

بهینه‌سازی شرایط استخراج بتالائین از چغندر قرمز به کمک مایکروویو و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل

سمیه کوشش^۱ و محمدتقی کلمکانی^{۲*}

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۲استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۴/۳۱

چکیده

سابقه و هدف: استخراج به کمک مایکروویو یکی از روش‌های نوین، سریع و کارآمد جهت استخراج ترکیبات زیست فعال می‌باشد. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی استخراج بتالائین و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی چغندر قرمز به کمک مایکروویو بود.

مواد و روش‌ها: اثر متغیرهای مستقل سطح توان مایکروویو (۳۰۰-۱۰۰ وات)، زمان (۱۵-۱ دقیقه) و نسبت حلال به نمونه (۳۰-۱۰ میلی‌لیتر بر گرم) بر بازدهی کل استخراج، فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد، میزان فنل، فلاونوئید و بتالائین (بتازانتین و بتاسیانین) کل با استفاده از طرح آماری مرکب مرکزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: طبق نتایج بدست آمده، میزان فنل، فلاونوئید و بتالائین کل با افزایش زمان استخراج کاهش معنی‌داری یافتند. افزایش همزمان توان مایکروویو و نسبت حلال به نمونه منجر به افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) میزان فنل، فلاونوئید و بتالائین کل گردید. شرایط بهینه استخراج فنل، فلاونوئید و بتالائین به کمک مایکروویو شامل توان ۳۰۰ وات، زمان ۱ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم بود. برعکس، افزایش همزمان توان مایکروویو و نسبت حلال به نمونه منجر به کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) بازدهی کل استخراج گردید. شرایط بهینه بالاترین بازدهی کل استخراج توان ۱۰۰ وات، زمان ۱۵ دقیقه و نسبت حلال به نمونه ۱۰ میلی‌لیتر بر گرم بود.

استنتاج: از روش استخراج به کمک مایکروویو می‌توان جهت استخراج ترکیبات زیست فعال در مدت زمان کوتاه‌تر و با مصرف انرژی کمتر استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: استخراج، بتالائین، چغندر قرمز، مایکروویو

*نویسنده مسئول: golmakani@shirazu.ac.ir

مقدمه

چغندر قرمز (*Beta vulgaris*) گیاهی از تیره اسفناج می‌باشد (۲۴) که غنی از فیبر و قند بوده و دارای ویتامین‌های گروه ب و ث می‌باشد. ارزش انرژی‌زایی این سبزی متوسط بوده و به صورت تازه، پس از فرایند حرارتی یا تخمیر مورد مصرف قرار می‌گیرد. ترکیب فنلی محلول موجود در دیواره سلولی این گیاه، ترکیب زیست‌فعال بتالائین نام دارد که رنگ قرمز-ارغوانی ایجاد می‌کند (۱۶). بتالائین‌ها رنگیزه‌های نیتروژن‌دار محلول در آب هستند (۳۶) که به دو گروه عمده بتاسیانین‌های قرمز رنگ و بتازانتین‌های زرد رنگ تقسیم می‌شوند (۳۹). چغندر معمولی هم حاوی بتاسیانین‌ها و هم حاوی بتازانتین‌ها می‌باشد. عواملی که پایداری بتالائین را تحت تاثیر قرار می‌دهند شامل عوامل خارجی مانند اکسیژن، دما، pH، فعالیت آبی، نور و فرایندهای شیمیایی و عوامل داخلی مانند آنزیم‌ها (پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز) می‌باشند (۲۲). رنگیزه بتالائین بیشترین پایداری را در محدوده pH=۳-۷ نشان می‌دهد (۱۱ و ۱۳).

بتالائین و ترکیبات فنلی موجود در چغندر قرمز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و آسیب‌آکسیداتیو چربی‌ها را کاهش می‌دهد (۱۴). ترکیبات فنلی به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را داشته و می‌توانند به‌عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل نمایند (۲۵). در سال‌های اخیر، استفاده از روش‌های نوین استخراج مانند استخراج به کمک فراصوت، استخراج با مایع تحت فشار و استخراج به کمک مایکروویو به دلیل دارا بودن مزایایی نظیر قدرت استخراج بالا، زمان استخراج کوتاه‌تر و هزینه کمتر گسترش یافته‌اند (۴۱). در گذشته از امواج مایکروویو بیش‌تر برای گرم کردن، تغلیظ، خشک‌کردن، غیرفعال‌کردن آنزیم‌ها و باکتری‌های موجود در مواد غذایی استفاده می‌شده است اما امروزه کاربرد این امواج برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از بافت‌های گیاهی و جانوری نیز گسترش یافته است (۳۸).

هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی استخراج ترکیبات زیست‌فعال از چغندر قرمز به کمک مایکروویو بود. اثر سه متغیر توان، زمان و نسبت حلال متانول به نمونه بر بازدهی کلی استخراج، فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد، میزان فنل و فلاونوئید کل و بتالائین (بتاسیانین و بتازانتین) عصاره‌های استخراج شده، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده شامل متانول (شرکت مجلی، ایران)، واکنشگر فولین سیکاتو، کربنات سدیم، کلرید پتاسیم، استات سدیم، کلرید آلومینیوم (شرکت مرک، آلمان)، DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)، کوئرستین (شرکت سیگما، آلمان) و اسید گالیک (شرکت سیگما، هند) بود. تهیه و آماده‌سازی نمونه: نمونه چغندر قرمز از بازار محلی (تیرماه سال ۱۳۹۲) تهیه شد و جنس و گونه‌ی (*Beta vulgaris*) آن در بخش باغبانی دانشگاه شیراز تایید گردید. بعد از شستشو و پوست‌گیری، نمونه‌ها با دست به صورت خلال (۳/۲۵×۰/۲۵ سانتی‌متر مربع) درآمده، در محل تاریک و در دمای اتاق (30 ± 5 درجه سلسیوس) با گردش هوا توسط فن به مدت ۳ روز و تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند (۱).

اندازه‌گیری ماده خشک خلال: میزان ماده خشک نمونه‌ها بر طبق روش (۸) استفاده از آون آزمایشگاهی در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت بعد از رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری شد. میزان ماده خشک نمونه خلال $94/65 \pm 0/5$ (۱۰۰ گرم/گرم) محاسبه گردید.

استخراج عصاره: برای استخراج عصاره ۱۰ گرم از خلال خشک شده چغندر قرمز به دقت توزین و درون فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری قرار داده شد. سپس، با توجه به نسبت حلال به نمونه (۱/۱، ۱/۲، ۱/۳، ۱/۴، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۳۰، ۱/۴۰، ۱/۵۰ میلی‌لیتر بر گرم)، مقادیر مشخص از حلال متانول به آن اضافه گردید. فلاسک درون دستگاه استخراج به کمک مایکروویو (سامسونگ، مدل ME3410W، کره جنوبی) به گونه‌ای قرار داده شد که دهانه مبردی که از بالای دستگاه خارج شده بود کاملاً درون فلاسک قرار گرفت. استخراج به کمک مایکروویو در توان‌ها و زمان‌های مشخص انجام گرفت (جدول ۱). پس از سرد شدن مخلوط، تفاله چغندر قرمز و عصاره متانولی به وسیله قیف بوختر متصل به پمپ خلأ و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ از یکدیگر جدا شدند. عصاره‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی درون شیشه‌های تیره‌رنگ و در یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری شدند.

