با افزایش بعد از افزایش فشار از ۱۳۵ بار ممکن است به دلیل فرار بودن و انحلال پذیر بودن ترکیبات استخراج شده و برهم کنش بین سایر عوامل باشد.

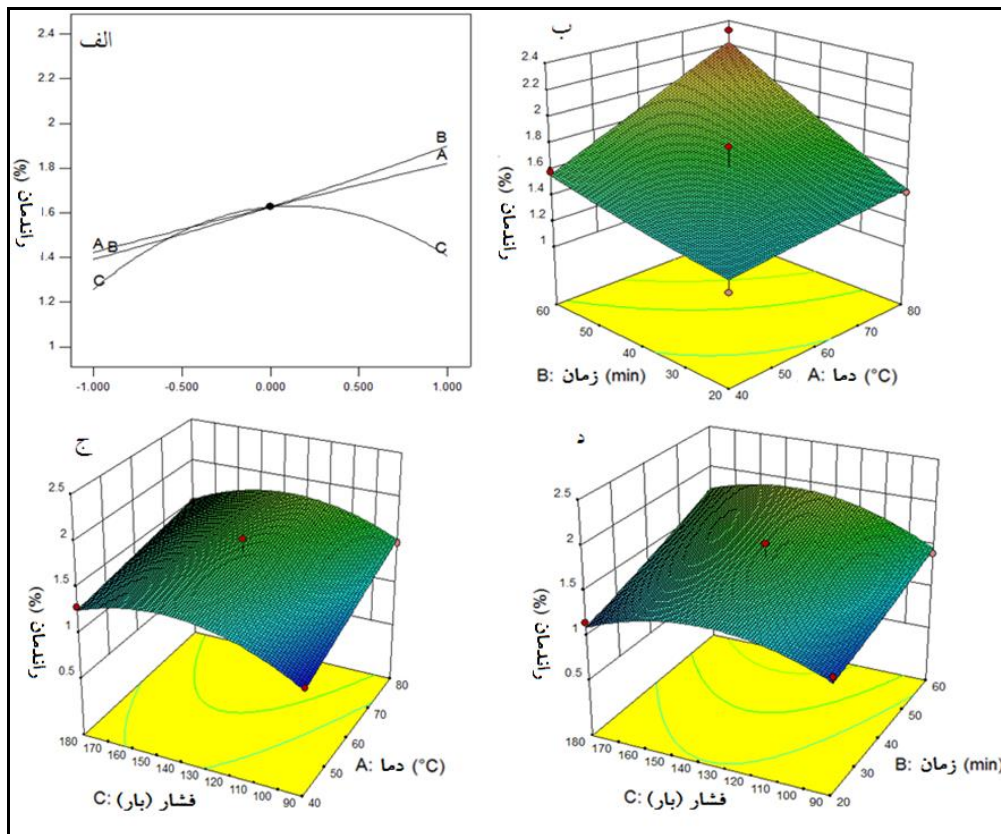
بهبود راندمان استخراج با افزایش دما ممکن است مرتبط باشد با افزایش فشار بخار و تشدید جداسازی حرارتی ترکیبات از ماتریس نمونه (Sheibani & Ghaziaskar, 2009). همچنین، افزایش دما منجر به آسیب دیدگی دیواره سلولی گیاهی خواهد شد که سرعت انتقال جرم را افزایش خواهد داد و در نتیجه زیست دسترسی ترکیبات زیست فعال برای استخراج افزایش خواهد یافت. از طرف دیگر، با افزایش دمای استخراج ویسکوزیته مخلوط حلال و عصاره کاهش می‌یابد که این امر نیز منجر به افزایش پدیده انتقال در فرآیند استخراج خواهد شد (Machmudah *et al.*, 2006). عوامل مختلفی نیز بر افزایش راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز با افزایش زمان فرآیند استخراج مرتبط هستند.

با افزایش زمان استخراج مدت زمان کافی برای نفوذ حلال به درون بافت گیاهی فراهم خواهد شد که این امر همراه خواهد بود با افزایش راندمان استخراج. افزایش زمان استخراج نیز مدت زمان کافی و لازم را برای حل شدن ترکیبات محلول فراهم می‌آورد که این امر نیز با افزایش راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز همراه خواهد بود (Heydari *et al.*, 2014).

دقیقه) و فشار سیال (۹۰، ۱۳۵ و ۱۸۰ بار) روی راندمان استخراج عصاره چغندر قرمز بررسی شد که نتایج آن در شکل ۲-الف (دو بعدی)، ۲-ب (سه بعدی دما-زمان و راندمان استخراج)، ۲-ج (سه بعدی دما-فشار سیال و راندمان استخراج) و ۲-د (سه بعدی زمان-فشار سیال و راندمان استخراج) نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده، مشخص شد که با افزایش دمای استخراج از ۴۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس و زمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه، راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز به طور معنی داری ($p < 0.05$) افزایش یافته است. اگرچه افزایش فشار سیال از ۹۰ تا ۱۳۵ بار راندمان استخراج را افزایش داده است اما با افزایش فشار از ۱۳۵ بار تا ۱۸۰ بار منجر به کاهش راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز شد ($p < 0.05$). همان طور که مشاهده می‌شود کمترین مقدار راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز (۱/۰۲ درصد) مربوط به تیمار به دست آمده توسط استخراج با سیال فوق بحرانی تحت شرایط دمای ۴۰ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۴۰ دقیقه و فشار سیال ۹۰ بار و بیشترین راندمان استخراج (۲/۳۲ درصد) مربوط به نمونه استخراج شده تحت شرایط دمای ۸۰ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۶۰ دقیقه و فشار سیال ۱۳۵ بار است. فشار یکی از فاکتورهای مؤثر در استخراج عصاره از چغندر قرمز است. افزایش فشار می‌تواند چگالی سیال را افزایش، فاصله بین مولکول‌های آن را با اثر مخرب فشار^۱ (تخریب فضاهای بین سیال و ماتریس نمونه) کاهش دهد و در نتیجه برهم کنش‌های قوی بین سیال و ماتریس نمونه ایجاد شود (Lang & Wai, 2001). در فرآیند تخریب ناشی از فشار سیال، مواد شیمیایی داخل ماده گیاهی به راحتی به داخل حلال استخراج کننده

