(مقاله پژوهشی)

ارزیابی شرایط بهینه استخراج بتایین از ملاس‌چغندرقند به روش کروماتوگرافی تعویض‌یونی

سمر خیامیم[1*]، بابک بابایی[2]، حمید نوشاد[2]، داریوش طالقانی[2]

۱-استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲-موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۲/۰۷

DOI: 10.30495/jfst.2022.1952874.1779

چکیده

چغندرقند علاوه بر قند از نظر آمینواسیدهایی مانند گلایسین بتایین حائز اهمیت است زیرا واجد خواص دارویی در طیور، آبزیان و حتی انسان می باشد به طوری که اخیرا در تولید داروهای ضد سرطان از آن استفاده می‌شود. این تحقیق با هدف بهینه سازی استخراج بتایین از ملاس چغندرقند به روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد. ابتدا به منظور بهینه سازی شرایط استخراج مواد تزریقی مختلف در ستون کروماتوگرافی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه سطح و با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل مواد تزریقی به ستون شامل: کلرید پتاسیم، ساکارز خالص و بتایین خالص؛ فاکتور دوم شامل سه درجه حرارت مختلف ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد و فاکتور سوم سه نوع رزین آزمایشگاهی، تجاری ۱ و تجاری ۲ با منشا پتاسیمی جهت استخراج در ستون کروماتوگرافی بود. حجم خروجی مواد از ستون کروماتوگرافی برای هر سه ماده شیمیایی به طور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت بود. بهترین درجه حرارت برای جداسازی بتایین حدود ۷۵ درجه سانتی گراد و بهترین رزین، رزین تجاری۱ بود که به طور معنی‌داری نسبت به رزین‌های دیگر با سرعت و مقدار و راندمان استحصال بیشتر بتایین را از ستون تفکیک می‌کرد. در مرحله دوم بتایین ملاس پس از سختی گیری، بر اساس شرایط بهینه تعیین شده در مرحله اول استخراج گردید. بر این اساس درصد خلوص بتایین استخراج شده از ملاس به ترتیب حدود ۵۴ ، ۶۴ و ۷۹ درصد با میانگین ۶۵/۶۶ درصد به دست آمد. این آزمایش به صورت آزمایشگاهی اجرا شد که نتایج آن در فاز صنعتی می‌تواند برای کارخانجات قند کشور به منظور استحصال بتایین از ملاس چغندرقند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: استخراج گلایسین بتایین، درجه حرارت، رزین، کروماتوگرافی، ملاس.

[*] مسئول مکاتبات: samar.khayam@gmail.com

۱-مقدمه

بتایین به عنوان تری متیل‌گلایسین، گلایسین بتایین، لیزین و اگزینورین شناخته می‌شود. گلایسین بتایین که بیشتر به عنوان بتایین مصطلح است از نظر ساختار و نه بیوشیمیایی ساده‌ترین آمینو اسید است (۱۲). این ماده محلول در آب بوده و به طور وسیعی در حیوانات، گیاهان، میکرو ارگانیزم‌ها، منابع غنی غذایی مثل غذاهای دریایی به خصوص بی‌مهرگان دریایی (حدود یک درصد)، جوانه یا سبوس‌گندم (حدود یک درصد) و اسفناج (حدود ۰/۷درصد) وجود دارد. به عبارتی بتایین در بدن اکثر موجودات ساخته می‌شود اما در بعضی از گیاهان و مهره داران ذخیره می‌گردد. از جمله گیاهان ذخیره کننده بتایین، گیاه چغندرقند است (۱۰). بتایین در اندام‌های مختلف چغندرقند وجود دارد مقدار بتایین در برگ بیشتر از دمبرگ و در دمبرگ بیشتر از ریشه چغندرقند است (۴) اما توزیع آن در قسمت‌های مختلف ریشه یکسان است (۲۰). بتائین حدود پنج درصد ماده خشک موجود در ملاس را تشکیل می‌دهد (۶). در چغندر وحشی نیز مقدار گلایسین بتایین بیشتر از چغندرقند و چغندر علوفه‌ای است (۲۲). در گیاهان، تنش‌های خشکی، شوری و گرما سنتز بتایین را در میتوکندری تحریک کرده که منجر به تجمع این ماده در سلول‌ها می‌شود. افزایش مقدار گلایسین بتایین تحت تاثیر شوری در گیاه املج (*Phyllantus embelica*) (۱۵) سالی کورنیا و سودا (۲۱)، برنج (۹)، چغندروحشی و علوفه‌ای (۲۲) اسفناج (۱۰) و در تنش خشکی در چغندرقند (۴ و ۲۴) گزارش شده است. بتایین بیشتر از ۵۰ سال است که به عنوان ماده کمکی به غذای حیوانات اضافه می‌شود. بتایین به غذای ماهی پرورشی به عنوان اسمولیت اضافه می‌شود تا از ماهی در مقابل تنش عبور از شوری کم به زیاد محافظت کند (۱۰). افزودن بتایین در جیره‌غذایی‌جوجه‌گوشتی باعث افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی گردید و وزن سینه جوجه گوشتی بیشتر و چربی محوطه بطنی‌کمتر شد (۳). بتانین عصاره چغندر نقش مهمی درسم‌زدایی‌سلول‌های سرطانی دارد (۱۶). مصرف توام عصاره ریشه‌چغندرلبویی‌با داروی ضدسرطان دوگزوروبیسین می‌تواند باعث کاهش دوز داروی مصرفی‌گردد. به طوری که بیشترین اثر در نسبت ۱ به ۵ عصاره ریشه به دوگزوروبیسین و با دوزهای IC50، IC75 وIC90 برای از بین بردن سلول‌های سرطانی پانکراس و دوز IC90 برای سلول‌های سرطانی سینه به دست آمد (۱۷). به طور کلی بتایین در کاهش التهاب و بتانین به عنوان ماده آنتی اکسیدان، کاهش التهاب، القا فاز دو آنزیم‌ها، ضدجهش‌زایی وموثردرفعالیت‌های‌بازدارنده شیمیایی در بدن انسان مطرح می‌شود (۱۹). جداسازی بتائین از ملاس چغندرقند در صنعت قند با کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی‌غربال‌ملکولی امکان پذیر است. برای این منظور از رزین تعویض کاتیونی اسید قوی و آمونیاک به عنوان فاز متحرک (۷) و یا از آب به عنوان فاز متحرک (۱۴) استفاده می‌کردند. در این روش، راندمان بتائین استحصالی ۹۹/۸ درصد به دست آمدکه جهت مصارف دارویی مطلوب بود. بسترتبادل‌کاتیونی(رزین)ضعیف از نوع هیدروژنی بستر مناسبی تشخیص داده شد. این نوع رزین جداسازی کروماتوگرافی را در PH اسیدی مهیا می‌کند. بر خلاف روش‌های دیگر که عملیات بازیابی به چندین مرحله کروماتوگرافی نیازمند است (۱۸)، در این روش بازیابی‌گلایسین بتایین از ملاس فقط در یک‌مرحله‌کروماتوگرافی به دست می‌آید (۲۳). حداکثر حجم خروجی‌گلایسین بتایین در رزین فرم سدیمی از ۵۲ درصد از حجم بستر بدست می‌آید در حالی که در رزین فرم هیدروژنی از ۱۲۸ درصد حجم بستر بدست می‌آید (۲۳). ملاس دارای مقادیر مختلفی از مواد است. بازیابی قند از ملاس از ملاس چغندر، فرآیندی است که با استفاده از کرماتوگرافی batch و هم SMB (simulated moving bed) به عنوان روشی برای بازیافت‌ساکارز که به علت دخالت موادغیرقندی (نمک، رافینوز، آمینواسیدها) از ملاس‌کریستاله نمی‌شود، به صورت تجاری‌درآمده است(۸).براساس آمار تولید چغندرقند طی سال‌های‌گذشته‌درایران،حدودپنج‌درصد مقدار ریشه چغندرقند واردشده به‌کارخانه به صورت ملاس از آن خارج می‌شود (۲).