آنالیز آماری: از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی، به عنوان طرح آزمایش در تحقیق حاضر استفاده شده است. طرح مرکب مرکزی شامل سه متغیر (نسبت حلال به نمونه، زمان و توان مایکروویو) هر کدام در سه سطح و در مجموع شامل ۲۰ آزمایش بود (جدول ۱). از نرم‌افزار Design Expert V8 (هنپین، مینیسوتا) (معادلات به صورت درجه دو برازش شد، سپس متغیرهایی که در سطح

معنی‌داری $P < 0/05$ بودند دوباره در مدل قرار داده شدند تا خطای مدل کاهش یابد). جهت آنالیز ارتباط بین متغیرها و پاسخ‌های فرایند و همچنین پیش‌بینی و تأیید معادلات مدل، استفاده گردید. تعیین بازدهی استخراج: جهت اندازه‌گیری بازدهی عصاره استخراج شده، ۱۰ میلی‌لیتر عصاره درون آن ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. در نهایت میزان بازدهی کل برحسب گرم در لیتر محاسبه شد.

ارزیابی میزان فنل کل عصاره: جهت ارزیابی میزان فنل کل عصاره از واکنش‌گر فولین استفاده شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه به ۰/۷۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین که به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده بود، اضافه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای اتاق، ۰/۷۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد به آن اضافه گردید. بعد از ۴۵ دقیقه نگهداری در تاریکی جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (RAYLEIGH، مدل UV-9200، چین) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. منحنی استاندارد اسید گالیک نیز در شرایط مشابه در محدوده غلظت‌های (۰/۴۹-۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رسم شد (۱۹).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل عصاره: برای ارزیابی میزان فلاونوئید کل عصاره از روش (۷) استفاده گردید. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های تهیه شده به ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر استات سدیم ۱ مولار اضافه گردید. سپس، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد کوئرستین نیز در شرایط مشابه در غلظت‌های (۱۲/۵۰-۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رسم گردید.

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد: خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد با روش DPPH اندازه‌گیری و با شاخص IC_{50} (غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد) گزارش گردید. IC_{50} بیانگر غلظتی از نمونه است که دارای ۵۰ درصد خاصیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشد. هرچه میزان عددی IC_{50} کمتر باشد، نشان‌دهنده بالاتر بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه است (۵۰). فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد با استفاده از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH ارزیابی شد و نتایج برحسب گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید (۳۰).

جدول ۱- ماتریس طرح آزمایش استخراج ترکیبات زیست‌فعال و پاسخ‌های ارزیابی شده

Table 1. Matrix of the experimental design for extraction of bioactive compounds and evaluated responses

ویژگی شیمیایی عصاره (پاسخ‌ها) Chemical properties of extract (responses)						نسبت حلال به نمونه (میلی‌لیتر بر گرم)	زمان B (دقیقه)	توان (وات) A	ردیف
						Solvent /sample ratio ($\frac{ml}{g}$) C	Time (min) B	Power (W) A	Number
بتاسیانین ($\frac{\mu g}{g}$) (میکروگرم گرم)	بتازانتین ($\frac{\mu g}{g}$) (میکروگرم گرم)	میزان فلاوونوئید کل (میکروگرم کوئرستین میلی‌لیتر)	میزان فنل کل (میکرو اسیدگرم گالیک میلی‌لیتر)	IC ₅₀ ($\frac{g}{ml}$) (میلی‌لیتر گرم)	بازدهی ($\frac{g}{L}$) (گرم لیتر)				
Betacyanin ($\frac{\mu g}{g}$)	Betaxanthin ($\frac{\mu g}{g}$)	Total flavonoid content ($\frac{\mu g \text{ Quercetin}}{ml}$)	Total phenolic content ($\frac{\mu g \text{ Gallic acid}}{ml}$)	IC ₅₀ ($\frac{g}{ml}$)	Yield ($\frac{g}{L}$)				
0.27	0.41	4.03	219.20	1.79	0.11	10	1	100	1
0.51	0.84	3.96	259.20	1.31	0.45	30	1	100	2
0.50	0.84	3.96	407.20	0.92	0.43	20	8	100	3
2.90	3.89	4.62	615.20	0.28	0.95	10	15	100	4
0.45	0.75	3.24	355.20	0.93	0.60	30	15	100	5
0.22	0.37	2.84	231.20	1.64	0.24	20	1	200	6
2.95	3.95	5.15	1575.20	0.22	0.84	10	8	200	7
0.98	2.30	4.62	839.20	0.71	1.07	20	8	200	8
1.08	2.70	4.75	903.20	0.63	1.23	20	8	200	9
0.94	2.30	5.08	779.20	0.71	1.13	20	8	200	10
1.10	2.60	4.82	815.20	0.72	1.00	20	8	200	11
1.30	2.10	4.88	839.20	0.69	1.04	20	8	200	12
1.08	2.40	4.83	839.20	0.69	1.09	20	8	200	13
0.84	1.20	3.76	503.20	0.22	0.97	30	8	200	14
2.00	2.70	5.01	979.20	0.73	1.52	20	15	200	15
0.61	1.20	4.69	559.20	0.79	0.36	10	1	300	16
0.09	0.18	3.76	135.20	3.22	0.21	30	1	300	17
0.09	1.40	4.82	607.20	0.75	0.73	20	8	300	18
3.29	5.60	6.66	1983.20	0.29	0.80	10	15	300	19
1.60	3.80	4.42	803.20	0.66	1.57	30	15	300	20

ارزیابی رنگ: جهت ارزیابی رنگ نمونه‌های استخراج شده از روش جذب رنگ به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. جذب نوری در طول موج‌های ۵۳۸ و ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۳).

نتایج و بحث

بازدهی کل استخراج: اثر توان و اثر همزمان توان و نسبت حلال به نمونه بر بازدهی کل استخراج در جدول ۲ قابل مشاهده می‌باشد. اثر همزمان توان و نسبت حلال به نمونه باعث کاهش معنی‌دار بر بازدهی کل استخراج شد ($P < 0/05$). افزایش توان از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات موجب کاهش بازدهی کل استخراج گردید (شکل ۱). در فرایند استخراج، توان بالای مایکروویو ممکن است منجر به کاهش بازدهی استخراج گردد که این امر بیش‌تر ناشی از تخریب ترکیبات حساس به حرارت می‌باشد. به‌طور کلی، بازدهی استخراج متناسب با افزایش توان مایکروویو تا یک حد بحرانی افزایش می‌یابد که پس از آن به‌علت تجزیه حرارتی، کاهش بازدهی مشاهده می‌گردد (۵). زیبا و همکاران (۲۰۰۸) جهت استخراج فلاونوئیدها از ریشه گیاه *Radix astragali* به کمک امواج مایکروویو از توان‌های ۱۰۰۰-۲۰۰ وات استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش دمای استخراج به بیش از ۱۱۰ درجه سلسیوس به‌علت ناپایداری فلاونوئیدها در آن دما، بازدهی استخراج کاهش می‌یابد (۴۳).