می‌دهد. ماران و همکاران (Maran *et al.*, 2014) با مطالعه تأثیر فشار فرآیند استخراج سیال فوق بحرانی روی راندمان استخراج آنتوسیانین و ترکیبات فنلی از میوه جمبو نشان دادند که افزایش بیش از حد فشار منجر به کاهش معنی‌دار راندمان استخراج ترکیبات زیست‌فعال می‌شود.

نتایج این پژوهش با یافته‌های محققان دیگر نیز مطابقت دارد. لئو و همکاران (Luo *et al.*, 2014)، با مطالعه استخراج ترکیبات پلی‌ساکارییدی از برگ گواوا نشان دادند که افزایش دما و مدت زمان استخراج به‌طور قابل توجهی میزان راندمان استخراج ترکیبات پلی‌ساکارییدی از برگ گواوا را افزایش



شکل ۲- اثر شرایط استخراج بر راندمان استخراج عصارهٔ چغندر قرمز (A: دمای استخراج، B: زمان استخراج و C: فشار) (الف: نمودار دو بعدی، نمودارهای ب، ج و د: تأثیر متقابل متغیرها روی راندمان استخراج)

میان اثرهای متقابل و درجه دوم فقط اثر درجه دوم دما در سطح ۹۹ درصد بر فنل کل نمونه‌ها معنی‌دار است. نتایج ارزیابی مقدار ترکیبات فنلی کل موجود در عصارهٔ چغندر قرمز نشان می‌دهد که هر سه متغیر فرآیند به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بر فنل کل مؤثرند (شکل ۳). با افزایش دمای استخراج از ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس مقدار ترکیبات فنلی

تأثیر شرایط استخراج بر مقدار فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}) عصارهٔ چغندر قرمز نتایج تجزیه واریانس متغیرهای وابسته (جدول ۲) نشان می‌دهد که اثرهای خطی دما، زمان و فشار در سطح ۹۵ درصد بر هر دو پاسخ فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (IC_{50}) معنی‌دار است در حالی که در

استخراج از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) شاخص IC_{50} کاهش می‌یابد. علاوه بر این، نتایج تأثیر فشار سیال فوق بحرانی روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد که با افزایش فشار از ۹۰ تا ۱۳۵ بار به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) شاخص IC_{50} کاهش پیدا می‌کند ولی افزایش فشار سیال از ۱۳۵ تا ۱۸۰ به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) فعالیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد.

ترکیبات فنلی اجزای بسیار ریز منحصر به‌فرد تشکیل‌دهنده ساختار گیاهان و ترکیبات فیتوشیمیایی اصلی موجود در عصاره‌های گیاهی هستند که بخشی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات عامل و منبع اصلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی با منشأ گیاهی نیز هستند (Kahkonen *et al.*, 1999). این ترکیبات متابولیت‌هایی ثانویه هستند که به‌صورت وسیعی در طبیعت یافت می‌شوند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات مربوط به خصوصیات اکسایشی آنهاست که باعث می‌شود به‌عنوان ماده‌ای احیا کننده عمل کنند. ترکیبات فنلی، دهنده هیدروژن هستند و باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند و دارای خصوصیات شلاته‌کنندگی (کی‌لیت‌کنندگی) فلزات نیز هستند. بسیاری از محققان گزارش داده‌اند ارتباط زیادی بین میزان ترکیبات فنلی و میزان قدرت مهار رادیکال‌های آزاد یک اسانس وجود دارد که با افزایش میزان ترکیبات فنلی میزان قدرت مهار رادیکال‌های آزاد آن افزایش می‌یابد (Predes *et al.*, 2011). افزایش میزان ترکیبات فنلی و همچنین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش زمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه احتمالاً در ارتباط با افزایش راندمان استخراج ترکیبات از بافت چغندر قرمز باشد، زیرا با افزایش زمان استخراج ترکیبات

عصاره چغندر قرمز افزایش می‌یابد اما افزایش دمای استخراج از ۶۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس مقدار ترکیبات فنلی را کاهش می‌دهد ($p < 0.05$). با این همه، افزایش زمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه تأثیر معنی‌داری ($p < 0.05$) بر مقدار فنل کل عصاره چغندر قرمز دارد. نتایج تأثیر تغییرات فشار سیال روی مقدار فنل کل نشان می‌دهد که افزایش نسبت حلال به نمونه فشار سیال از ۹۰ تا ۱۳۵ بار، مقدار فنل کل عصاره چغندر قرمز را افزایش می‌دهد ولی افزایش فشار سیال از ۱۳۵ تا ۱۸۰ بار کاهش مقدار فنل کل عصاره چغندر قرمز را به دنبال دارد ($p < 0.05$).