بنابراین به طور مثال در یک کارخانه با ظرفیت مصرف ۲۰۰ هزار تن ریشه در سال و تولید ۱۰ هزار تن ملاس) می‌توان نسبت به استخراج حداقل ۴۰۰ تن بتایین اقدام نمود. هزینه هر کیلو بتائین درکشور حدود ۳۰۰۰۰۰-۲۰۰۰۰۰ ریال گزارش شده است. لذا حداقل درآمد ناخالص کارخانه مذکور از فروش بتایین حدود ۴۰ میلیارد ریال برآورد می‌شود این سود بر فعالیت‌های اقتصادی و سود حاصله از تولید شکر، ملاس و تفاله و الکل‌گیری افزوده می‌گردد. لذا صرفه اقتصادی بالایی برای صاحبان صنایع قند به همراه خواهد داشت. از طرفی بر اساس آمار انجمن‌صنفی‌کارخانجات قند کشور در سال ۱۳۹۹، حدود ۲۲۸ هزار تن‌ملاس درکل کشور تولید شد از این مقدار ملاس ۱۳۶۸۰ تن بتایین قابل استحصال است (۲). لازم به ذکر است که بر اساس آمار سایت گمرک کشور (۱۳۹۷) میزان واردات‌کوکو آمید و بتایین از کشورهای مختلف اروپایی و ترکیه‌درسال۱۳۹۷به‌مقدار ۵۳۲۰۰کیلوگرم‌به‌ارزش ۳۱۸۸۹۲۵۱۲۰ ریال‌ومعادل۷۵۹۳۵ دلار(به نرخ دولتی) بوده است (۱). بنابراین با توجه به واردات کوکوآمید و بتایین درکشور که در حال حاضربرابر۵۳تن‌است، درصورت بکارگیری روش‌های مناسب استخراج‌بتایین ضمن قطع واردات می‌توان نسبت به خودکفایی و حتی صادرات سالانه ۱۳۶۲۷ تن بتایین اقدام نمودکه واجد ارزآوری برای کشور خواهد بود. با توجه به این که سطح زیر کشت‌چغندرقنددرایران حدود ۱۰۰ هزار هکتار است استخراج این مواد موثره علاوه بر قند می‌تواند در تولید داروهای موثر برای انسان و طیور مورد توجه قرار گیرد. در حال حاضر بتایین به صورت تجاری در جیره طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد که‌عمدتا این‌محصول به کشور وارد می‌گردد. استخراج بتایین از ملاس چغندرقند می‌تواندکشور را از واردات این مواد به خصوص مواد مکمل غذایی برای طیور و آبزیان بی‌نیاز نماید. لذا این‌پروژه به‌منظورمشخص‌کردن بهترین روش وبهینه‌سازی استخراج بتایین از ملاس‌چغندرقند در کشور انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-طراحی ستون