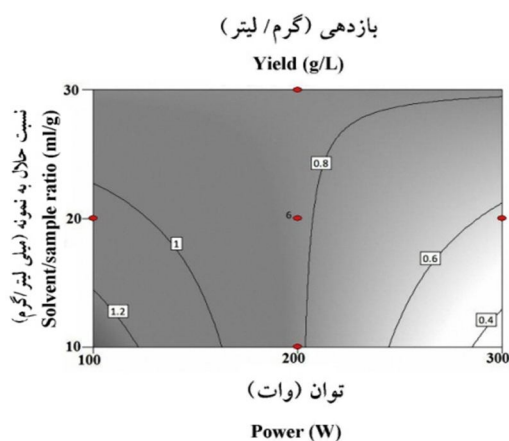
افزایش نسبت حلال به نمونه از ۱۰ به ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم، باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0/05$) در بازدهی کل استخراج گردید (شکل ۱). افزایش میزان حلال موجب افزایش ظرفیت استخراج حلال می‌گردد که در نتیجه بازدهی استخراج نیز بهبود می‌یابد. در مطالعات پراسادو همکاران (۲۰۰۹) که به استخراج از پوست میوه چشالو (*Dimpcarpus longan Lour.*) به کمک میدان الکتریکی ضربان‌دار پرداخته بودند، گزارش گردید که افزایش نسبت حلال به نمونه موجب بهبود بازدهی استخراج شده است. آن‌ها علت این مسئله را افزایش نفوذ حلال به درون سلول‌های گیاهی و خروج بیشتر ترکیبات عنوان کردند (۲۷). معادله‌های به‌دست آمده مربوط به هر پاسخ در جدول ۳ آمده است. براساس معادله‌های ارائه شده می‌توان عوامل موثر و همچنین نوع و سطح اثرگذاری آن‌ها را مشخص نمود.

جدول ۲. مدل‌های معادله و تطبیق خطی طرح آزمایش

Table 2. Equation models and linear adjustment for the experimental design

پاسخ						متغیر
بتاسیانین (میکرو گرم) ($\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$) Betacyanin ($\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$)	بتازانتین (میکرو گرم) ($\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$) Betaxanthin ($\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$)	میزان فلاونوئید کل (میکرو کونوستینگرم) ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) Total flavonoid content ($\frac{\mu\text{g Quercetin}}{\text{ml}}$)	میزان فنل کل (میکرو گالیکاسیدگرم) ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) Total phenolic content ($\frac{\mu\text{g Gallic acid}}{\text{ml}}$)	IC ₅₀ (گرم) ($\frac{\text{g}}{\text{ml}}$) IC ₅₀ ($\frac{\text{g}}{\text{ml}}$)	بازدهی (گرم) ($\frac{\text{g}}{\text{L}}$) Yield ($\frac{\text{g}}{\text{L}}$)	
-	-	-	-	0.09***	0.05**	توان (وات) A
-	-	-	-	3.40	4.61	Power (W) A
-	0.04**	0.002*	0.03**	0.04**	-	زمان (دقیقه) B
-	4.95	13.89	6.09	5.06	-	B (min) Time
-	-	-	-	-	-	نسبت حلال به نمونه C (میلی لیتر بر گرم) Solvent /sample ratio ($\frac{\text{ml}}{\text{g}}$) C
-	-	-	-	-	-	اثر متقابل توان و زمان (AB)
-	0.03**	-	-	0.11	-	Interaction between power and time (AB)
-	5.70	-	-	2.95	-	اثر متقابل توان و نسبت حلال به نمونه (AC)
0.05***	0.003*	0.009*	0.01**	0.04**	0.08***	Interaction between power and solvent /sample ratio (AC)
4.37	12.41	8.90	7.47	5.36	3.52	اثر متقابل زمان و نسبت حلال به نمونه (BC)
-	0.02**	0.01*	0.05***	-	-	Interaction between time and solvent /sample ratio (BC)
-	7.12	4.37	4.29	-	-	R ² برازش شده
0.150	0.579	0.597	0.438	0.401	0.243	Adjusted R ²
-0.008	0.546	0.504	0.187	-0.209	0.014	R ² پیش‌بینی شده
						Predicted R ²
غیر معنی‌دار	غیر معنی‌دار	معنی‌دار	غیر معنی‌دار	معنی‌دار	غیر معنی‌دار	عدم برازش مدل Lack of fit

*** (0.05 <= P < 0.1) **, (0.01 <= P < 0.05) *, (P < 0.01)



شکل ۱. اثر متقابل توان و نسبت حلال به نمونه بر بازدهی استخراج

Figure 1. Interaction between power and solvent /sample ratio on extraction yield

جدول ۳- معادله‌های به دست آمده با متغیرهای کد شده

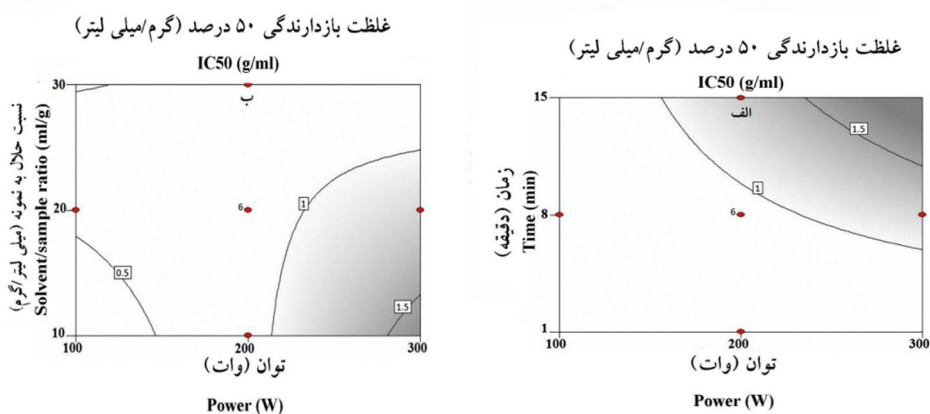
Table 3. Obtained equations with coded variables

پاسخ Response	معادله Equation
Yield (g/L) = بازدهی (گرم / لیتر)	$0.82 - 0.25 A + 0.24 AC$
IC ₅₀ = (گرم / میلی لیتر) = Phenol content (μg/ml)	$0.90 + 0.31A + 0.38B + 0.32AB - 0.43 AC$
میزان فنل (میکروگرم / میلی لیتر) = Flavonoid content (μg/ml)	$730.40 - 263.60B + 326.50 AC - 247.50BC$
میزان فلاونوئید (میکروگرم / میلی لیتر) = Betaxanthin (μg/g)	$4.50 - 0.61 B + 0.54 AC - 0.53 BC$
بتازانتین (میکروگرم / گرم) = Betacyanin (μg/g)	$2.08 - 0.66 B - 0.79 AB + 1.17 AC - 0.88 BC$
بتاسیانین (میکروگرم / گرم)	$1.14 + 0.65 AC$

فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد: اثر همزمان توان و زمان باعث افزایش معنی‌دار IC₅₀ شد (شکل ۲-الف). افزایش این شاخص بیانگر کاهش فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد عصاره است. در زمان ۱ دقیقه و توان ۱۰۰ وات، بالاترین فعالیت و در توان ۳۰۰ وات و زمان ۱۵ دقیقه،

ضعیف‌ترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد مشاهده گردید. از جمله مزایای روش‌های نوین استخراج مانند استخراج به کمک مایکروویو زمان کوتاه‌تر و هزینه‌های کمتر آن می‌باشد (۴۱). قرار گرفتن بیش از حد در معرض تابش مایکروویو، حتی در دما و توان پایین، منجر به تخریب ساختار شیمیایی ترکیبات فعال می‌شود. برای اجتناب از خطر تجزیه‌ی حرارتی و اکسیداسیون، زمان استخراج به کمک مایکروویو از چند دقیقه تا نیم ساعت متغیر است (۵ و ۳۱). لیاوتراکون و همکاران (۲۰۱۱)، اثر حرارت بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پوره میوه اژدها را بررسی کردند و نشان دادند که با افزایش زمان استخراج تا ۶۰ دقیقه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد (۱۷).