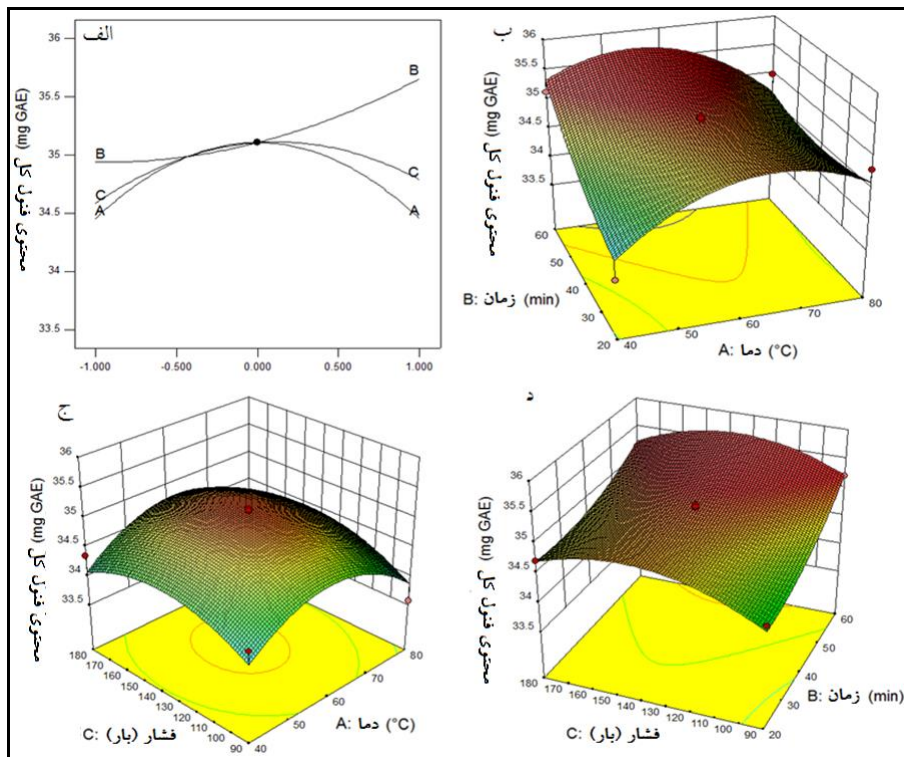
شکل ۴-الف (دو بعدی)، ۴-ب (سه بعدی دما-زمان و IC_{50})، ۴-ج (سه بعدی دما-فشار سیال و IC_{50}) و ۴-د (سه بعدی زمان-فشار سیال و IC_{50}) نتایج حاصل از تأثیر متغیرهای فرآیند استخراج با استفاده از سیال فوق بحرانی (CO_2) یعنی دمای استخراج (۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس)، زمان استخراج (۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه) و فشار سیال (۹۰، ۱۳۵ و ۱۸۰ بار) را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چغندر قرمز نشان می‌دهد. براساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مشخص شد که روند تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی کل موجود در عصاره چغندر قرمز تقریباً مشابه است. از این‌رو، همان‌طور که در شکل ۴-الف نشان داده شده است، با افزایش دمای استخراج عصاره چغندر قرمز از ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس، شاخص IC_{50} کاهش یا به‌عبارتی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش می‌یابد. اما با افزایش دما از ۶۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس از فعالیت آنتی‌اکسیدانی به شکل معنی‌داری ($p < 0.05$) کاسته می‌شود. بررسی روند تغییرات IC_{50} عصاره چغندر قرمز در نتیجه تغییر زمان استخراج مشخص کرد که با افزایش زمان

تفاله انگور مهم‌ترین ترکیبات در ارتباط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌هاست زیرا این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی عمل می‌کنند. این محققان همچنین می‌گویند ترکیبات فنلی دیگر مانند پیروسیانیدین‌ها، فلاونول‌ها و اسیدهای فنلی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر هستند. این محققان گزارش کرده‌اند که افزایش بیش از حد دما به منظور استخراج ترکیبات آنتوسیانینی ممکن است با تخریب حرارتی آنها سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مقدار ترکیبات فنلی شود.