به‌منظورجداسازی بتائین از ملاس روش‌کروماتوگرافی ستونی که امکان تعمیم‌آن به روش (SMB)[1] وجود دارد انتخاب شد. بر این اساس سه ستون شیشه‌ای به عنوان بستر رزین به منظور استفاده‌روش‌کرماتوگرافی‌تعویض‌یونی‌ستونی[2]درموسسه تحقیقات اصلاح‌وتهیه‌بذر چغندرقندکرج در سال ۱۳۹۷، ساخته، نصب، و فعال گردید(شکل۱). مراحل مختلف اسیدشویی با اسید کلریدریک۰/۲مولار، آب‌شویی ونمک‌شویی‌کلریدسدیم ۰/۴ مولار روی ستون‌ها انجام و رزین‌ها تعیین ظرفیت شدند. ستون‌های‌کروماتوگرافی بستر اصلی مطالعات تبادل‌کاتیونی هستند. این ستون‌ها با رزین پرشده و در واقع بستر رزین[3] را تشکیل می‌دهند. ستون رزین، یک فیلتر مولکولی کاملا ریز را تشکیل‌می‌دهد.موادمختلف‌ملاس‌اندازه‌هاوخصوصیات متفاوت داشته و سرعت حرکت آن‌ها در ستون‌ها (بستر رزین) متفاوت است(۲۶). در تهیه بعضی از رزین‌ها و ملاس چغندرقند با دو کارخانه در سطح کشور همکاری شد.

۲-۲-بهینه‌سازی‌شرایط‌جداسازی‌در ستون‌کروماتوگرافی

سپس به‌منظوربهینه‌سازی‌جداسازی بتایین، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه سطح و با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول سه ماده تزریقی به ستون شامل نمک کلرید پتاسیم، ساکارز خالص و بتایین خالص؛ فاکتور دوم شامل سه درجه حرارت مختلف ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درجه سانتی‌گرادوفاکتورسوم‌سه نوع رزین شامل رزین آزمایشگاهی (سایز بسیار ریز)، و رزین تجاری ۱ (سایز متوسط)و رزین تجاری ۲ (رزین پتاسیمی با سایز درشت) بود. با توجه به تعیین ظرفیت رزین‌ها و محدودبودن ظرفیت رزین، همه مواد با

1- Simulated Moving Bed
2- Column ion Exchange resin
3 -Resin Bed

سطح رقت ده درصد به ستون‌ها تزریق شدند. از طرفی به علت این‌که زمان خروج مواد مختلف ملاس از رزین متفاوت است، لذا نوع ماده شامل ساکارز، بتایین و نمک کلرید پتاسیم به عنوان سه ماده اصلی تشکیل دهنده ملاس بر حجم خروجی از ستون تاثیرگذار خواهد بود(۱۱). لذا بررسی خصوصیات جداسازی ستون برای هرماده به صورت مجزا ضروری می‌باشد (۸). برای انجام آزمایش هر ماده در درجه حرارت‌های مورد نظر در سه و بعضی‌مواقع چهار تکرار از ستون‌های رزینی کروماتوگرافی عبور داده شد. برای اعمال درجه حرارت از دستگاه حمام آبی ۱۰ لیتری مجهز به ترموستات کنترل دما مدلWISD (شرکت Witeg آلمان)استفاده شد.

شکل۱- ستون‌های رزینی‌جهت جداسازی بتایین از ملاس با دستگاه حمام آبی با قابلیت کنترل درجه حرارت درسطح آزمایشگاهی

خروجی‌های هر ستون از حجم ۲۵ میلی‌لیتر تا ۸۰۰ میلی‌لیتر با فواصل۲۵میلی‌لیتر (۲۵، ۵۰، ۷۵، و....) به ترتیب توسط شکست سنج[1]، هدایت‌سنج[2] وPH متر از نظر موادجامد محلول، هدایت الکتریکی‌و اسیدیته اندازه‌گیری شده و تا شستشوی‌کامل ستون و صفر شدن کامل خروجی‌ها این کار ادامه یافت. از منحنی‌ها برای متوسط زمان نگهداری مواد در ستون استفاده شد (۸).

۲-۳ - تجزیه و تحلیل‌آماری

آنالیزآماری‌توسط‌نرم‌افزارMSTATCانجام و مقایسه میانگین‌ها در سطح پنج درصد توسط آزمون چند دامنه دانکن انجام شد. به منظور رسم گراف‌ها و تعیین سرعت خروج مواد از ستون از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۲-٤- استخراج بتایین از ملاس

برای استخراج بتایین از ملاس ابتدا ملاس‌سختی‌گیری شد. برای این منظور ابتدا مقدار خاکستر ملاس حدود ۰/۹ درصد تعیین شد. سپس بریکس ملاس چغندرقند به ۶۰ درصد تغییر، اسیدیته به ۹ رسانده شد. کربنات پتاسیم جهت سختی‌گیری اضافه و سانتریفیوژ شد . سپس اسیدیته محلول ملاس به هفت رسانده شده در حجم مورد نظر میزان بتایین جداسازی شده و برای خالص‌سازی مجددا از ستون رد شد. بتایین خارج شده رنگ‌بری شده و درآون خلا در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردید(۱۱). اندازه‌گیری بتایین به روش اسپکتروفتومتری به روش حلال اسیدسولفوریک و معرف یدید پتاسیم انجام شد (۱۳و۲۴). پس از تهیه محلول‌های استاندارد با غلظت‌های صفر تا ۳۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر از محلول‌پایه۱۰۰۰میکروگرم‌برمیلی‌لیتربتایین‌خالص آزمایشگاهی با خلوص۱۰۰ درصد مقدار جذب‌گلایسین بتایین توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۶۵ نانومتر قرائت و مقدار بتایین بر اساس حاصل ضرب عدد منحنی در درجه رقت و بر اساس وزن نمونه محاسبه گردید.