توان بالا با افزایش دمای سیستم موجب تسریع آزادسازی ترکیبات فنلی و حل شدن آن‌ها در حلال می‌گردد. از آنجا که دمای مورد استفاده در استخراج به کمک مایکروویو، نزدیک نقطه جوش حلال می‌باشد، این احتمال وجود دارد که برخی ترکیبات حساس به حرارت تجزیه شوند. همچنین، وجود اکسیژن در محیط نیز بر روی برخی ترکیبات حساس به اکسیژن به‌راحتی اثر گذاشته و موجب اکسیدشدن آن‌ها می‌گردد (۱۸ و ۴۴). بلارد و همکاران (۲۰۱۰)، ترکیبات فنلی را از پوست بادام زمینی به کمک مایکروویو استخراج کردند و بیان داشتند که افزایش همزمان توان و زمان موجب تخریب ترکیبات فنلی گردید. علاوه بر این، دمای مایکروویو نیز وابسته به توان آن بود (۲).



شکل ۲. اثر متقابل توان، زمان و نسبت حلال به نمونه بر غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد
Figure 2. Interaction among power, time, and solvent /sample ratio on IC₅₀

اثر همزمان توان و نسبت حلال به نمونه باعث افزایش معنی‌دار غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد گردید ($P < 0/05$) (شکل ۲، ب). افزایش نسبت حلال به نمونه از ۱۰ به ۳۰ میلی‌لیتر و همچنین افزایش توان از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات موجب افزایش معنی‌دار IC_{50} شد. در توان ثابت و نسبت حلال به نمونه کم، مقدار انرژی بیشتری به واحد حجم حلال می‌رسد درحالی که با افزایش نسبت حلال به نمونه مقدار انرژی وارد شده به واحد حجم حلال کاهش می‌یابد که در توان بالا و نسبت حلال به نمونه ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم موجب تخریب ترکیبات و کاهش فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد می‌شود.

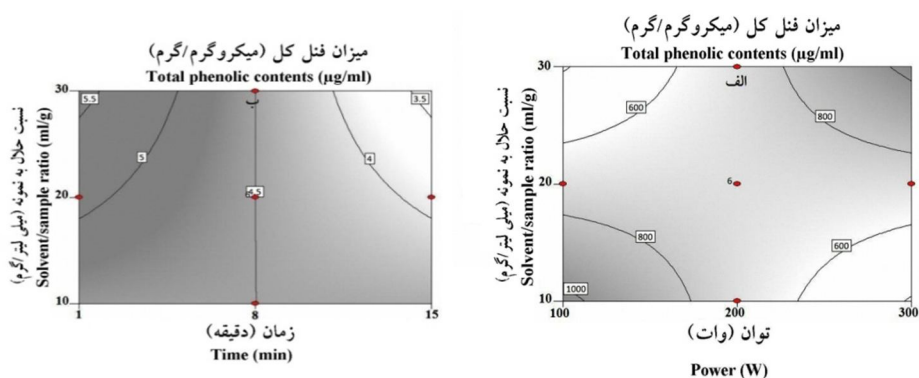
شی و همکاران (۲۰۰۳)، بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنلی را از هسته انگور به کمک مایکروویو مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که بازدهی استخراج ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، با افزایش میزان حلال کاهش می‌یابد (۳۳). در پژوهش دیگری، سینگ و همکاران (۲۰۱۱)، بر روی استخراج ترکیبات فنلی به کمک مایکروویو از پوست سیب‌زمینی به این نتیجه رسیدند که افزایش توان موجب افزایش دما می‌گردد و همین مسئله سبب تخریب ترکیبات حساس به حرارت و کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۳۴).

معادله به دست آمده با متغیرهای کد شده مربوط به شاخص IC_{50} در جدول ۳ آمده است. براساس معادله ارائه شده می‌توان عوامل موثر و همچنین نوع و سطح اثرگذاری آن‌ها را مشخص نمود.

میزان فنل کل: مسئله مهم در استخراج ترکیبات فنلی از منابع گیاهی، آزاد کردن این ترکیبات از ساختار گیاهی می‌باشد. اثر متغیرهای توان، زمان و نسبت حلال به نمونه بر میزان فنل کل در جدول ۲ آورده شده است. اثر همزمان توان و نسبت حلال به نمونه به شکل معنی‌دار باعث افزایش میزان فنل کل گردید ($P < 0/05$) (شکل ۳، الف). در توان پایین و حجم زیاد حلال، گرم شدن به خوبی انجام نشده و راندمان استخراج کاهش می‌یابد. در توان بالا و حجم کم حلال گرم شدن بیش از حد موجب تخریب ترکیبات فنلی گردیده است. تنگو همکاران (۲۰۱۳)، شرایط بهینه استخراج پلی‌فنل‌ها و آنتوسیانین را از تمشک به کمک مایکروویو بررسی کردند و نشان دادند که افزایش توان موجب افزایش در میزان استخراج ترکیبات فنلی گردید (۳۷).

با افزایش نسبت حلال به نمونه، بازدهی استخراج افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). حجم کم حلال، انرژی کمتری برای گرم شدن و استخراج ترکیبات فنلی لازم دارد. با افزایش حجم حلال، انرژی مصرفی برای گرم شدن و استخراج ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد. چاندراسکار و همکاران (۲۰۱۵)، بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنلی از ضایعات دو وارپته سیب به کمک مایکروویو را مورد

مطالعه قرار دادند و دریافتند که توان و نسبت حلال به نمونه از عوامل موثر بر روند استخراج است. افزایش توان همزمان با افزایش میزان حلال از ۵/۶ به ۱۰/۳ میلی‌لیتر موجب افزایش بازدهی استخراج ترکیبات فنلی به میزان ۱۵۶/۴ درصد گردید (۶).



