استخراج بتاکاروتن با استفاده از حلال سبز: تاثیر پیش‌تیمارهای آنزیمی و سورفاکتانت

بهرام فتحی آچاچلوئی*[1]، مهدی جلالی جیوان[2]، حسن احمدی گاولیقی[2]

1- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
2- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: 98/07/21 تاریخ پذیرش: 98/08/25)

چکیده

با توجه به افزایش درخواست مصرف‌کنندگان به استفاده از مواد غذایی سالم و ایمن، توسعه‌ی یک روش سالم‌تر برای استخراج ترکیبات غذایی در مقایسه با حلال‌های آلی نیاز جدی پیش روی صنعت غذای کشور است. از طرف دیگر صنایع تولید آبمیوه فرصت خوبی برای استفاده از ضایعات تولید شده در این واحدها را برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال از قبیل کاروتنوئیدها فراهم می‌کند از اینرو هدف پژوهش حاضر استخراج بتاکاروتن به عنوان کاروتنوئید اصلی هویج، از ضایعات تفاله‌ی هویج با استفاده از حلال سبز (آب مقطر حاوی 2% اتانول و 4% سورفاکتانت) می‌باشد. نتایج نشان داد که در بین حلال‌های آلی مورد مطالعه، 1-پروپانول و اتانول بترتیب با 0/56 و 0/51 میلی‌گرم بر گرم پودر هویج و بدون تفاوت آماری معنی‌دار با هم (P>0/05) بالاترین کارایی را در استخراج یک مرحله‌ای نشان دادند در حالیکه در استخراج 4 مرحله‌ای اتانول (0/92mg/g CP) کارایی بالاتری از حلال 1-پروپانول (0/87mg/g CP) داشت. همچنین، کارایی پائین حلال سبز آب مقطر حاوی 2% اتانول (0/04mg/g CP) بعد از اعمال پیش‌تیمار آنزیمی (61 واحد پکتینازی از آنزیم پکتیناز تجاری Endozym ® Pectofruit) بشکل معنی‌داری افزایش یافت (mg/g 0/18CP) که کارایی بالاتری نسبت به آنزیم‌های سلولاز مورد مطالعه (Celluclast 1.5 L و Celluclast BG) می‌باشد. علاوه بر این حضور 4% از هر یک از سورفاکتانت‌های لسیتین سویا، اسپن 20، توین 20 و 80 منجر به افزایش چشمگیر کارایی استخراج حلال سبز گردید که در این بین، توین 80 کارایی بالاتری نشان داد (0/29mg/g CP). ضمن اینکه، تمامی سورفاکتانت‌ها با پیش‌تیمار آنزیمی اثر هم‌افزایی داشته و ترکیب پیش تیمار پکتینازی با توین 80 منجر به افزایش کارایی تا 62% حلال آلی (اتانول چهارمرحله‌ای) گردید و نهایتا پیش‌تیمار آنزیمی و استفاده همزمان از سورفاکتانت‌های توین 80 و اسپن 20 (1:1 w/w)، این کارایی را تا بیش از 90% اتانول افزایش یافت (0/84mg/g CP).

کلید واژگان: بتاکاروتن، حلال سبز، آنزیم، سورفاکتانت.

*مسئولمکاتبات: b_fathi@uma.ac.ir

1- مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان بیش از پیش، خواهان استفاده از مواد غذایی حاوی اجزای طبیعی به‌جای انواع غذاهای دارای اجزای سنتزی از قبیل رنگ‌های سنتزی هستند. از جمله اجزای طبیعی قابل استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی، کاروتنوئیدها هستند که علاوه بر ایجاد رنگ، عمدتا به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین A شناخته شده‌اند و همچنین مطالعاتی نیز در ارتباط با نقش پاداکسیدانی این ترکیبات انجام گرفته است[1]. از دیگر تاثیرات سلامتی‌بخش کاروتنوئیدها می‌توان به نقش آن‌ها در جلوگیری از ابتلا به انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی-عروقی و آب‌مروارید اشاره کرد[2]. بتاکاروتن فراوان‌ترین کاروتنوئید بوده که در مقادیر قابل توجهی در بسیاری از میوه‌جات و صیفی‌جات از قبیل زردآلو، مانگو، اسفناج و هویج یافت می‌شود. در بین منابع غذایی، هویج (DaucusCarota) با حدود 60-300 میلی‌گرم در 100 گرم وزن مرطوب بالاترین محتوی بتاکاروتن را دارد که حدود 60-80% کل کاروتنوئیدهای این گیاه می‌باشد و عمدتا در اتصال با پروتئین‌ها می‌باشد[3]. طبق آمارهای موجود میزان تولید هویج 37 میلیون تن در سال می‌باشد[4]که این میزان تولید فرصت مناسبی برای فرآوری و پالایش ضایعات تولیدی واحدهای فرآوری هویج که حدود 11% هویج فرآوری شده می‌باشد را ایجاد می‌کند[5].