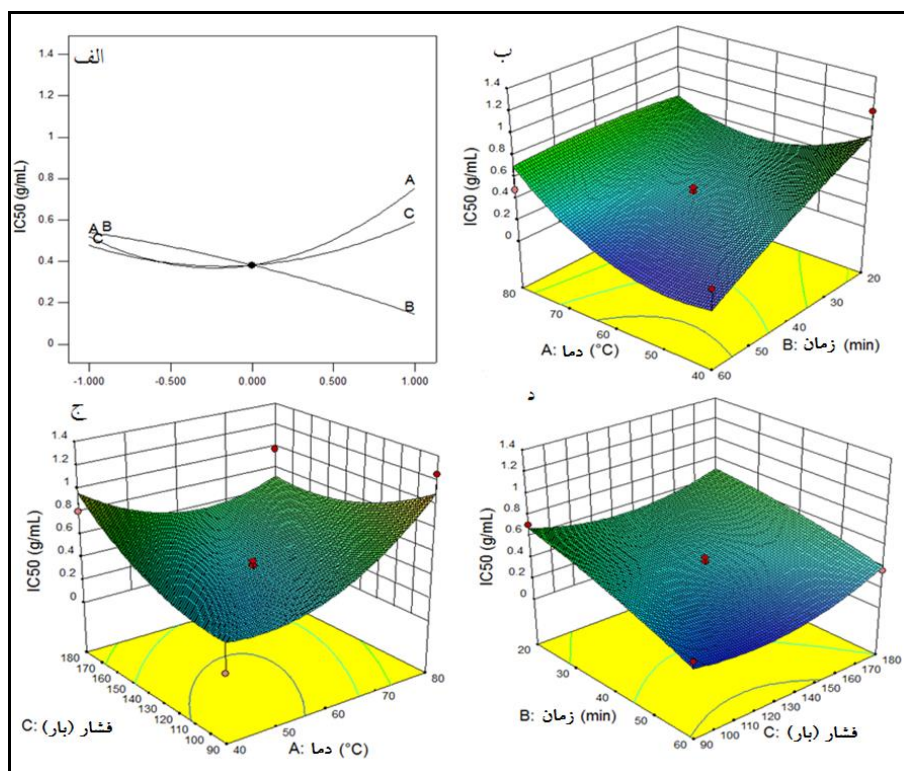
افزایش مقدار ترکیبات فنلی و کاهش IC_{50} با افزایش فشار از ۹۰ تا ۱۳۵ بار می‌تواند در ارتباط با عوامل مختلفی باشد. با افزایش فشار از ۹۰ تا ۱۳۵ بار احتمالاً چگالی دی‌اکسید کربن فوق بحرانی افزایش می‌یابد و این امر همراه با افزایش قدرت حل‌کنندگی دی‌اکسید کربن است که سبب حل شدن بیشتر ترکیبات پلی‌فنلی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خواهد شد. با این همه، افزایش بیش از حد فشار (بالاتر از ۱۳۵ بار و تا ۱۸۰ بار) احتمالاً سبب کاهش قدرت حل‌کنندگی دی‌اکسید کربن فوق بحرانی می‌شود، میزان ترکیبات فنلی کاهش و IC_{50} افزایش می‌یابد (Macías-Sánchez *et al.*, 2007). نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های دیگر محققان همخوانی دارد.

سان و تملی (Sun & Temelli, 2006)، با مطالعه استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی از هویج با استفاده از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی نشان دادند که در دماهای زیر ۸۰ درجه سلسیوس با افزایش فشار سیال فوق بحرانی ترکیبات کاروتنوئیدی بیشتری از هویج استخراج می‌شود.

فعال بیشتری استخراج می‌شوند که می‌توانند دارای ساختار فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشند. همان‌طور که مشاهده شد، با افزایش دمای استخراج از ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد که ممکن است در ارتباط با افزایش راندمان استخراج عصاره با افزایش دما باشد و منجر به کاهش ویسکوزیته مخلوط حلال-عصاره و افزایش انتقال جرم طی فرآیند استخراج شود. با این همه، کاهش میزان فنل کل و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چغندر قرمز در دماهای بالاتر (۸۰ درجه سلسیوس) در ارتباط با حساسیت حرارتی این ترکیبات زیست‌فعال است زیرا با افزایش دمای فرآیند، پایداری ترکیبات حساس به حرارت مانند ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد و این امر منجر به کاهش فعالیت بیولوژیک آنها خواهد شد (Herrera & De Castro, 2005). به‌طور مشابه، ما و همکاران (Ma *et al.*, 2009)، تأثیر دماهای مختلف استخراج را روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنلی کل ترکیبات استخراج شده از پوست نارنگی ارزیابی کردند و نشان دادند که افزایش دمای بالاتر از ۴۰ درجه سلسیوس به‌طور معنی‌داری میزان ترکیبات فنلی را کاهش می‌دهد. این محققان می‌گویند احتمالاً به‌دلیل تجزیه حرارتی یا واکنش‌های پلیمریزاسیون ترکیبات فنلی با یکدیگر در نتیجه اعمال دماهای بالاتر، میزان ترکیبات فنلی کاهش می‌یابد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر خواهد شد. مونراد و همکاران (Monrad *et al.*, 2010)، با مطالعه استخراج آنتوسیانین از تفاله خشک شده انگور قرمز با استفاده از روش استخراج با سیال فوق بحرانی گزارش می‌دهند که آنتوسیانین‌های استخراج شده از



شکل ۳- اثر شرایط استخراج بر میزان فنل کل عصارهٔ چغندر قرمز (A: دمای استخراج، B: زمان استخراج و C: فشار) (الف: نمودار دو بعدی، نمودارهای ب، ج و د: تأثیر متقابل متغیرها روی میزان فنل کل)



شکل ۴- اثر شرایط استخراج بر IC50 عصارهٔ چغندر قرمز (A: دمای استخراج، B: زمان استخراج و C: فشار استخراج) (الف: نمودار دو بعدی، نمودارهای ب، ج و د: تأثیر متقابل متغیرها روی IC50)