شکل ۳. اثر متقابل توان و نسبت حلال به نمونه و زمان بر میزان فنل کل

Figure 3. Interaction between power and solvent /sample ratio on total phenolic content

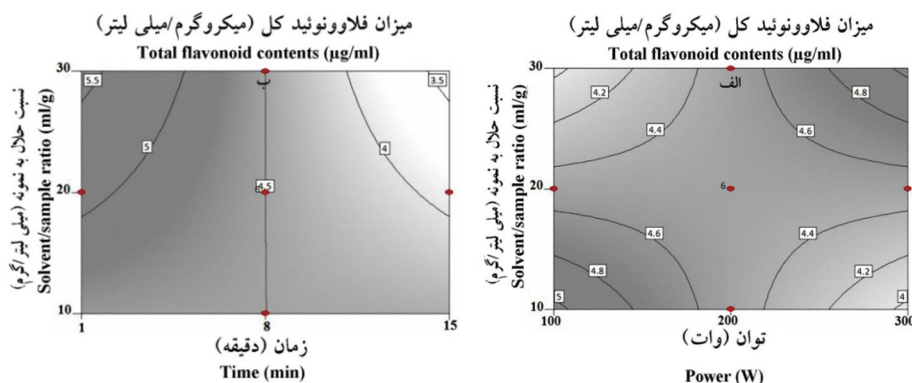
اثر هم‌زمان زمان و نسبت حلال به نمونه موجب کاهش معنی‌دار بر میزان فنل کل شد ($P < 0/05$) (شکل ۳-ب). افزایش زمان از ۱ به ۱۵ دقیقه، موجب کاهش معنی‌دار میزان فنل کل گردید. پروستوز و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که استخراج به کمک مایکروویو در زمان‌های طولانی به دلیل تخریب حرارتی، موجب کاهش بازدهی استخراج ترکیبات فنلی گردید (۲۸). پن و همکاران (۲۰۰۳) تاثیر زمان‌های مختلف (۱۰-۱ دقیقه) را بر بازدهی استخراج ترکیبات فنلی از چای سبز به کمک امواج مایکروویو بررسی کردند و دریافتند که بیشترین میزان استخراج در زمان ۴ دقیقه انجام گردید و در زمان‌های بالاتر شاهد کاهش بازدهی استخراج بودند (۲۶).

افزایش نسبت حلال به نمونه از ۱۰۰ به ۳۰۰ میلی‌لیتر بر گرم سبب افزایش معنی‌دار بازدهی فنل کل گردید ($P < 0/05$). بالا بودن حجم حلال موجب انحلال مقادیر بیشتری از ترکیبات موردنظر و در نتیجه افزایش بازدهی استخراج می‌گردد (۴۶). اسپینگو و همکاران (۲۰۰۴) پلی‌فنل‌های چای را به کمک مایکروویو استخراج نمودند و نشان دادند که افزایش نسبت حلال به نمونه موجب افزایش بازدهی استخراج گردید (۳۵). بر اساس جدول ۳، می‌توان معادله حاصل شده با متغیر کد شده میزان

فنل کل را مشاهده نمود. براساس معادله ارائه شده می‌توان عوامل موثر و همچنین نوع و سطح اثرگذاری آن‌ها را مشخص نمود.

میزان فلاوونوئید کل: اثر همزمان توان و نسبت حلال به نمونه باعث افزایش معنی‌دار بر میزان فلاوونوئید کل شد ($P < 0/05$) (شکل ۴، الف). افزایش نسبت حلال به نمونه از ۱۰ به ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم موجب افزایش معنی‌دار بر بازدهی استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی گردید. افزایش حجم حلال موجب می‌شود، توان و ظرفیت حلال در خروج ترکیبات زیست‌فعال افزایش یابد. پایین‌بودن حجم حلال، حرکت ترکیبات را به خارج از ماتریکس سلولی محدود کرده و مانند مانعی در مقابل انتقال جرم عمل می‌نماید (۵). پن و همکاران (۲۰۱۰)، نشان دادند که با افزایش نسبت حلال به نمونه از ۱۰ به ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم، استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی در عصاره گیاه *Buddleia officinalis* افزایش یافت (۲۵). زیاو و همکاران (۲۰۰۸)، نسبت‌های حلال به نمونه ۱۰ تا ۴۰ میلی‌لیتر بر گرم را در استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی از گیاه *Radix astragali* بررسی نمودند و نشان دادند که افزایش تا ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم موجب افزایش بازدهی و بالاتر از این نسبت باعث کاهش بازدهی استخراج می‌شود (۴۳).

افزایش توان دستگاه مایکروویو از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات موجب افزایش معنی‌دار بر میزان فلاوونوئید کل گردید ($P < 0/05$). توان بالا موجب افزایش دمای سیستم و در نتیجه کاهش ویسکوزیته و فشار سطحی حلال و در نهایت افزایش قدرت نفوذ و استخراج می‌گردد (۱۵). هو و همکاران (۲۰۰۸)، نشان دادند که بازدهی استخراج سایکو-سپونین از گیاه *Radix bupleuri* با افزایش توان، افزایش یافت (۱۲). ما و همکاران (۲۰۰۹)، استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی از گیاه *Rubia cordifolia* را به کمک مایکروویو بررسی کردند و بیان داشتند که افزایش توان از ۲۰۰ به ۱۰۰۰ وات موجب افزایش میزان استخراج ترکیبات فلاوونوئیدی می‌شود (۲۱).



شکل ۴. اثر متقابل توان، زمان و نسبت حلال به نمونه بر میزان فلاونوئید کل

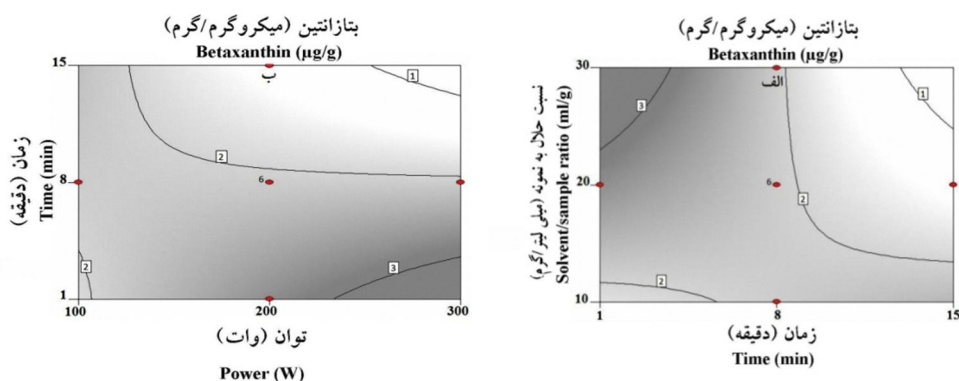
Figure 4. Interaction among power, time, and solvent /sample ratio on total flavonoid content

اثر هم‌زمان زمان و نسبت حلال به نمونه موجب کاهش معنی‌دار بر میزان فلاونوئید کل گردید ($P < 0.05$) (شکل ۴، ب). افزایش زمان استخراج از ۱ به ۱۵ دقیقه، سبب کاهش معنی‌داری در بازدهی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی گردید. برعکس نتایج فوق، در تحقیق لوچسی و همکاران (۲۰۰۷) زمان فرایند تاثیر مثبتی بر بازدهی استخراج داشت (۲۰). در مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۰۸)، مشخص گردید که افزایش زمان استخراج ابتدا باعث افزایش بازدهی و در ادامه موجب کاهش بازدهی می‌شود (۴۲). این مسئله در گزارش زیاو و همکاران (۲۰۰۸) که اثر زمان را بر استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از گیاه *Radix astragali* به کمک مایکروویو بررسی کرده بودند، نیز تایید شده است. این محققان گزارش کردند که افزایش زمان استخراج تا ۲۵ دقیقه موجب افزایش بازدهی فرایند استخراج و پس از آن موجب کاهش بازدهی استخراج گردید (۴۳). فلاونوئیدها در لایه‌های سطحی سلول‌های گیاهی قرار دارند، بنابراین در فرآیندهای پوست‌گیری، تیمار گرمایی، غوطه‌وری، در مدت زمان نگهداری و تکنیک‌های فرآوری میزان آن‌ها به شدت کاهش می‌یابد (۳۱).