از جمله کاربردهایی که برای این ضایعات می‌توان متصور شد استخراج کاروتنوئیدها به منظور استفاده برای فرمولاسیون و غنی‌سازی محصولات غذایی و تولید فرآورده‌های غذایی-دارویی جدید است. روش رایج برای استخراج کارتنوئیدها از جمله بتاکاروتن استفاده از حلال‌های آلی می‌باشد که علاوه بر زمان‌بر بودن و نیاز به تجهیزات گران‌قیمت، نگرانی‌هایی در ارتباط با باقیمانده حلال آلی در محصول نهایی وجود دارد ضمن اینکه دورریز حلال آلی سلامت محیط زیست را تهدید می‌کند[6]. از اینرو با توجه به رشد نگرانی‌های مرتبط با محیط زیست و ظهور فناوری‌های سبز دوست‌دار مصرف کننده و محیط زیست، هدف اصلی مطالعه حاضر، ارزیابی امکان استخراج بتاکاروتن از ضایعات هویج با تکیه بر روش سبز (آب حاوی درصدهای پایین کمک‌حلال) بوده و در ادامه تاثیر پیش‌تیمار آنزیم و نیز حضور مقادیر جزئی از سورفاکتانت‌های خوراکی بر کارایی استخراج بررسی خواهد شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

نمونه‌ی تفاله هویج (*Daucuscarota L.*) از آبمیوه‌گیری محلی (اردبیل، ایران) تهیه شد و تا رطوبت نهایی 8% خشک شد (Ma 35, Sartorius, Germany) و پس از آسیاب شدن (FH-140, Hamilton, China) با استفاده از الک آزمایشگاهی مش شماره 25 (ENDECOTTS, London, England) الک شده و تا زمان استفاده در ظرف دربسته مات در دمای 4C° یخچال نگهداری گردید.

اسپن 20 (HLB:8/6)، توین 20 (HLB:16/7)، توین 80 (HLB:15)، سدیم استات، استیک اسید گلاسیال، سدیم پتاسیم تاراتارات (نمک راشل)، دی نیتروسالیسیلیک اسید، هیدروکسید سدیم و هیدروکسید پتاسیم با درجه‌ی خلوص تجزیه‌ای و 1-پروپانول، اتانول، متانول، استون و ان-هگزان با درجه‌ی HPLC از شرکت مواد شیمیایی مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شدند و بدون انجام خالص‌سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. لسیتین تجاری سویا از شرکت بهپاک (بهشهر، ایران) خریداری شد و خالص‌سازی بیشتر با جزء به جزء کردن و حذف روغن توسط استون انجام گرفت.

آنزیم پکتیناز تجاری (Endozym ® Pectofruit) حاصل از منابع میکروبی و در حالت مایع توسط گروه AEB (Spindal Co., Brescia, Italy) و آنزیم‌های Celluclast 1.5L و Celluclast BG حاصل از منابع میکروبی توسط شرکت نووزیم (Novozymes, Denmark) اهدا شدند. برای تهیه‌ی تمامی محلول‌ها و مخلوط‌های استخراجی که نیاز به آب داشت از آب مقطر استفاده شد.

2-2- روش کار

2-2-1- بهینه‌سازی استخراج یک مرحله‌ای با حلال‌های مختلف

در بین منابع مطالعه شده سه حلال اتانول، 1-پروپانول و هگزان کاربرد بیشتری در استخراج داشته است از اینرو با الهام از روش آمایا، استخراج یک مرحله‌ای بتاکاروتن از پودر هویج با استفاده از این حلال‌ها در مدت زمان‌های مختلف 3، 6، 9 و 12 ساعت و در سه دمای 25، 45 و 60C° انجام شد[7]. برای

انجام این کار، 100 میلی‌گرم از نمونه با رطوبت 8% در 5 ml حلال با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت 300 دور در دقیقه در شرایط نور کم همزده شد. سپس، جهت جداسازی فاز رویی از فاز ته‌نشست، محتوای ظرف استخراج بمدت 5 دقیقه بحال خود رها گردید. آنگاه، قسمت رویی بدقت با استفاده از پیپت جدا و جهت آنالیز در دمای یخچال (4C°) و در ظروف تیره نگهداری شد. لازم به یادآوری است که در این پژوهش، در تمام مدت استخراج و نگهداری، به منظور جلوگیری از اکسایش خودبخودی (اتواکسیداسیون) و نیز واکنش‌های ایزومریزاسیون سیس-ترانس، نمونه‌ها با استفاده از فویل آلومینیومی پوشش داده شدند.

2-2-2- تعیین محتوای بتاکاروتن

به‌منظور تعیین محتوای بتاکاروتن از روش فیش و همکاران[8]با اندک تغییراتی استفاده شد. بدین منظور، بعد از جداسازی کامل عصاره‌ها از باقی‌مانده‌های پلت (سانتریفوژ کردن بمدت 15 دقیقه در شتاب 10000 g و دمای 25C°)، میزان جذب این عصاره‌ها با استفاده از طیف نورسنج مرئی-فرابنفش (Cary60 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent, US, path length= 1cm) در طول موج 448 نانومتر قرائت و محتوای بتاکاروتن بر اساس میلی‌گرم بر گرم پودر اولیه با استفاده از معادله‌ی (2-3) تعیین شد.

$$C = (A/\varepsilon) \times (1/b) \times 536.87 \times V / M \times 1L/103ml \times 103mg/g \times Kg/103g \quad \text{معادله (2-3)}$$

در این معادله، C محتوای بتاکاروتن نمونه (mg/g)، A میزان جذب نمونه در طول موج بیشینه بتاکاروتن در حلال مربوطه، b طول مسیر نوری (cm)، 536/87 وزن مولی بتاکاروتن (g/mol)، V حجم حلال مورد استفاده (ml) و M وزن نمونه‌ی مورد استخراج (Kg) می‌باشد. همچنین، ضریب خاموشی مولی بتاکاروتن (ε) ان-هگزان معادل 139200 (l/mol cm) می‌باشد[9].