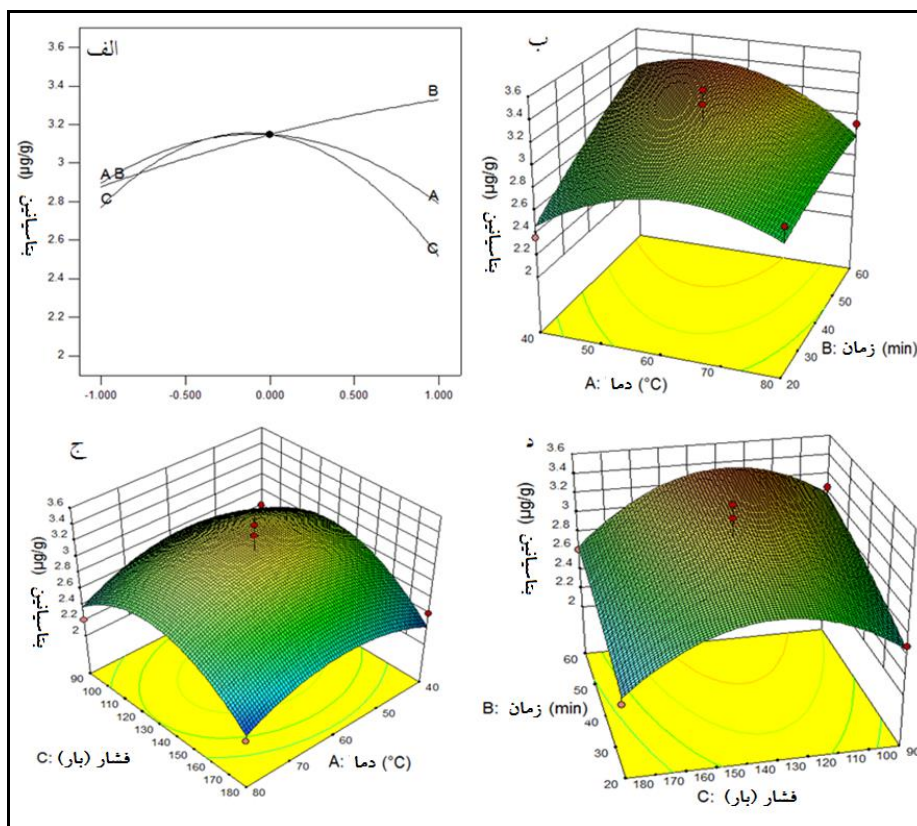
تأثیر شرایط استخراج بر میزان بتاسیانین عصاره چغندر قرمز

نتایج تجزیه واریانس متغیرهای وابسته (جدول ۲) نشان می‌دهد اثر خطی دما، زمان و فشار و اثرهای درجه دوم دما و فشار در سطح ۹۵ درصد بر میزان بتاسیانین نمونه‌ها معنی‌دار هستند. بررسی نتایج نشان می‌دهد که روند تغییرات میزان بتاسیانین استخراج شده از چغندر قرمز تقریباً مشابه با روند تغییرات مقدار ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره است. تغییرات میزان بتاسیانین کل موجود در عصاره چغندر قرمز به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) وابسته به شرایط استخراج (دما و زمان استخراج و فشار سیال) است به طوری که با افزایش زمان استخراج از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه میزان بتاسیانین عصاره افزایش یافته‌است. افزایش فشار سیال از ۹۰ تا ۱۳۵ بار و افزایش دما از ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس سبب افزایش میزان بتاسیانین عصاره شده است اما افزایش بیشتر فشار سیال از ۱۳۵ تا ۱۸۰ بار و دمای استخراج از ۶۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) میزان بتاسیانین عصاره چغندر قرمز را کاهش داده‌اند.

همان‌طور که قبلاً گفته شد، افزایش زمان استخراج با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی از ۲۰ تا ۶۰ دقیقه تأثیر معنی‌داری ($p < 0.05$) بر افزایش راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز دارد و با افزایش زمان استخراج فرصت کافی برای نفوذ حلال به درون بافت و حل کردن ترکیبات آنتوسیانینی مانند بتاسیانین فراهم می‌شود و موجب افزایش میزان بتاسیانین در عصاره استخراج شده خواهد شد. با این همه، افزایش دما از ۶۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) میزان بتاسیانین عصاره استخراج شده از چغندر قرمز را کاهش می‌دهد که علت این امر می‌تواند قرار گرفتن طولانی‌مدت

ترکیبات فنلی در معرض دماهای بالا باشد زیرا در این حالت ویسکوزیته افزایش و سرعت انتقال جرم کاهش می‌یابد (Talmaciu et al., 2015). به‌طور مشابه، مونراد و همکاران (Monrad et al., 2010) مطالعه استخراج ترکیبات آنتوسیانینی از تفاله انگور قرمز می‌گویند که در دماهای پایین استخراج با سیال فوق بحرانی ۶۰-۴۰ درجه سلسیوس تخریب حرارتی آنتوسیانین‌ها بسیار کمتر است تا در دماهای بالای استخراج یعنی ۱۴۰-۸۰ درجه سلسیوس. با مشاهده نتایج این تحقیق می‌توان دریافت که افزایش فشار سیال از ۹۰ تا ۱۳۵ بار، به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) میزان بتاسیانین عصاره را افزایش داده است ولی افزایش بیش از حد فشار منجر به کاهش میزان بتاسیانین عصاره شده‌است (شکل ۵) زیرا افزایش فشار باعث افزایش دانسیته دی‌اکسید کربن و در نتیجه افزایش قدرت انحلال‌پذیری می‌شود. با وجود این، افزایش بیشتر فشار سبب کاهش قدرت نفوذ سیال به درون ماتریکس گیاه نیز می‌گردد زیرا با افزایش فشار، ویسکوزیته نیز افزایش می‌یابد و این روند سبب کاهش قدرت استخراج می‌شود (Paes et al., 2014). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های دیگر محققان نیز تأیید شده‌است.