افزایش نسبت حلال به نمونه اثر کاهشی معنی‌داری بر میزان فلاونوئید کل داشت ($P < 0.05$). حلال بیش از اندازه باعث گرمادهی ضعیف مایکروویو می‌شود، بدین صورت که حلال اضافی موجب جذب تابش مایکروویو می‌گردد (۵). ژانگ و همکاران (۲۰۱۳)، تاثیر چند متغیر از جمله نسبت حلال به نمونه را بر استخراج ترکیبات فلاونوئیدی گیاه *Epimediumsagittatum* مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که افزایش نسبت حلال به نمونه تا نسبت ۱۲۰ میلی‌لیتر بر گرم موجب افزایش در

بازدهی استخراج ترکیبات فلاونوئیدی می‌گردد و نسبت‌های بالاتر از ۱۲۰ میلی‌لیتر بر گرم تاثیر معنی‌داری در بازدهی این ترکیبات نداشت (۴۶). در جدول ۳ معادله به‌دست آمده جهت میزان فلاونوئید کل مشاهده می‌شود. براساس معادله ارائه شده می‌توان عوامل موثر و همچنین نوع و سطح اثرگذاری آن‌ها را مشخص نمود.

استخراج رنگ بتالائین: اثر زمان، توان و نسبت حلال به نمونه بر رنگ بتازانتین در جدول ۳ آورده شده است. اثر هم‌زمان نسبت حلال به نمونه و زمان باعث کاهش معنی‌دار استخراج بتازانتین شد ($P < 0.05$) (شکل ۵، الف). با افزایش نسبت حلال به نمونه، میزان بازدهی استخراج بتازانتین افزایش معنی‌داری یافت. نسبت بهینه حلال به نمونه، حرارت‌دهی و گرم کردن همگن و مؤثر را تضمین می‌کند (۵). افزایش نسبت حلال به نمونه موجب انتشار بیشتر رنگیزه از سلول گیاهی به درون حلال می‌گردد. افزایش زمان از ۱ به ۱۵ دقیقه موجب کاهش معنی‌دار استخراج بتازانتین گردید ($P < 0.05$). بتالائین‌ها، رنگیزه حساس به حرارت هستند که با افزایش دما و زمان حرارت‌دهی به سرعت تخریب می‌گردند (۴۰). شکل‌گیری ایندیکازانتین از بتالامیک اسید به‌علت حرارت بالا و زمان طولانی استخراج، موجب افت و کاهش بتازانتین می‌گردد (۱۱). باررا و همکاران (۱۹۹۸)، دریافتند که افزایش دما اثر منفی بر تخریب رنگیزه بتالائین در عصاره گیاه *Myrtillocactus geometrizans* داشت (۳).



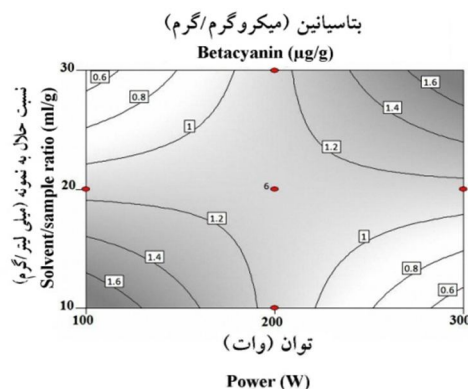
شکل ۵. اثر متقابل توان، زمان و نسبت حلال به نمونه بر رنگیزه بتازانتین

Figure 5. Interaction among power, time, and solvent /sample ratio on betaxanthin pigment

اثر هم‌زمان توان و زمان باعث کاهش معنی‌دار بر استخراج رنگ‌گیزه بتازانتین شد ($P < 0/05$) (شکل ۵، ب). با افزایش زمان از ۱ به ۱۵ دقیقه بازدهی استخراج بتازانتین کاهش یافت. برعکس نتایج تحقیق حاضر، راویچاندوران و همکاران (۲۰۱۳)، عنوان کردند که با افزایش توان از ۴۵۰ به ۱۸۰۰ وات و زمان از ۱۰ به ۳۰ ثانیه، میزان استخراج بتالائین افزایش یافت. راویچاندوران و همکاران (۲۰۱۳)، حداکثر زمان را ۳۰ ثانیه در نظر گرفته بودند که مشابه حداقل زمان تحقیق حاضر بود (۲۹). کاردوسو-آگارتو و همکاران (۲۰۱۴) اثر زمان، توان و حضور آسکوربیک اسید را بر استخراج بتالائین چغندر قرمز با استفاده از امواج مایکروویو بررسی و مشاهده کردند که در زمان‌های بالاتر از ۱۵۰ ثانیه، رنگ‌گیزه مدت زمان بیشتری در معرض دمای بالا قرار گرفته و میزان بتازانتین کاهش یافت. بنابراین، استخراج در دمای بالا به مدت طولانی موجب کاهش محتوای بتازانتین گردید (۴). هرباه و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی اثر فرایند حرارتی ۸۵ درجه سلسیوس در طی زمان‌های مختلف بر میزان تخریب رنگدانه قرمز-ارغوانی موجود در چغندر قرمز پرداختند و دریافتند که با افزایش زمان حرارت‌دهی نئوبتائین زرد-نارنجی رنگ تشکیل گردید. فعالیت آبی و دما عوامل اصلی در تبدیل رنگ‌گیزه بتالائین به نئوبتائین می‌باشند (۱۰). علت این تبدیل انجام واکنش‌های اکسیداسیون، هیدرولیز و دکربوکسیلاسیون می‌باشد (۹).

افزایش توان دستگاه از ۱۰۰ به ۳۰۰ وات موجب افزایش استخراج بتازانتین گردید. در تحقیق تنگو و همکاران (۲۰۱۳) افزایش توان موجب افزایش بازدهی در استخراج آنتوسیانین از توت سفید به کمک مایکروویو شد (۳۷). در مطالعه راویچاندوران (۲۰۱۳) نیز به اثر افزایش توان بر بهبود استخراج بتالائین اشاره شده است (۲۹). در جدول ۳، معادله به‌دست آمده مربوط به بتازانتین براساس متغیرهای کد شده نشان داده شده است. براساس معادله ارائه شده می‌توان عوامل موثر و همچنین نوع و سطح اثرگذاری آن‌ها را مشخص نمود.