2-2-3- استخراج چند مرحله‌ای

با توجه به رایج بودن استخراج چندمرحله‌ای در مقالات مرور شده، جهت مقایسه کارآیی استخراج چندمرحله‌ای با کارآیی مناسب‌ترین زمان استخراج یک مرحله‌ای بدست آمده در مرحله قبل، استخراج چندمرحله‌ای بتاکاروتن با اتانول و 1-پروپانول در دمای 60C° انجام گرفت. شرایط استخراج مشابه روش یک‌مرحله‌ای بود با این تفاوت که در 4 مرحله (هر مرحله 15 دقیقه) تا رنگبری کامل باقی‌مانده پودر انجام گرفت. بعد از هر مرحله، بخش مایع جداسازی شد و از بخش باقیمانده با استفاده از حلال تازه بازاستخراج انجام گرفت و نهایتا عصاره‌های جداسازی شده در این 4 مرحله جهت تعیین محتوای بتاکاروتن از طریق طیف‌سنجی باهم مخلوط شدند.

2-2-4- پیش‌تیمار آنزیمی پودر هویج

بعد از ارزیابی کارایی استخراج اتانول 2% در آب مقطر، به‌منظور بررسی تاثیر پیش‌تیمار آنزیمی بر کارایی استخراج چند مرحله‌ای بتاکاروتن با این حلال سبز، مقدار 100 mg از پودر در 5 ml از رقت 100:1 (آنزیم: آب مقطر) محلول آنزیم‌های مختلف شامل؛ آنزیم پکتیناز تجاری ® Endozym pectofruit، آنزیم Celluclast 1.5 L و آنزیم Celluclast BG بمدت زمان‌های 30، 60، 90 و 120 دقیقه در 175 دور در دقیقه شیکر انکوباتور (KS 4000i control, IKA, Germany) در دمای 50C° همزنی شد. سپس، با افزودن 5 ml از حلال اتانول 2% در آب مقطر به هر یک از نمونه‌ها، همزنی در سرعت 300 دور در دقیقه در دمای 60C° بمدت 15 دقیقه توسط همزن مغناطیسی (MR3001, Heidolph, Germany) انجام گرفت. سپس، فاز آلی بدقت جدا شد و باز استخراج از فاز ته‌نشست تا سه مرحله دیگر تکرار شد نهایتا فاز رویی بدست آمده از 4 مرحله باهم مخلوط و محتوای بتاکاروتن از طریق قرائت جذب در طول موج 448 نانومتر با استفاده از معادله (2-3) تعیین گردید. آزمون کنترل نیز در شرایط مشابه ولی بدون مرحله پیش‌تیمار آنزیمی انجام گرفت.

2-2-5- استخراج تسهیل شده با آنزیم- سورفاکتانت

در این زیر بخش از پژوهش ابتدا پودر هویج در شرایط بهینه پیش‌تیمار آنزیمی تیمار شد و سپس استخراج بتاکاروتن با استفاده از 5 ml آب مقطر حاوی 2% اتانول و 4% از یکی از سورفاکتانت لسیتین سویا، توین 80، توین 20 یا اسپن 20 مطابق شرایط اشاره شده در زیر بخش 2-2-4 انجام گرفت.

2-2-6- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت و نتایج ارائه شدهبصورت میانگین±انحراف استاندارد سه تکرار (Mean±SD) گزارش شد. جهت مقایسه‌ی میانگین‌ها و بررسی معنی‌داربودناثر تیمارها در سطح اطمینان 5% (P< 0/05)،از آزمون چنددامنه‌ای دانکن و آنالیز واریانس

(ANOVA)با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی 21 (IBM SPSS Statistics 21) استفاده شد.

3- نتایج و بحث

3-1- استخراج با حلال‌های آلی

به منظور داشتن ارزیابی درست در ارتباط با کارایی فناوری مورد استفاده در پژوهش حاضر، ضروری است که بالاترین کارایی استخراج حلال آلی مورد مقایسه قرار گیرد از اینرو ابتدا استخراج بتاکاروتن از پودر هویج با استفاده از سه حلال آلی ان-هگزان، اتانول و 1-پروپانول تحت شرایط مختلف زمان (3، 6، 9 و 12 ساعت) و دما (25، 45 و 60C°) انجام گرفت. نتایج نشان داد (جدول 1) که بدلیل گرادیان غلظت اولیه بین حلال و پودر، استخراج تا زمان 6 ساعت با سرعت بالا انجام شده و بعد از آن محتوای بتاکاروتن ثابت مانده یا در مواردی کاهش یافته است که بیانگر نرخ بسیار پائین استخراج و نیز تجزیه احتمالی بتاکاروتن در طی زمان استخراج می‌باشد.