1- Refractometer
2- Electrical Conduct Meter

۳- نتایج و بحث

۳-۱-بهینه‌سازی‌شرایط‌جداسازی‌درستون کروماتوگرافی

اثر مواد تزریقی به ستون، نوع رزین، اثر متقابل مواد و درجه حرارت، اثر متقابل مواد و رزین در سطح یک درصد و اثر درجه حرارت در سطح پنج درصد بر میزان حجم خروجی ستون‌ها اثر معنی‌دار داشت. هم‌چنین اثر مواد تزریقی و درجه حرارت و اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد و اثر متقابل رزین در درجه حرارت و رزین در مواد تزریقی بر درصد مواد جامدمحلول(بریکس) درسطح‌پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول۱- میانگین مربعات مواد تزریقی به ستون کروماتوگرافی، درجه حرارت و نوع رزین برحجم خروجی مواد ودرصد ماده جامد محلول

منابع تغییر	درجه آزادی	حجم خروجی	ماده جامد محلول
ماده تزریقی به ستون	۲	۲٤۱۳۹٥/٥۳**	۲/۱۱**
درجه حرارت	۲	۱۷۱۸۹/٥۱*	۱/۰۹**
ماده ×درجه حرارت	٤	۱۷۲۲۹/۰۹**	۰/۹۱**
نوع رزین	۲	۲۸۰۲۷/۷۰**	۰/۱٦ns
ماده*رزین	٤	٥۹۱۸٥/٦۹**	۰/۱۷*
درجه حرارت*رزین	٤	۳۱۰۱/٥٥ ns	۰/۱۸*
ماده* درجه حرارت*رزین	۸	٤٦٤۲/۳٥ ns	۰/۰۷ ns
خطا	٥٤	۳٥۱٤/٦٦	۰/۰٦
ضریب تغییرات		۳۳/٤۱	۳۹/۰۱

ns، * و ** به ترتیب نشانگر عدم معنی داری و معنی‌داری در سطوح احتمال پنج و یک درصد می باشند.

درکروماتوگرافی‌تعویض یونی، همزمان مولکول‌های کوچک اجزای‌غیریونی‌به‌داخل‌منافذ رزین نفوذ کرده (جذب می‌شوند) و مولکول‌های بزرگتر به سطح رزین می‌چسبند. نمک‌های حاوی‌سدیم‌وپتاسیم‌بخش قابل‌توجه‌ملاس چغندرقند را تشکیل می‌دهند که با توجه به شعاع اتمی کوچک و بار یونی منفرد به راحتی به منافذ رزین نفوذ و عبور کنند. ساکارز با فرمول C12H22O11 به دلیل تشکیل پیوند هیدروژنی با ملکول‌های آب (فاز متحرک) از حلالیت بالا (۲۰۰ گرم در ۱۰۰ سانتیمتر مکعب در۲۵ درجه سانتیگراد) برخوردار است. بتائین با فرمول C5H11NO2 شامل دو گروه عاملی‌ست یک گروه عاملی کاتیونی با بار مثبت که هیچ اتم هیدروژنی ندارد و یک گروه عاملی با بار منفی است که به دلیل دارا بودن هم زمان بار مثبت و منفی می‌تواند اثر جاذبه روی رزین‌های تبادل کاتیونی داشته باشد و موجب شود تا حرکت این ترکیب را در منافذ رزین نسبت به سایر ترکیبات موجود کندتر شود. بر همین اساس قبل از تزریق ملاس، نمک خالص کلرید پتاسیم، ساکارز و بتایین خالص به ستون تزریق شدند تا در دما و سرعت ثابت زمان خروج مشخص شود. حجم خروجی ترکیبات فوق الذکر با غلظت۱۰ درصد درسرعت و دمای ثابت سه ماده نشان می‌دهد ابتدا نمک کلرید پتاسیم از ستون‌ها خارج شده (۱۰۳ میلی‌لیتر) و سپس ساکارز و بتایین به ترتیب با حجم‌های خروجی حدود ۱۴۶ و ۲۸۴ میلی‌لیتر از ستون‌ها خارج می‌شوند (جدول ۲). این نتیجه با روند جداسازی در مطالعات قبلی مطابقت دارد (۱۱). این روش به طور شفاف نتایج جداسازی مواد را نشان می دهد و می‌توان با آن دوره زمانی تغییر خروج مواد را تشخیص داد به طوری که در تزریق ساکارز و کلرید پتاسیم به ستون ابتدا نمک و سپس ساکارز خارج شد ساکارز از دقیقه ۲۰ شروع به خارج‌شدن کرده و در دقیقه ۹۰ به سطح ثابتی رسید (۸). بتائین

آرامتر از ساکارز حرکت می‌کند، لذا مقداری از بتائین در محصول ملاس قندزدایی شده در کارخانجات وجود دارد. اگرچه با دستکاری مناسب میزان جریان بازیافت، ۷۰٪-۶۵ از بتائین می‌تواند در جریان محصولات جانبی با نمک‌ها حذف شود. جداسازی نمک‌ها در ۹۹-۹۷ ٪موارد خیلی خوب است. محصول نهایی قندزدایی می‌تواند رنگی در سطح بالا داشته باشد.درقندزدایی‌ملاس‌درکارخانجات،رنگزدایی‌وغیرمعدنی‌سازی[1] محصول با تبادل یون به منظور کاهش رنگ تا۸۰٪ و افزایش خلوص‌ساکارز تا ۹۵٪ قابل انجام است. درجه حرارت جریان قندزدایی‌محصول‌درزمانی‌که‌از ستون رزین کاتیونی هیدروژنی عبورمی‌کندبایدتاکمتراز۱۵ درجه سانتیگراد نگه‌داشته شود تا از وقوع از بین رفتن ساکارز طی‌معکوس‌سازی(شکسته‌شدن) جلوگیری شود(۱۱). برای استخراج بهینه بتایین وجداسازی مطلوب بتا یین از بخش‌های‌ملاس روش‌های دیگری شامل فاز تغییرو فازجداسازی استفاده‌شده است‌که در فاز تغییر ملاس در معرض‌آنزیم‌های‌ایندولینازیافروکتوسیل ترانسفراز قرارگرفته و ملاسی با فرم فروکتان ایجاد می‌شود و سپس این ملاس در فاز جداسازی قرار می‌گیرد. در این روش نیز برای جداسازی از ستون‌کروماتوگرافی با سیستم تبادل کاتیونی به فرم سدیمی استفاده‌می‌شود.فرم‌سدیمی‌بایون‌های‌دیگرجایگزین نشده و این مساله جداسازی‌گلایسین بتایین را بهترمی‌نماید (۲۵).