اثر هم‌زمان توان و نسبت حلال به نمونه در شکل ۶ نشان داده شده است. متغیرهای موجود در این پژوهش اثر معنی‌داری بر رنگ‌گیزه بتاسیانین نداشتند ($P > 0/05$). ساپرز و هورنستین (۱۹۷۹) نشان دادند که فرایند حرارتی ۱۰۰ درجه سلسیوس اثر معنی‌داری بر تخریب بتاسیانین در ۴۸ واریته چغندر قرمز نداشت و تخریب این رنگ‌گیزه طی حرارت‌دهی به شدت وابسته به pH می‌باشد (۳۲).



شکل ۶. اثر متقابل توان و نسبت حلال به نمونه بر رنگیزه بتاسیانین

Figure 6. Interaction between power and solvent /sample ratio on betacyanin pigment

براساس نتایج به دست آمده، اگرچه سطوح مختلف متغیرهای توان، زمان و نسبت حلال به نمونه بر بتاسیانین اثر معنی داری نداشتند، اما سطوح مختلف این متغیرها بر رنگیزه بتازانتین به شکل معنی داری موثر بودند. گنکالوس و همکاران (۲۰۱۳) اثر حرارت دهی به کمک مایکروویو را در توان های مختلف بر رنگیزه چغندر قرمز با روش الکتروموتل مقایسه کردند و بیان داشتند که مقاومت حرارتی بتاسیانین بیشتر از بتازانتین می باشد (۹).

بهینه سازی شرایط استخراج: شرایط بهینه در بازدهی کل فرایند شامل توان ۱۰۰ وات (کمترین توان)، زمان ۱۵ دقیقه (بیشترین زمان) و نسبت حلال به نمونه ۱۰ میلی لیتر بر گرم بود. شرایط بهینه مربوط به دیگر پاسخها (فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد، میزان فنل و فلاونوئید کل، بتازانتین و بتاسیانین)، توان ۳۰۰ وات، زمان ۱ دقیقه) و نسبت حلال به نمونه ۳۰ (میلی لیتر بر گرم) برعکس شرایط بهینه در بازدهی کل به دست آمد. در فرایند استخراج از ماتریس گیاهی، با گذشت زمان همواره میزان ترکیبات استخراج شده (بازدهی کل) که شاخصی کمی است، افزایش می یابد. این درحالی است که اگرچه میزان ترکیبات زیست فعال که شاخصی کیفی است، در ابتدای استخراج افزایش می یابد، اما پس از آن به دلیل تخریب حرارتی کاهش ترکیبات زیست فعال و در نتیجه خاصیت آنتی اکسیدانی رخ می دهد.

بازدهی استخراج نشان دهنده میزان کل ترکیباتی است که توسط حلال متانول از ماتریکس گیاه استخراج شده است. بازدهی استخراج شاخصی کمی است و با گذشت زمان، همواره بازدهی افزایش

می‌باید. در صورتی که در مورد سایر پاسخ‌ها مسئله کیفیت عصاره‌ها تحت شرایط استخراج بررسی می‌گردد. افزایش توان موجب افزایش دما و در نتیجه افزایش نفوذپذیری و خروج ترکیبات از سلول گیاهی و افزایش بازدهی در استخراج ترکیبات زیست‌فعال می‌شود و طولانی شدن زمان همزمان با افزایش توان موجب تخریب ترکیبات حساس به حرارت می‌گردد. انرژی مصرفی شرایط بهینه بازدهی و سایر پاسخ‌ها به ترتیب ۲۵ و ۵۰ وات ساعت محاسبه گردید. میزان انرژی مصرفی برای تعیین بازدهی کل استخراج ۵ برابر بیشتر از انرژی صرف شده در سایر پاسخ‌ها بود. کمتر بودن میزان انرژی صرف شده در شرایط بهینه در سایر پاسخ‌ها بیانگر آن است که میزان تخریب ترکیبات زیست‌فعال مانند بتالائین، فنل و فلاوونوئید کاهش یافته و موجب افزایش بازدهی کل استخراج این ترکیبات می‌گردد.

نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از روش‌های جدید استخراج مانند استخراج به کمک مایکروویو به دلیل افزایش و بهبود انتقال جرم و سازگاری با محیط زیست، گسترش فراوانی یافته‌اند. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی استخراج بتالائین و ترکیبات زیست‌فعال از عصاره متانولی چغندر قرمز به کمک مایکروویو بود. به کارگیری مایکروویو جهت استخراج ترکیبات زیست‌فعال چغندر قرمز موجب کاهش زمان استخراج و در نتیجه کاهش انرژی مصرفی گردید. با توجه به نتایج حاصل شده از این پژوهش می‌توان استخراج به کمک مایکروویو را روشی کارآمد و سریع دانست. در نتیجه، مایکروویو به دلیل کاهش زمان و انرژی مصرفی، کاهش مصرف حلال روشی اقتصادی بوده که می‌تواند جایگزین روش‌های متداول استخراج گردد.

منابع

1. AACC. 1999. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of Analysis of the American.
2. Ballard, T., Mallikarjunan, P., Zhou, K. and O'Keefe, S. 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. Food Chemistry. 120(4): 1185-1192.
3. Barrera, F.A., Reynoso, C.R. and Gonzalez de Mejía, E. 1998. Estabilidad de betalaínas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Food Science and Technology International. 4(2): 115-120.

4. 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 and Technology. 59(1): 276-282.
5. Chan, Ch.H., Yusoff, R., Ngoha, G.Ch. and Wai-Lee Kung, F. 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. Journal of Chromatography. 1218(37): 6213- 6225.
6. Chandrasekar, V., San Martin-Gonzalez, M.F., Hirst, P. and Ballard, T.S. 2015. Optimizing microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from red delicious and Jonathan apple pomace. Journal of Food Process Engineering .doi: 10.1111/jfpe.12187.
7. Chen, H.J., Chung, C.P., Chiang, W. and Lin, Y.L. 2011. Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran. Food Chemistry. 126(4): 1741-1748.
8. Golmakani, M.T., and Rezaei, K. 2008. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chemistry. 109(4): 925-930.
9. Goncalves, L.C.P., Di Genova, B.M., Dorr, F.A., Pinto, E. and Bastos, E.L. 2013. Effect of dielectric microwave heating on the color and antiradical capacity of betanin. Journal of Food Engineering. 118: 49-55.
10. Herbach, K.M., Stintzing, F.C. and Carle, R. 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. Food Chemistry and Toxicology. 69(6): 491-498.
11. Herbach, K.M., Stintzing, F.C. and Carle, R. 2006. Betalain stability and degradation-structural and chromatic aspects. Journal of Food Science. 71(4): 41-50.
12. Hu, Z., Cai, M. and Liang, H.H. 2008. Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saiko saponins from *Radix bupleuri*. Separation and Purification Technology. 61(3): 266-275.
13. Jackman, R. and Smith, J. 1996. Anthocyanins and betalains. In Natural food colorants, eds. Hendry, G., Houghton, J. Glaslow, UK, Blackie Academic & Professional, pp: 244-309.
14. Kanner, K., Harel, S. and Granit, R. 2001. Betalains- a new class of dietary cationized antioxidants. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 49(11): 5178-5185.
15. Khajeh, M., Akbari Moghaddam, R. and Sanchooli, E. 2009. Application of doehlert design in the optimization of microwave-assisted extraction for determination of zinc and copper in cereal samples using FAAS. Food Analytical Methods. 3: 133-137.
16. Latorre, M.E., Bonelli, P.R., Rojas, A.M. and Gerschenson, L.N. 2012. Microwave inactivation of red beet (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) peroxidase