Table 1 Comparison the interaction effect of temperature-solvent type on beta-carotene extraction from carrot powder

Solvent Type	Temperature (ºC)	Beta-carotene content(mg/g CP)			
		Extraction Time (h)			
		3	6	9	12
Hexane	25	0.09 ± 0.01^{t}	0.13 ± 0.02^{rst}	0.21 ± 0.02^{nop}	0.26 ± 0.03^{mn}
	45	0.18 ± 0.03^{pq}	0.25 ± 0.01^{n}	0.32 ± 0.03^{kl}	0.33 ± 0.02^{jkl}
	60	0.19 ± 0.04^{op}	0.35 ± 0.06^{ijkl}	0.39 ± 0.02^{fghi}	0.40 ± 0.03^{efghi}
Ethanol	25	0.11 ± 0.03^{st}	0.17 ± 0.01^{pqr}	0.35 ± 0.04^{ijkl}	0.38 ± 0.02^{ghij}
	45	0.26 ± 0.05^{mn}	0.32 ± 0.03^{kl}	0.41 ± 0.06^{efgh}	0.44 ± 0.01^{cdef}
	60	0.30 ± 0.03^{lm}	0.51 ± 0.04^{ab}	0.49 ± 0.02^{bc}	0.43 ± 0.04^{defg}
1-Propanol	25	0.14 ± 0.02^{qrs}	0.23 ± 0.01^{no}	0.37 ± 0.03^{hijk}	0.41 ± 0.02^{efgh}
	45	0.33 ± 0.03^{jkl}	0.39 ± 0.01^{fghi}	0.44 ± 0.00^{cdef}	0.45 ± 0.02^{cde}
	60	0.35 ± 0.04^{ijkl}	0.56 ± 0.01^{a}	0.51 ± 0.03^{ab}	0.47 ± 0.01^{bcd}

Means with different letters are significantly different ($p< 0.05$)

علاوه بر این، دما یکی از پارامترهای تاثیرگذار بر استخراج بتاکاروتن از منابع گیاهی است [10]. نتایج بررسی تاثیر دما بر کارایی استخراج نشان داد که با افزایش دما کارایی افزایش یافته است و دمای 60C° بالاترین کارایی را داشته است. دلیل این امر انتقال جرم ناشی از افزایش دما می‌باشد [11]. همچنین تغییرات ساختار سلولی در ماتریکس دیواره سلولی گیاهی در افزایش کارایی در دماهای بالا نیز تاثیر دارد. در این ارتباط دوتا و همکاران بیان کردند که استفاده از فرآیندهای حرارتی نظیر پختن، آنزیم‌بری و بخاردهی منجر به آزادسازی کاروتنوئیدهای متصل به پروتئین‌ها شده و از این طریق به افزایش کارایی استخراج کمک می‌کند [12]. مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که بتاکاروتن عمدتا به شکل ترانس در منابع طبیعی وجود دارد [13]. ولی در اثر فرآیندهای مختلف بخشی از آن به ایزومر سیس تبدیل می‌شود. این تبدیل اولین مرحله‌ی تجزیه‌ی کاروتنوئیدها بوده که در ادامه بواسطه‌ی انجام اکسیداسیون و تشکیل مشتقات آپوکاروتنوئیدی واکنش‌های تجزیه‌ای ادامه می‌یابد [14]. به عنوان مثال، بر خلاف نتیجه حاضر، نتایج مطالعات کالو و همکاران نشان می‌دهد که کارایی استخراج لیکوپن در دمای 60C° بدلیل واکنش‌های تجزیه‌ای و اکسیداسیون پائین‌تر از 50C° می‌باشد [15].

تبدیل ایزومر ترانس به سیس در اثر فرآیندهای مختلف منجر به کاهش نقش بتاکاروتن در تبدیل به ویتامین A می‌شود چرا که ایزومر سیس در مقایسه با ایزمر ترانس پیش‌ساز ضعیفی از ویتامینA می‌باشد[16]. از اینرو انجام فرآیند استخراج در شرایط ملایم از نظر دما یکی از رویکردهای ضروری پیش‌روی استخراج کاروتنوئیدهاست لذا در مطالعه حاضر تاثیر استفاده از دماهای بالاتر از 60C° بررسی نشد و جهت افزایش بیشتر کارایی استخراج، رویکرد استخراج چندمرحله‌ای و در ادامه تاثیر پیش‌تیمارهای آنزیمی جهت از هم پاشیدن یکپارچکی دیواره سلولی گیاهی و نیز حضور سورفاکتانت‌های مختلف جهت کمک به اتصال و رهایش بتاکاروتن به محیط حلال سبز مورد بررسی قرار گرفت.