اوکچه و همکاران (Uquiche et al., 2015)، به مطالعه استخراج اسانس با استفاده از روش سیال فوق بحرانی (دی‌اکسید کربن) از گیاه *Leptocarpha rivularis* پرداختند و مشخص کردند که افزایش فشار سیال از ۱۰۸ تا ۱۹۲ بار به‌طور معنی‌داری به کاهش استخراج اسانس از گیاه منجر می‌شود. این محققان کاهش میزان استخراج را به کاهش چگالی سیال در اطراف مواد حل‌شونده در نتیجه نیروی دفع‌کننده بین مولکول‌های سیال و ماده حل‌شونده نسبت داده‌اند.



شکل ۵- تأثیر شرایط استخراج بر محتوی بتاسیانین عصاره چغندر قرمز (A: دمای استخراج، B: زمان استخراج و C: فشار استخراج) (الف: نمودار دو بعدی، ب، ج و د: نمودارهای تأثیر متقابل متغیرها روی محتوی بتاسیانین)

استخراج ۵۸/۷۴ درجه سلسیوس، مدت زمان استخراج ۶۰ دقیقه و فشار سیال ۱۳۲/۹۹ بار است (جدول ۴). برای بررسی صحت فرآیند بهینه‌یابی، تیمار پیشنهادی با شرایط یکسان همانند بقیه تیمارها تولید و نتایج حاصل از راندمان استخراج، ارزیابی میزان فنل کل، میزان بتاسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با نتایج پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید. نبود تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین داده‌های تجربی و داده‌های پیش‌بینی شده ناشی از مدل رگرسیونی مورد استفاده در روش سطح-پاسخ بیانگر آن است که مدل پیش‌بینی شده در این پژوهش برای ارزیابی داده‌ها و شرایط بهینه به‌منظور استخراج عصاره از چغندر قرمز با بالاترین

بهینه‌یابی شرایط استخراج عصاره چغندر قرمز شرایط استخراج عصاره چغندر قرمز به‌منظور حصول حداکثر راندمان استخراج عصاره، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و بتاسیانین و کمترین IC_{50} بهینه‌یابی شد. برای این منظور، بیشترین راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز، بالاترین مقدار فنل کل و بتاسیانین و کمترین IC_{50} به عنوان هدف بهینه‌سازی انتخاب شد. نتایج حاصل از بهینه‌یابی سطح متغیرها به صورت داده‌های پیش‌بینی شده و داده‌های تجربی در جدول ۴ نشان داده شده است. در این شرایط بهینه برای حصول بیشترین راندمان استخراج عصاره از چغندر قرمز، بالاترین میزان فنل کل و بتاسیانین و کمترین IC_{50} شامل دمای

شامل ۳۰۰ بار و دمای ۴۰ درجه سلسیوس است. احمدیان کوچکسری و نیازمند (Ahmadian- Kouchaksaraie & Niazmand, 2017)، با مطالعه شرایط بهینه‌یابی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از گلبرگ زعفران با روش سیال فوق بحرانی نشان دادند که شرایط بهینه استخراج در دمای ۶۲ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۴۷ دقیقه و فشار ۱۶۴ بار به دست می‌آید. درین و همکاران (Derrien *et al.*, 2018)، با مطالعه استخراج لوتئین و کلروفیل از محصولات جانبی فرآوری اسفناج گزارش دادند که به منظور حصول بالاترین مقدار لوتئین و کلروفیل، شرایط بهینه شامل دمای ۵۶ درجه سلسیوس، زمان استخراج ۳/۶ ساعت و فشار ۳۹ مگاپاسکال است.

راندمان، بیشترین میزان فنل کل، بیشترین میزان بتاسیانین و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به خوبی برآزش شده و داده‌ها با مدل پیش بینی شده منطبق‌اند. محققان مختلف شرایط بهینه برای استخراج ترکیبات زیست فعال از منابع مختلف به دست آورده‌اند. واگی و همکاران (Vági *et al.*, 2007)، با مطالعه شرایط بهینه‌یابی استخراج کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها و سیتواسترول‌ها از محصولات جانبی فرآوری گوجه فرنگی با استفاده از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی نشان دادند که شرایط بهینه استخراج برای کاروتنوئیدها و لیکوپن شامل فشار ۴۶۰ بار در دمای ۸۰ درجه سلسیوس و شرایط بهینه برای استخراج بتاکاروتن و سیتواسترول‌ها

جدول ۵- سطح بهینه متغیرها، پاسخ‌های پیش‌بینی شده و نتایج آزمایشگاهی برای استخراج عصاره چغندر قرمز با روش سیال فوق بحرانی

متغیر	سطح بهینه متغیر	
دمای استخراج (درجه سلسیوس)	۵۸/۷۴	
زمان استخراج (دقیقه)	۶۰	
فشار استخراج (بار)	۱۳۲/۹۹	
پاسخ	مقدار پیش‌بینی شده (آزمایشگاهی)	مقدار تجربی
راندمان استخراج (درصد)	۱/۸۷ ± ۰/۰۲ ^a	۱/۹۰ ± ۰/۰۴ ^a
میزان فنل کل (میلی‌گرم اسید گالیک در هر میلی‌لیتر عصاره)	۳۵/۶۷ ± ۰/۰۳ ^a	۳۵/۶۳ ± ۰/۰۵ ^a
IC ₅₀ (mg GAE/mL)	۰/۱۲ ± ۰/۰۲ ^a	۰/۱۴ ± ۰/۰۳ ^a
میزان بتاسیانین (میکروگرم بر گرم)	۳/۳۴ ± ۰/۰۴ ^a	۳/۳۸ ± ۰/۰۵ ^a

اعداد (میانگین ± انحراف معیار). در هر سطر اعداد با حروف آماری متفاوت از لحاظ آماری در آزمون دانکن تفاوت معنی‌دار (P<0/05) دارند.