1- Demineralized

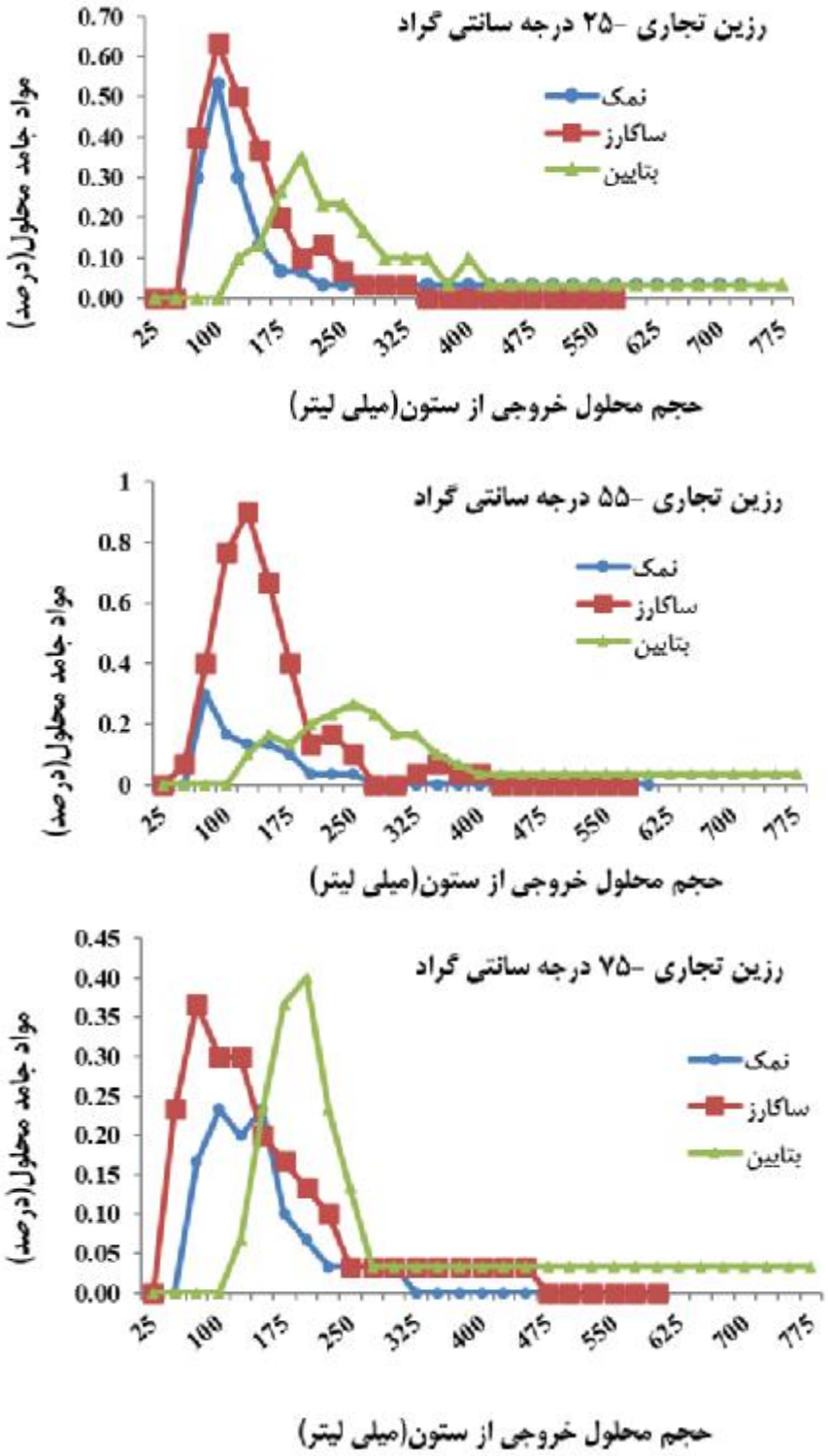
جدول۲- مقایسه میانگین‌حجم محلول خروجی و درصد مواد جامد محلول در ستون‌های‌کروماتوگرافی با تزریق سه نوع ماده در درجه حرارت‌های مختلف و سه نوع رزین