مطابق نتایج ارائه شده در جدول 2، میزان بتاکاروتن استخراج شده توسط روش چندمرحله‌ای کاملا بهتر از روش یک‌مرحله‌ای می‌باشد در این ارتباط چنین استدلال می‌شود که در مرحله‌ی اول استخراج بخش قابل توجهی از بتاکاروتن

موجود در نمونه در اثر انحلال در حلال آلی خارج می‌شود و حلال مورد استفاده در مراحل بعدی که ظرفیت بالایی برای انحلال دارد وقتی در تماس با تهنشست استخراج حاصل از مراحل قبلی، با سطح بتاکاروتن بسیار پائین‌تر نسبت به پودر اولیه‌ی هویج، قرار می‌گیرد براحتی می‌تواند مقادیر باقیمانده کاروتنوئید آن‌ها را در خود حل کند. با توجه به نتایج حاصل از این بخش از پژوهش می‌توان گفت که در مقایسه با استخراج یک مرحله‌ای، با بکارگیری استخراج چندمرحله‌ای می‌توان در مدت زمان کمتر و با کارایی بهتری کاروتنوئیدها را از منابع گیاهی استخراج کرد که این مهم از دیدگاه صنعتی می‌تواند بسیار حائز اهمیت قلمداد شود.

Table 2 Comparison the interaction effect of solvent type and extraction cycle on beta-carotene extraction from carrot powder under 60ºC

Solvent Type	Beta-carotene content (mg/g of CP)	
	One-cycle extraction	Four-cycle extraction
Ethanol	0.51 ± 0.04^{b}	0.92 ± 0.10^{a}
1-Propanol	0.56 ± 0.01^{b}	0.87 ± 0.05^{a}

Means with different letters are significantly different ($p< 0.05$)

3-2- استخراج با استفاده از حلال سبز

با توجه به نگرانی‌های موجود در بکارگیری حلال‌های آلی برای استخراج ترکیبات غذایی، در این مطالعه سعی شد تا استخراج بتاکاروتن با استفاده از حلال سبز متشکل از آب مقطر حاوی 2% اتانول (حداکثر مجاز الکل در فرآورده‌های غذایی با آرم حلال) به عنوان حلال خوراکی بررسی شود که در صورت موفقیت‌آمیز بودن می‌تواند جهت استخراج و معرفی کاروتنوئیدها بویژه در جوامع اسلامی کاربرد قابل توجهی داشته باشد. نتایج استخراج 4 مرحله‌ای (مطابق روش 2-2-3) نشان داد که محتوی بتاکاروتن اتانول 2% در آب مقطر 0/04 میلی‌گرم در گرم است که در مقایسه با کارایی استخراج حلال‌های آلی (جداول 1 و 2) بسیار پائین می‌باشد. از اینرو در ادامه، تاثیر پیش‌تیمار با استفاده از آنزیم‌های مختلف (Pectofruit، EndozymCelluclast 1.5L و Celluclast BG) بر کارایی استخراج این حلال سبز مورد بررسی قرار گرفت (شکل 1). آنزیم‌ها هیدرولیز مواد سازنده‌ی دیواره‌ی سلولی از قبیل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و مواد پکتیکی را کاتالیز کرده و از این طریق به از هم گسستگی دیواره سلولی و رهایش ترکیبات درون‌سلولی (کاروتنوئیدها) کمک می‌کند [17]. پیش از این مطالعات گسترده‌ای در جهت استخراج لیکوپن با استفاده از پیش‌تیمار آنزیمی انجام گرفته است [18] اما نکته قابل توجه این است که نوع آنزیم مورد استفاده بایستی با توجه به نوع سوبسترای مورد استخراج انتخاب گردد از اینرو در این مطالعه از آنزیم‌های مختلف پکتیناز (Pectofruit) و سلولاز (Celluclast BG و Celluclast 1.5 L) جهت پیش‌تیمار استفاده شد تا در کل یک حالت بهینه‌ای برای استخراج بتاکاروتن از پودر هویج پیشنهاد شود.

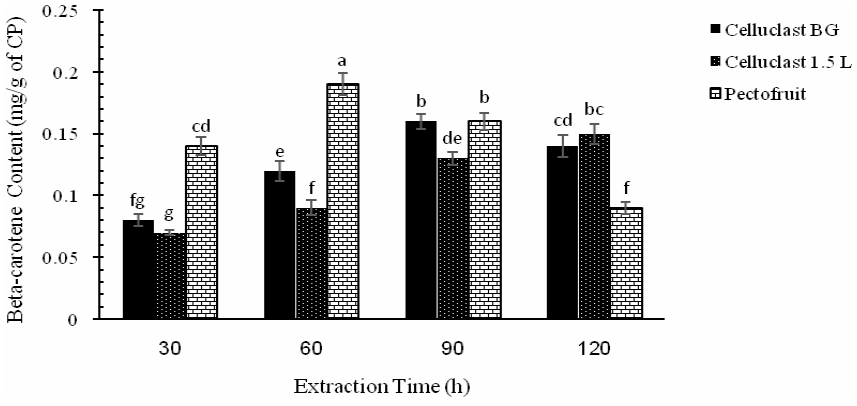

Fig 1 Comparison the interaction effect of extraction time-enzyme type on beta-carotene extraction from carrot powder

همانطور که مشاهده می‌شود تمامی پیش‌تیمارها کارایی استخراج بتاکاروتن از پودر هویج را در مقایسه با کنترل (اتانول 2% در آب مقطر با محتوی بتاکاروتن با محتوای بتاکاروتن 0/04 mg/g CP) بشکل معنی‌داری افزایش دادند