نتیجه‌گیری

میزان ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان بتاسیانین داشتند. نتایج این تحقیق مشخص کرد که از فرایند استخراج به کمک سیال فوق بحرانی می‌توان در استخراج ترکیبات زیست فعال با ارزشی مانند بتاسیانین به‌خوبی استفاده کرد.

در این مطالعه، استخراج بتاسیانین از چغندر قرمز با استفاده از دی‌اکسید کربن فوق بحرانی در شرایط مختلف بررسی شد. پارامترهای فرآیند مانند فشار، دما و زمان اثر معنی‌داری بر راندمان استخراج،

تعارض منافع

نویسندگان در خصوص انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافی تجاری در این راستا وجود ندارد.

مراجع

- Ahmadian-Kouchaksaraie, Z. and Niazmand, R. 2017. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from *Crocus sativus* petals of saffron industry residues: Optimization using response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 121, 19-31.
- Azeredo, H. M. 2009. Betalains: properties, sources, applications, stability—a review. *International Journal of Food Science Technology*. 44(12): 2365-2376.
- Borges, M. E., Tejera, R. L., Díaz, L., Esparza, P. and Ibáñez, E. 2012. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food Chemistry*. 132(4): 1855–1860.
- Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A. and San Martín-González, M. F. 2014. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT-Food Science Technology*. 59(1): 276-282.
- Coelho, J. P., Cristino, A. F., Matos, P. G., Rauter, A. P., Nobre, B. P., Mendes, R. L., ... Sovová, H. and Palavra, A.F. 2012. Extraction of volatile oil from aromatic plants with supercritical carbon dioxide: experiments modeling. *Molecules*. 17(9):10550-10573.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R. and Paredes-López, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains—Characteristics, biosynthesis, processing, stability. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 40(3): 173–289.
- Derrien, M., Aghabarannejad, M., Gosselin, A., Desjardins, Y., Angers, P., Boumghar, Y. 2018. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of lutein chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology. *LWT*. 93, 79-87.
- Ghoreishi S. and Sharifi S. 2001. Modeling of Supercritical Extraction of Mannitol from Plane Tree Leaf. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 24(5): 1037-48.
- Ghoreishi S., Shahrestani R. G. and Ghaziaskar H. S. 2009. Experimental Modeling Investigation of Supercritical Extraction of Mannitol from Olive Leaves. *Chemical Engineering Technology*. 32(1): 45-54.
- Ghoreishi S. and Heidari E. 2012. Extraction of Epigallocatechin Gallate from Green Tea via Modified Supercritical CO₂: Experimental, Modeling Optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*. 72, 36-45.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C. and Carle, R. 2006. Betalain stability degradation—structural chromatic aspects. *Journal of Food Science*. 71(4): R41-R50.
- Herrera, M. C. and De Castro, M. L. 2005. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 1100(1):1-7.
- Heydari Majd, M. H., Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavi, S. A. and Bolourian, S. 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops Products*. 57, 195-202.
- Fakhari A. R. and Baghipour S. 2010. Eextraction of a food colorant from red beet evaluation of its stability. *Journal of Color Science Technology*. 3, 243-250.

- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food chemistry*. 47, 3954–3962.
- Kassama, L. S., Shi, J. and Mittal, G. S. 2008. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model. *Separation Purification Technology*. 60(3): pp.278-284.
- Lang, Q. and Wai, C. M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal natural product studies—a practical review. *Talanta*. 53(4): 771-782.
- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H. M., Ross, C. F., Powers, J. R., Tang, J. and Rasco, B. A. 2011. Determination of total phenolic content antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 129(2): 637-644.
- Luo, H., Cai, Y., Peng, Z., Liu, T. and Yang, S. 2014. Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (*dragon fruit*) peel. *Chemistry Central Journal*. 8(1): 1-7.
- Ma, Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H. and Ye, X. Q. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16(1): 57-62.
- Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M., Sasaki, M. and Hirose, T. 2006. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus p. luvialis* using supercritical CO₂ ethanol as entrainer. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 45(10): 3652-3657.
- Macías-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., de la Ossa, E. M., Lubián, L. M. and Montero, O. 2007. Supercritical fluid extraction of carotenoids chlorophyll a from *Synechococcus* sp. *The Journal of Supercritical Fluids*. 39(3): 323-329.
- Maran, J. P., Priya, B. and Manikan, S. 2014. Modeling optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp. *Journal of Food Science Technology*. 51(9): 1938-1946.
- Monrad, J. K., Howard, L. R., King, J. W., Srinivas, K. and Mauromoustakos, A. 2010. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 58(5): 2862-2868.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. and Carle, R. 2005. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innovative Food Science Emerging Technologies*. 6(2): pp.221-231.
- Nematollahi A., Mashayekh M., Sohrabvi S. and Khosravi-Darani K. 2013. Application of supercritical CO₂ in extraction refining of vegetable oils. *Iranian Journal of Nutrition Sciences Food Technology*. 7(4): 35-44.
- Paes, J., Dotta, R., Barbero, G. F. and Martínez, J. 2014. Extraction of phenolic compounds anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ pressurized liquids. *The Journal of Supercritical Fluids*. 95, 8-16.
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A. and Ismail, A. 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds antioxidant capacities of underutilized *Mangifera pajang Kosterm* peels. *Food Chemistry*. 128(4): 1121-1127.
- Predes, F. S., Ruiz, A. L., Carvalho, J. E., Foglio, M. A. and Dolder, H. 2011. Antioxidative in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. *BMC Complementary Alternative Medicine*. 11(1): 25.
- Ravichran, K., Ahmed, A. R., Knorr, D. and Smetanska, I. 2012. The effect of different processing methods on phenolic acid content antioxidant activity of red beet. *Food Research International*. 48(1): 16-20.