ماده تزریقی	درجه حرارت	رزین	حجم خروجی (میلی لیتر در دقیقه)
کلرید پتاسیم			۱۰۲/۷۸ c
ساکارز			۱٤٥/۸۳ b
بتایین			۲۸۳/۷۸ a
	۲٥		۱۷۷/۲۳ ab
	٥٥		۲۰۲/۷۹ a
	۷٥		**۱٥۲/۳۲** b
کلرید پتاسیم	۲٥		۱۰٥/٥٦ d
کلرید پتاسیم	٥٥		۹۱/٦۷ d
کلرید پتاسیم	۷٥		۱۱۱/۱۱ cd
ساکارز	۲٥		۱۲۷/۷۹ cd
ساکارز	٥٥		۱٦۹/٤٤ bc
ساکارز	۷٥		۱٤۰/۲۹ cd
بتایین	۲٥		۲۹۸/٥٦ a
بتایین	٥٥		۳٤۷/۲۲ a
بتایین	۷٥		**۲۰٥/٥٦** b
		آزمایشگاهی	۲۰۸/۸۰ a
		تجاری۱	۱٤٤/٤۳ b
		تجاری ۲	۱۷۹/۱۷ a
کلرید پتاسیم	*	آزمایشگاهی	۸۱/۹٤ c
کلرید پتاسیم	*	تجاری ۱	۱۰۰ c
کلرید پتاسیم	*	تجاری ۲	۱۲٦/۳۹ c
ساکارز	*	آزمایشگاهی	۱۲۲/۲۲ c
ساکارز	*	تجاری	۱۲۷/۷۸ c
ساکارز	*	تجاری ۲	۱۸۷/٥ b
بتایین	*	آزمایشگاهی	٤۲۲/۲۲ a
بتایین	*	تجاری	۲۰٥/٥ b
بتایین	*	تجاری ۲	۲۲۳/٦۱ b
*	۲٥	آزمایشگاهی	۲۱۲/٥ a
*	۲٥	تجاری	۱٤۱/٦۱ a
*	۲٥	تجاری ۲	۱۷۷/۷۸ a
*	٥٥	آزمایشگاهی	۲٤٤/٤٤ a
*	٥٥	تجاری	۱٥۰ a
*	٥٥	تجاری ۲	۲۱۳/۸۹ a
*	۷٥	آزمایشگاهی	۱٦۹/٤٤ a
*	۷٥	تجاری	۱٤۱/٦۷ a
*	۷٥	تجاری ۲	۱٤٥/۸۳ a

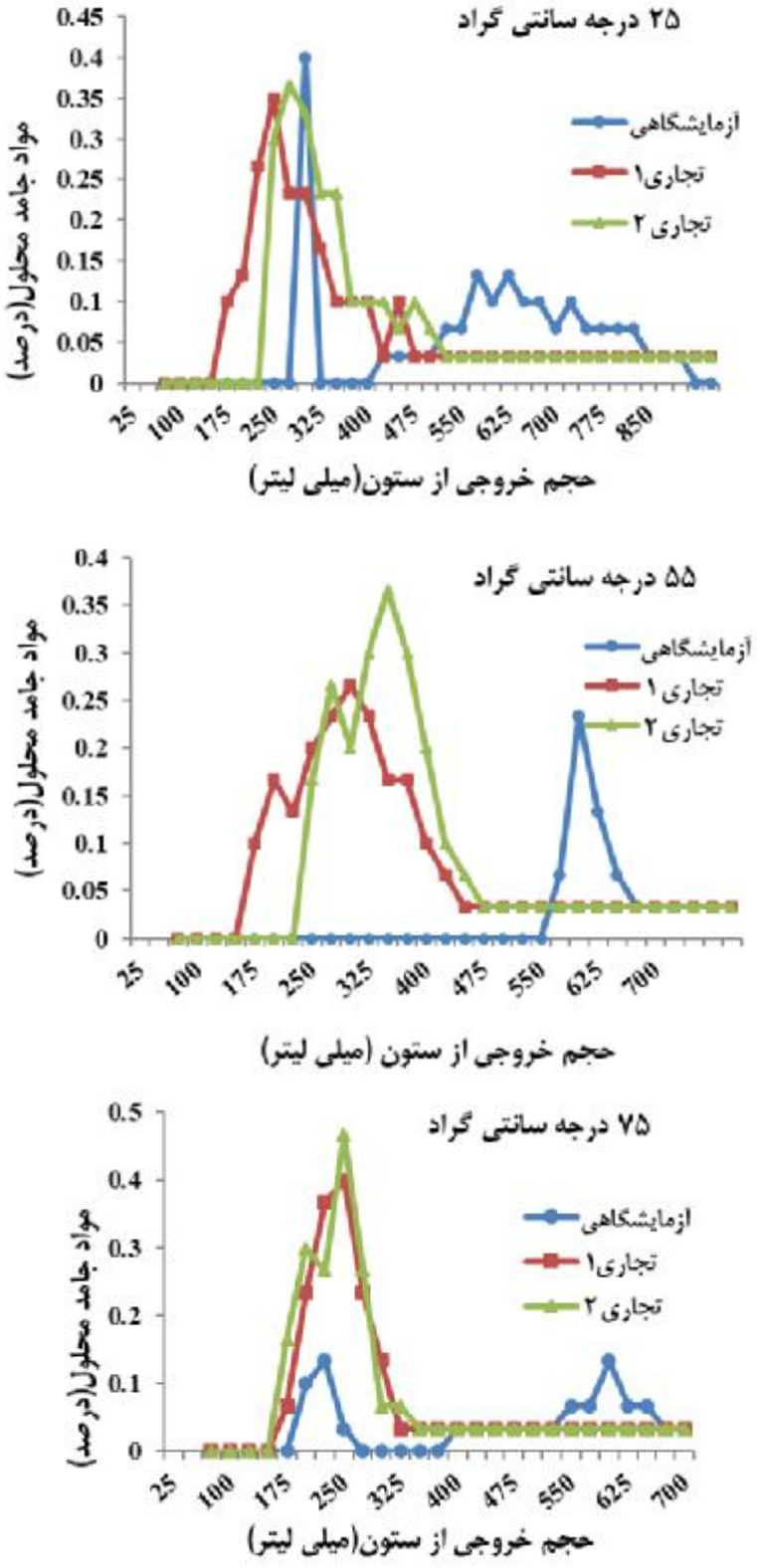
اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند

جداسازی‌بتائین‌ازملاس‌باتوجه به غلظت ساکارز ۵۰٪، خاکستر ۱۰٪ و بتائین۶٪ درملاس، موجب همپوشانی خروج دو ترکیب ساکارز و بتائین از ستون کروماتوگرافی است. افزایش دمای فازمتحرک‌برای‌ترکیبات خالص مورد بررسی، موجب افزایش سرعت‌خروج‌ساکارزوکاهش‌همپوشانی‌خروج همزمان ساکارز و بتائین موجود در ملاس از ستون رزین گردید (شکل ۱). لذا مشاهده شد که در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی‌گراد مواد تزریقی به ستون‌کروماتوگرافی سریعتر و به طور متوسط در حجم ۱۵۲ میلی‌لیتر از ستون‌ها خارج می‌شوند. با کاهش درجه حرارت خروج مواد از ستون‌ها دیرتر و در حجم بیشتری از محلول عبور کرده از ستون، اتفاق می‌افتد (جدول ۲). همچنین بهترین‌درجه‌حرارت‌برای‌خروج‌بتایین از ستون‌ها درجه حرارت ۷۵درجه‌سانتی‌گراد است‌که به طور معنی‌دار نسبت به دو درجه حرارت دیگر (۵۵ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) بتایین سریعتر و با حجم کمتر محلول (۲۰۶ میلی‌لیتر) از ستون‌ها خارج می‌شود (جدول ۲). کنترل خروج ساکارز و بتائین در دو رزین تجاری ۱ و تجاری۲ با تعیین ساکارز به روش پلاریمتری و درصد مواد جامد محلول(بریکس) به روش رفرکتومتری نشان داد که‌کمترین‌همپوشانی خروج ساکارز و بتائین در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (شکل ۲). با محاسبه سطح زیرمنحنی و راندمان استحصال مشخص‌گردید که در رزین تجاری۱ودرجه‌حرارت۷۵درجه سانتی گراد راندمان استحصال ۴۶/۳۲ درصد بود در حالی که در این رزین و در درجه حرات ۵۵ و۲۵ درجه سانتی‌گراد راندمان استحصال ۱۳/۹۱ و ۹/۰۹ درصدبود (داده ها نشان داده نشده است). در آزمایش دیگری نیز تفکیک مواد در ستون‌کروماتوگرافی در دمای۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد و درجه حرارت بیشتر از ۶۰ درجه برای استحصال‌مناسب‌شناخته‌شد(۸).در مقایسه سه رزین نیز مشخص شدکه رزین‌تجاری ۱ به طور معنی‌دار نسبت به دو رزین دیگر قادر به تفکیک مواد با سرعت بیشتر و حجم مواد کمتر است (جدول۲). در بین این رزین‌ها ستون حاوی رزین آزمایشگاهی بسیار دیرتر از دو ستون دیگر (۴۲۲ میلی‌لیتر در مقابل ۲۰۰ میلی‌لیتر) بتایین‌راتفکیک نمود (جدول۲). ذرات ریز این رزین باعث کندی حرکت بتایین در داخل آن شده و کندی روند تفکیک بود. در این رزین با وجودی‌که بتایین آخرین مرحله از رزین(شکل ۲ ب و ج) با راندمان ۶۵ تا ۱۰۰ درصد طی دماهای‌مختلف (داده‌ها بر اساس محاسبه سطح زیر منحنی بوده که ارائه نشده است)خارج شد، اما رزین آزمایشگاهی از نظر قیمت برای‌کارخانه به صرفه نیست از طرفی درکارخانه با سرعت‌بالای‌کارروندکنداستخراج بتایین از این رزین نمی‌تواند اقتصادی باشد.در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد سرعت تفکیک بتایین در هر سه رزین مشابه بود این در حالی است که با افزایش دما سرعت تفکیک بتایین در رزین‌های تجاری۱ و تجاری۲ افزایش یافته در حالی که در رزین آزمایشگاهی در درجه‌حرارت‌های‌بالا نیز سرعت تفکیک بسیار کند بود (شکل ۲ و جدول۲) . راندمان استحصال بتایین در رزین آزمایشگاهی طی درجه حرارتهای مختلف بین ۱۰۰-۶۵ درصد اما به مقدار کم و بسیار کند بود. این راندمان در رزین تجاری۱ بین ۴۶-۹ درصد متغیر اما با مقدار زیاد و روند سریع و در رزین تجاری ۲ این راندمان حتی منفی بوده و با خروج ساکارز همزمان بود (داده ها ارائه نشدهاست). استخراج بتایین در رزین کاتیونی قوی[1] از خلوص۵ تا حداکثر۶۰ درصد متفاوت است. در رزین کاتیونی ضعیف به فرم هیدروژن[2] ایجاد باند هیدروژنی از دلایل‌نگهداری بتایین روی رزین است در این رزین در شرایط اسیدی خلوص‌بتایین از ۱۹ به ۸۹ درصد رسیدکه در این رزین می‌توان با یک بار جریان به جای چند بار جریان به خلوص رسید (۲۳).