- and polyphenoloxidase and the effect of radiation on vegetable tissue quality. *Journal of Food Engineering*. 109 (4): 676-684.
17. Liaotrakoon, W., De Clercq, N., Van Hoed, V., Van de Walle, D., Lewille, B. and Dewettinck, K. 2011. Impact of thermal treatment on physicochemical, antioxidative and rheological properties of white-flesh and red-flesh dragon fruit (*Hylocereus* spp.) Purees. *Food Bioprocess Technology*. 6: 416-430.
18. Liazid, A., Guerrero, R.F., Cantos, E., Palma, M. and Barroso, C.G. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*. 124: 1238-1243.
19. 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 and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 129: 637-644.
20. Lucchesi, M.E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W. and Chemat, F. 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*. 79(3): 1079-1086.
21. Ma, W., Lu, Y., Dai, X., Liu, R., Hu, R. and Pan, Y. 2009. Determinations of anti-tumor constitute mollugin from traditional chinese medicine *Rubia cordifolia*: comparative study of classical and microwave extraction techniques. *Separation Science and Technology*. 44(4): 995-1006.
22. Manchali, S., Murthy, K.N.C., Nagaraju, S. and Neelwarne, B. 2012. Stability of betalain pigments of red beet. In: Neelwarne (ed) *Red beet biotechnology: food and pharmaceutical applications*. New York, pp: 55-74.
23. Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. and Carle, T.R. 2005. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6: 221- 231.
24. Moshref-broujeni, L. and Keramat, J. 2000. Evaluation of production edible red color from red beet and stability in food processes. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science*. 4: 91-100. (In Persian).
25. Pan, Y., He, C., Wang, H., Ji, X., Wang, K. and Liu, P. 2010. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component. *Food Chemistry*. 121(2): 497-502.
26. Pan, x., Niu, G. and Liu, H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*. 42(2): 129-133.
27. Prasad, K.N., Yang, E., Yi, C., Zhao, M. and Jiang, Y. 2009. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10(2): 155-159.

28. Proestos, C. and Komaitis, M. 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT-Food Science and Technology*. 41(4): 652-659.
29. Ravichandran, K., Saw, N.M.M.T., Mohdaly, A.A.A., Gabr, A.M.M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D. and Smetanska, I. 2013. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*. 50: 670-675.
30. Roussos, P.A. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*. 129: 253-258.
31. Routray, W. and Orsat, W. 2012. Microwave-Assisted Extraction of flavonoids: Review. *Food Bioprocess Technology*. 5: 409-424.
32. Sapers, G.M. and Hornstein, J.S. 1979. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science*. 49: 99-101.
33. Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J.C., Bryan, M. and Wu, Y. 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agriculture & Environment*. 1(2): 42-47.
34. Singh, M., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Mahmood, Z. and Shukla, Y. 2011. Tea polyphenols induce apoptosis through mitochondrial pathway and by inhibiting nuclear factor-kappaB and Akt activation in human cervical cancer cells. *Oncol Research*. 19:245-257.
35. Spigno, G., Fusca, F. and De Faveri, D.M. 2004. Wine-making wastes: Cellulose and hemicelluloses recovery by mild methods, In Proceedings of the Ninth International Congress on Engineering and Food, Montpellier, France.
36. Stintzing, F.C., Trichterborn, J. and Carle, R. 2006. Characterization of anthocyanin–betalain next term mixtures for food coloring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*. 79: 296-309.
37. Teng, H., Lee, W.Y. and Choi, Y.H. 2013. Optimization of microwave-assisted extraction for anthocyanins, polyphenols, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface Methodology. *Journal of Separation Science*. 36: 3107-3114.
38. Tiwari, B. and Cullen, P. 2012. Extraction of red beet pigments. In: Neelwarne (ed) *Red beet biotechnology: food and pharmaceutical applications*, New York, pp: 373-391.
39. Vincent, K.R. and Scholz, R.G. 1978. Separation and quantification of red beet betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 812-816.
40. Von Elbe, J.H., Schwartz, S.J. and Hildenbrand, B.E. 1981. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beet. *Journal of Food Science*. 46(6): 1713-1715.

41. Wang, L. and Weller, C.L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*.17(6): 300-312.
42. Wang, J. X., Xiao, X. H. and Li, G. K. 2008. Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography*.1198-1199 (1-2), 45-53.
43. Xiao, W., Han, L. and Shi, B. 2008. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*. *Separation and Purification Technology*. 62(3): 614-618.
44. Xiao, X., Song, W., Wang, J. and Li, G. 2012. Microwave-assisted extraction performed in low temperature and in vacuo for the extraction of labile compounds in food samples. *Analytica Chimica Acta*.712: 85- 93.
45. Zarban, A., Malekaneh, M. and Boghrati, M.R. 2007. Antioxidant properties of pomegranate juice and its scavenging effect on free radicals. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 14(3): 19-27. (In Persian).
46. Zhang, H.F., Zhang, Zhang, X., Yang, X.H., Qiu, N.X., Wang, Y. and Wang, Z.Z. 2013. Microwave-assisted extraction of flavonoids from cultivated *Epimedium sagittatum*: Extraction yield and mechanism, antioxidant activity and chemical composition. *Industrial Crops and Products*. 50: 857-865.



Optimization of microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*) and evaluating the antioxidant activity of obtained extract

S. Kooshesh¹ and M.T. Golmakani^{2*}

¹Former M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, ²Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 2015/04/07; Accepted: 2015/07/22

Abstract

Background and objective: Microwave-assisted extraction (MAE) is one of the novel, fast, and efficient methods for extraction of bioactive compounds. The aim of this study was the optimization of MAE of betalains from red beet (*Beta vulgaris*) and evaluating antioxidant activity of its methanolic extract.

Materials and methods: The effects of independent variables, namely microwave power level (100-300W), extraction time (1-15 min), and liquid-to-solid ratio (10-30 ml/g) were investigated on total extraction yield, free radical scavenging activity, phenolics, flavonoids, and betalains (betaxanthin and betacyanin) contents using central composite design.

Results: According to obtained results, the total phenolic, flavonoid, and betalains contents were decreased by increasing the extraction time, significantly. Simultaneous increase of microwave power level and liquid-to-solid ratio resulted in significant increase of total phenolic, flavonoid, and betalains contents ($p < 0.05$). The optimized condition of MAE of phenolics, flavonoids, and betalains was microwave power level of 300 W, liquid-to-solid ratio of 30 ml/g, and extraction time of 1 min. In contrast, the simultaneous increase of microwave power level and liquid-to-solid ratio resulted in a significant decrease of total extraction yield ($P < 0.05$). The optimized condition of the highest total extraction yield was microwave power level of 100 W, liquid-to-solid ratio of 10 ml/g, and extraction time of 15 min.

Conclusion: We can apply MAE method for extraction of bioactive compounds at a shorter extraction time and energy saving.

Keywords: Betalain, Extraction, Microwave, Red Beet

* Corresponding author; golmakani@shirazu.ac.ir