- Roussos, P. A. 2011. Phytochemicals antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*. 129(2): 253-258.
- Sheibani, A. and Ghaziaskar, H. S. 2009. Pressurized fluid extraction for quantitative recovery of aflatoxins B₁ B₂ from pistachio. *Food Control*. 20(2): 124-128.
- Shrigod, N. M., Pit, P. D. and Fenn, B. N. 2016. Use of Supercritical Fluid Extraction in Food Processing Industry: A Review. *Advances in Life Sciences*. 5(11): 4395-4404.
- Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M. and Pintado, M. E. 2017. Anthocyanin extraction from plant tissues: a review. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 57(14): 3072-3083.
- Sonsuzer, S., Sahin, S. and Yilmaz, L. 2004. Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Thymbra spicata* oil. *The Journal of Supercritical Fluids*. 30(2): 189-199.
- Sowbhagya, H. B., Sampathu, S. R. and Krishnamurthy, N. 2004. Natural colorant from marigold-chemistry technology. *Food Reviews International*. 20(1): 33-50.
- Sumaya-Martínez, M. T., Cruz-Jaime, S., Madrigal-Santillán, E., García-Paredes, J. D., Cariño-Cortés, R., Cruz-Cansino, N., ... and Alanís-García, E. 2011. Betalain, acid ascorbic, phenolic contents antioxidant properties of purple, red, yellow white cactus pears. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(10): 6452-6468.
- Sun, M. and Temelli, F. 2006. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*. 37(3): 397-408.
- Talmaciu, A. I., Volf, I. and Popa, V. I. 2015. Supercritical fluids ultrasound assisted extractions applied to spruce bark conversion. *Environmental Engineering Management Journal*. 14(3): 615-623.
- Uquiche, E., Cirano, N. and Millao, S. 2015. Supercritical fluid extraction of essential oil from *Leptocarpha rivularis* using CO₂. *Industrial Crops Products*. 77, 307-314.
- Vági, E., Simándi, B., Vásárhelyiné, K. P., Daood, H., Kéry, Á., Doleschall, F. and Nagy, B. 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols sitosterols from industrial tomato by-products. *The Journal of Supercritical Fluids*. 40(2): 218-226.
- Vatai, T., Škerget, M. and Knez, Ž. 2009. Extraction of phenolic compounds from elder berry different grape marc varieties using organic solvents /or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*. 90(2): 246-254.
- Zhang, S., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Luo, M., Liu, W., Li, J. and Efferth, T. 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) and its antioxidant activity. *Bioresource Technology*. 101(7). 2537-2544.



Original Research

Optimization of Extraction Conditions of Betacyanine from Red Beet Using Supercritical Fluid by Response Surface Methodology

M. Zarrabi-Aval, A. Mohammadi Sani, M. Najaf Najafi*

* Corresponding Author: Associate professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. E-mail: m.najafi.mhd@gmail.com

Received: 11 August 2020, Accepted: 7 October 2021

<http://doi: 10.22092/fooder.2021.341824.1256>

Abstract

Optimization of extraction conditions of bioactive compounds from red beet (*Beta vulgaris*) was performed using response surface methodology. For this purpose, three independent variables were temperature (40, 60, and 80 °C), time (20, 40, and 60 min) and pressure (90, 135 and 180 bar) for modeling and then optimization using Box–Behnken design. Optimization of extraction conditions was determined based on maximum extraction efficiency, maximum total phenolic content, maximum betacyanine content, and lowest IC50 index. The results showed that increasing the temperature (from 40 to 80 °C), time (from 20 to 60 min), and pressure (from 90 to 135 bar) increased extraction efficiency significantly ($p < 0.05$). Also, increasing the pressure from 90 to 135 bar, the temperature from 40 to 60 °C and the extraction time from 20 to 60 min significantly increased total phenolic content, antioxidant activity and betacyanine content of the extract ($p < 0.05$). For red beet extract, the optimum conditions for supercritical carbon dioxide extraction were 58.74 °C and 60 minutes of extraction at 133.99 bar. Under these conditions, extraction efficiency was 1.87, phenolic compounds were 35.67, antioxidant activity was 0.12, and betacyanine content was 3.34.

Key Words: Antioxidant, Beta cyanine, Box–Behnken design, Edible color