($p<0/05$). همچنین در بین سه نوع آنزیم استفاده شده، برتری آنزیم Pectofruit 100X می‌تواند بدلیل فعالیت آبکافتی چندگانه (سلولازی-پکتینازی) این آنزیم باشد که بدنبال این عمل نفوذپذیری غشای سلولی برای استخراج بتاکاروتن افزایش می‌یابدو در نتیجه به شکل موثرتری توانسته است در مقایسه با دیگر آنزیم‌ها استخراج بتاکاروتن را تسهیل کند (0/18 mg/g CP). در حالیکه دو آنزیم دیگر عمدتا فعالیت سلولازی داشته و تاثیر چندانی بر لایه‌ی میانی دیواره‌ی سلولی که عمدتا متشکل از ساختارهای پکتیکی است نداشته است که منجر به کارایی پائین‌تر استخراج بتاکاروتن شده است.

یکی دیگر از راه‌های پیش‌رو جهت افزایش کارایی استخراج، استفاده از ترکیبات فعال سطحی (سورفاکتانت‌ها) می‌باشد. سازوکار عمل سورفاکتانت‌ها برای انحلال ترکیبات و استخراج آن‌ها، اتصال همزمان به جزء استخراج شونده و حلال استخراج کننده بدلیل حضور همزمان بخش‌های آبدوست و آبگریز در ساختار شیمیایی این مولکول‌ها و نیز کاهش کشش سطحی می‌باشد. همانطور که در جدول 3 نشان داده شده است تمامی سورفاکتانت‌ها منجر به بهبود چشم‌گیر کارایی استخراج بتاکاروتن در مقایسه با نمونه شاهد (حلال سبز بدون حضور سورفاکتانت با محتوای بتاکاروتن 0/04 mg/g CP) شده است که در این بین توین 20 و 80 بترتیب با 0/09 و mg/g 0/29 CP کمترین و بیشترین کارایی را نشان داده است. سورفاکتانت‌های مختلف از نظر ویژگی‌های ساختاری مثل شاخص تعادل آبدوستی-چربی‌دوستی[1] و نیز درجه‌ی قطبیت و همچنین اندازه مولکولی با یکدیگر متفاوت بوده که اختلاف مشاهده شده در کارایی سورفاکتانت‌های مورد مطالعه در این پژوهش، می‌تواند ناشی از این اختلافات ساختاری باشد.

نکته‌ی قابل توجه دیگر این است که تمامی سورفاکتانت‌ها با پیش‌تیمار آنزیمی اثر هم‌افزایی داشته است که بیانگر آبکافت موفق دیواره‌ی سلولی گیاهی جهت اتصال موثر مولکول‌های سورفاکتانت و بتاکاروتن می‌باشد. در این میان، تیمار ترکیبی آنزیم پکتیناز تجاری با سورفاکتانت توین 20 بیشترین هم‌افزایی را داشته است (بیش از 3/7 برابر) اما نهایتا تیمار ترکیبی پکتیناز با سورفاکتانت توین 80 منجر به استخراج 0/57 میلی‌گرم بتاکاروتن به ازای هر گرم از پودر هویج اولیه شده است که حدود 62% کارایی استخراج 4 مرحله‌ای با استفاده از حلال اتانول می‌باشد (با محتوای بتاکاروتن 0/92 mg/g CP).

علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از دو سورفاکتانت (توین 80 و اسپن 20) نسبت به استفاده از سورفاکتانت منفرد کارایی بالاتری در استخراج بتاکاروتن دارد. لازم به ذکر است که مجموع مقادیر دو سورفاکتانت معادل مقدار سورفاکتانت انفرادی می‌باشد. در این زمینه، همانگونه که در جدول 3 نشان داده شده است استفاده ترکیبی از دو سورفاکتانت توین 80 و اسپن 20، حتی بدون استفاده از پیش تیمار آنزیمی توانسته است به شکل موثری بتاکاروتن را استخراج کند (0/69 mg/g CP). این افزایش کارایی بدون تردید مرتبط با سازوکارهای موثر بر استخراج از قبیل اندازه‌ی ذرات امولسیون تشکیل شده می‌باشد. پیش از این، چو و همکاران بیان کردند که استفاده همزمان سورفاکتانت‌های آبدوست (توئین‌ها) و آبگریز (اسپن‌ها) منجر به کاهش اندازه‌ی قطرات امولسیون مورد مطالعه شده است[19]. همچنین، افزایش پایداری فیزیکی امولسیون و افزایش حلالیت ترکیبات زیست فعال نیز در اثر استفاده همزمان از چند سورفاکتانت در منابع گزارش شده است[20]. دلیل انتخاب توین 80 و اسپن 20 برای استخراج بتاکاروتن، HLB بسیار بالا و پائین این دو سورفاکتانت می‌باشد (بترتیب 15 و 8/6) که در اثر ترکیب شده با نسبت‌های وزنی یکسان منجر به ایجاد سورفاکتانتی با HLB متوسط می‌شود (11/8). قابل ذکر است که در بین سورفاکتانت‌ها، پلی‌سوربات‌ها (توئین‌ها) بیشترین کاربرد را در تهیه‌ی امولسیونی‌های با درجه‌ی خوراکی دارند [21].

نکته‌ی ارزشمند دیگر این است که تیمار ترکیبی آنزیم پکتیناز تجاری با نسبت 1:1 از سورفاکتانت‌های توین 80 و اسپن 20 منجر به بالاترین کارایی (0/84 mg/g CP) در بین تمامی تیمارها شده است که حدود 91% کارایی استخراج با اتانول می‌باشد. با توجه به این نتیجه‌ی ارزشمند می‌توان گفت که با انتخاب درست سورفاکتانت و آنزیم می‌توان با استفاده از حلال‌های سبز، تا حد بالایی به کارایی استخراج با حلال‌های آلی رسید که این مهم نوید بخش بکارگیری این حلال‌ها در فرآوری و آماده‌سازی فرمولاسیون‌های غذایی می‌باشد.

1. Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)

Table 3 Comparison the interaction effect of enzyme pretreatment- mass ratio of extraction solvent on beta-carotene extraction from carrot powder as compared with ethanol based four-cycle extraction

Pretreatment condition (EndozymPectofruit)	Mass ratio of extractionsolvent	beta-carotene content (mg/g of CP)
Without Pretreatment	Ethanol (four-cycle)	**0.92±0.10^{a}**
Without Pretreatment	DW:Ethanol (98:2)	**0.04±0.02^{g}**
61.5 unit as pectinase Activity	DW:Ethanol (98:2)	0.18±0.04^{f}
Without Pretreatment	DW:Ethanol:Lecithin (94:2:4)	0.12±0.04f^{g}
61.5 unit as pectinase Activity	DW:Ethanol:Lecithin (94:2:4)	0.28±0.03^{e}
Without Pretreatment	DW:Ethanol:Tween 80 (94:2:4)	0.29±0.04^{e}
61.5 unit as pectinase Activity	DW:Ethanol:Tween 80 (94:2:4)	0.57±0.01^{d}
Without Pretreatment	DW:Ethanol:Span 20 (94:2:4)	0.12±0.02f^{g}
61.5 unit as pectinase Activity	DW:Ethanol:Span 20 (94:2:4)	0.26±0.05^{e}
Without Pretreatment	DW:Ethanol:Tween 20 (94:2:4)	0.09±0.01^{g}
61.5 unit as pectinase Activity	DW:Ethanol:Tween 20 (94:2:4)	0.34±0.07^{e}
Without Pretreatment	DW:Ethanol:Tween 80: Span 20 (94:2:2:2)	**0.69±0.10^{c}**
61.5 unit as pectinase Activity	DW:Ethanol:Tween 80: Span 20 (94:2:2:2)	**0.84±0.08^{b}**

Means with different letters are significantly different ($p< 0.05$)

4- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان گفت که در بین سه حلال هگزان، اتانول و 1-پروپانول، اتانول توانایی بالاتری در استخراج بتاکاروتن از ضایعات هویج دارد. اما نظر به خطر استفاده از حلال‌های آلی برای کاربردهای غذایی، در این پژوهش توانایی حلال سبز (آب مقطر حاوی 2% اتانول و 4% سورفاکتانت) جهت استخراج بتاکاروتن ارزیابی شد. نتایج نشان داد که کارایی حلال سبز بعد از پیش‌تیمار آنزیمی بشکل قابل توجهی افزایش یافت. همچنین با افزودن 4% از سورفاکتانت‌های مختلف (لسیتین سویا، اسپن 20، توین 20 و 80) کارایی به شکل معنی‌داری افزایش یافت. علاوه بر این، هم‌افزایی اثر سورفاکتانت با پیش‌تیمار آنزیمی منجر به افزایش کارایی استخراج تا 90% در مقایسه با استخراج با اتانول شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در صورت انتخاب درست آنزیم و سورفاکتانت می‌توان به شکل قابل‌مقایسه‌ای نسبت به حلال آلی، بتاکاروتن را از ضایعات هویج استخراج کرد که این دستاورد می‌تواند در امنیت بخشی به استخراج ترکیبات غذایی برای اهداف غذایی و دارویی مورد توجه صنایع مرتبط واقع شود.

5- منابع

[1] Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N.L., Ferruzzi, M.G. and Schwartz, S.J. 2002. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α-carotene, β-carotene, lycopene, and zeaxanthin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(1): 2, 221-226.

[2] Sharoni, Y., Linnewiel‐Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M. and Levy, J. 2012. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: a review. Molecular nutrition & food research, 56(2): 259-269.

[3] Fikselová, M., Šilhár, S., Mareček, J. and Frančáková, H. 2008. Extraction of carrot (Daucuscarota L.) carotenes under different conditions. Czech Journal of Food Sciences, 26(4): 268-274.

[4] Andrade Lima, M., Charalampopoulos, D. and Chatzifragkou, A. 2018. Optimisation and modelling of supercritical CO2 extraction process of carotenoids from carrot peels. The Journal of Supercritical Fluids, 133: 94-102.

[5] Stahl, W. and Sies, H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1740(2): 101-107.

[6] Jalali‐Jivan, M., Abbasi, S. and Scanlon, M.G. 2019. Microemulsion as nanoreactor for lutein extraction: Optimization for ultrasound pretreatment. Journal of Food Biochemistry: e12929.

[7] Jivan, M.J. and Abbasi, S. 2018. An attempt to cast light into lutein extraction and its alkali optimization. Journal of Food Measurement and Characterization: 1-8.

[8] Fish, W.W., Perkins-Veazie, P. and

Collins, J.K. 2002. A Quantitative Assay for Lycopene That Utilizes Reduced Volumes of Organic Solvents. Journal of Food Composition and Analysis, 15(3): 309-317.

[9] Craft, N.E. and Soares, J.H. 1992. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and .beta.-carotene in organic solvents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(3): 431-434.

[10] Ofori‐Boateng, C. andLee, K. 2013. Response surface optimization of ultrasonic‐assisted extraction of carotenoids from oil palm (E laeis guineensis Jacq.) fronds. Food science & nutrition, 1(3): 209-221.

[11] Rafajlovska, V., Slaveska-Raicki, R., Koleva Gudeva, L. and Klopceska, J. 2007.Spice paprika oleoresin extraction under different conditions involving acetone and ethanol. Journal of Food, Agriculture & Environment, Helsinki-Finland: 65-69.

[12] Dutta, D., Raychaudhuri, U. and Chakraborty ,R. 2005. Retention of ß-carotene in frozen carrots under varying conditions of temperature and time of storage. African Journal of Biotechnology, 4(1): 102-103.

[13] Gul, K., Tak, A., Singh, A., Singh, P., Yousuf, B. and Wani, A.A. 2015. Chemistry, encapsulation, and health benefitsof β-carotene-A review. Cogent Food & Agriculture, 1(1): 1018696.

[14] Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y. and Yueming, J. 2005. Stability of lycopene duringfood processing and storage. Journal of medicinal food, 8(4): 413-422.

[15] Calvo, M.M., Dado, D. and Santa-María, G. 2007. Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, β-carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder. European Food Research and Technology, 224(5): 567-571.

[16] Castenmiller, J.J. and West, C.E. 1998. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. Annual review of nutrition, 18(1): 19-38.

[17] Hanmoungjai, P., Pyle, D.L. and Niranjan, K. 2002. Enzyme‐assisted water‐extraction of oil and protein from rice bran. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 77(7): 771-776.

[18] Lavecchia, R. and Zuorro, A. 2008. Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes. European Food Research and Technology, 228(1): 153.

[19] Cho, Kim, S., Bae, E.K., Mok, C. and Park, J. 2008. Formulation of a cosurfactant‐free o/w microemulsion using nonionic surfactant mixtures. Journal of Food Science, 73(3): E115-E121.

[20] Li, Ghosh, A., Wagner, R.F., Krill, S., Joshi, Y.M. and Serajuddin, A.T.M. 2005. Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. International Journal of Pharmaceutics, 288(1): 27-34.

[21] Roohinejad, S., Oey, I., Everett, D.W. and Niven, B.E. 2014. Evaluating the Effectiveness of β-Carotene Extraction from Pulsed Electric Field-Treated Carrot Pomace Using Oil-in-Water Microemulsion. Food and Bioprocess Technology, 7(11): 3336-3348.

Beta-Carotene Extraction via Green-Solvent: Effect of Enzyme and Surfactant Pretreatments

Fathi-Achachlouei, B.[1*], Jalali-Jivan, M. [2], Ahmadi-Gavlighi, H. [2]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of MohaghehArdabili,Ardabil, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, TarbiatModares University, Tehran, Iran

(Received: 2019/10/13 Accepted:2019/11/16)

To meet the consumer's interests for natural remedies, food and pharmaceutical industries calls for a safe and green methods for food aims extraction. Besides, carrot juice industry, possess high potential for processing the less expensive by-products to extract high-value ingredients named carotenoids. The purpose of the present study was therefore to extract beta-carotene from carrot pomace using green solvent (distilled water containing 2% ethanol and 4% surfactant). Results showed that among the used solvents for one-cycle extraction, 1-propanol and ethanol without significant differences ($P>$ 0.05) were the most efficient with respectively 0.56 and 0.51 mg/g of CP beta-carotene content. Whiles, for four-cycle extraction the ethanol was the most capable (0.92 mg/g of CP). In addition, the poor ability of 2% ethanol containing distilled water (0.04 mg/g of CP) was significantly increased in the expense of enzyme hydrolysis via Endozym ® Pectofruit(61 U as pectinase activity). Moreover, the 4% of all of the surfactants (soy lecithin, span 20, tween 20 and tween 80) were significantly increased the extraction capability of the green solvent, wherein, the highest beta-carotene content was extracted with tween 80 (0.29 mg/g of CP). As well, all surfactants showed synergistic effect with enzyme pretreatment resulting up to 62% efficiency for tween 80 compared to four-cycle extraction with ethanol. All in all, the composed of distilled water: ethanol: tween 80: span 20 (94:2:2:2) led to a green extraction of beta-carotene from carrot pomace with 0.84 mg/ g of CP beta-carotene content and 90% extraction yield.

Key words: Beta-carotene, Green solvent, Enzyme, Surfactant.

[*]Corresponding Author E-Mail Address:b_fathi@uma.ac.ir