1- Strong Acid Cation Exchange Resin, Na +/ K + SAC
2- Weak Acid Cation Exchange Resin, H + WAC



شکل۲- خروج نمک (کلرید پتاسیم)، ساکارز، و بتایین برحسب درصد مواد جامد محلول (بریکس) از ستون با رزین تجاری ۱ در درجه‌حرارت‌های ۲۵، ۵۵ و۷۵ درجه سانتی‌گراد



شکل۳- مقایسه سه رزین از نظر میزان خروج بتایین برحسب درصد مواد جامد محلول (بریکس) در درجه حرارت‌های مختلف۲۵، ۵۵ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد

۳-۲- اندازه‌گیری خلوص بتایین استخراج شده

میزان غلظت بتایین استخراج‌شده و درصد خلوص آن برای سه تکرارآزمایش به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۶۵ نانومترمطابق‌جدول۳ بود. با توجه به این که محلول اصلی مورد آزمایش با غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه شده بود لذا خلوص بتایین با تقسیم مقدار غلظت بر اساس رقت بر مقدار غلظت اولیه بدست آمد.

جدول۳- غلظت بتایین استخراج شده از ملاس (میکروگرم در میلی لیتر) و درصد خلوص در سه بار تکرار آزمایش

تکرار	غلظت بر اساس رقت (میکرو گرم در میلی‌لیتر)	درصد خلوص
۱	٥٤١	٥٤
۲	٦٣٩	٦٤
۳	٧٨٥	٧٩

بر اساس این‌جدول‌میانگین خلوص بتایین معادل ۶۵/۶۶ درصد به دست آمد. لازم به ذکر است که اعداد به دست‌آمده بر اساس منحنی استاندارد حاصل از بتایین آزمایشگاهی بدست آمده است. بتایین ۵/۵-۴/۵ درصد ملاس را تشکیل می‌دهد اما درقسمت‌جداسازی‌می‌توان‌به‌خلوص ۸۰-۲۵ درصد رسید.عبور بیشتر مواد از ستون می‌تواند به خلوص بیشتر کمک کند. که البته این شیوه نظر به ضرورت بدست آوردن حالت ثابت بسیار زمان بر بوده و نیاز به آنالیز مقدار زیادی نمونه دارد (۸).

٤-نتیجه‌گیری

چغندرقندگیاهی چند منظوره بوده و علاوه بر تاثیر به سزایی که در تولید قند کشور و خودکفایی در این محصول دارد، ملاس‌آن در صنایع الکل‌سازی مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه به علت داشتن بتایین از نظر مصارف دارویی ازجمله داروهای ضدسرطان نیز مورد توجه است. بتایین موجود در برگ و ریشه چغندر از سایر گیاهان زراعی بیشتربوده و در شرایط تنش‌های محیطی‌افزایش‌می‌یابد. از طرفی بتایین موجود در ملاس چغندرقند به علت داشتن خواص بسیار زیاد به عنوان ماده کمکی به غذای طیور و ماهی پرورشی اضافه می‌شود و سالانه‌حدود ۳۰۰-۵۰ تن از این ماده واردکشور می‌شود. بتایین به علت این‌که یک ماده صد در صد طبیعی است و استخراج آن به مواد شیمیایی زیادی نیاز ندارد بسیار در سلامت انسان موثر می‌باشد. از طرفی با توجه به این‌که سطح زیر کشت چغندرقند درکشور حدود ۱۰۰ هزار، با صنعتی شدن این پروژه بیش از ۱۳۰۰۰ تن بتایین تولید خواهد شد که در ارزآوری برای کشور بسیار موثر خواهد بود. بتایین موجود در ملاس ریشه چغندرقند قبل یا بعد از این که ملاس وارد کارخانه الکل‌گیری شود قابل استحصال بوده و لذا استخراج بتایین از ملاس می‌تواند به عنوان یک فرآیند جانبی در کارخانه‌های قند و الکل‌گیری مورد توجه قرار گیرد و در افزایش اشتغال موثرباشد. برای این منظور روش استخراج کروماتوگرافی تعویض یونی ستونی جهت جداسازی بتایین از ملاس انتخاب شد. ستون‌های مورد نیاز طراحی و ساخته شد. این روش قابل تعمیم به Simulated moving bed بوده که به راحتی در کارخانجات قند قابل صنعتی‌شدن و استفاده است. در این راستا بهترین شرایط برای جداسازی بتایین از ملاس شامل نوع رزین و درجه حرارت مناسب تعیین گردید به طوری که رزین تجاری یک بهتر از رزین آزمایشگاهی در تفکیک بتایین از ستون‌کروماتوگرافی‌موثر بود و همچنین بهترین دما برای تفکیک درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی‌گراد بود. در رزین

تجاری۱ودرجه‌حرارت۷۵درجه سانتی‌گراد راندمان استحصال حدود۵۰ درصد بود که بسیار بهتر از رزین تجاری ۲ و دماهای دیگر بود. با وجودی که راندمان استحصال بتایین در رزین آزمایشگاهی بهتر از رزین تجاری ۱ بود اما مقدار کم بتایین استحصال شده، و روند کند خروج بتاین از آن و نیز قیمت گزاف‌این‌رزین‌در بازار، نشان می دهد که این رزین نمی‌تواند راهکار مناسبی برای استفاده اقتصادی در کارخانجات باشد. از طرفی با خروج نمک‌های مخلف از ستون مشخص گردید که ابتدا ناخالصی‌ها و نمک‌های ملاس سپس ساکارز و درنهایت بتایین از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شود. این امر نشان می‌دهدساکارزخارج‌شده قبل از بتایین می‌تواند درکارخانجات تولید اسید سیتریک که در داخل کشور وجود دارند مورد استفاده قرارگیرد لذا استخراج بتایین از ملاس تاثیر سوئی بر استخراج این ماده نخواهد داشت. میانگین درصد خلوص بتایین به دست آمده ۶۵/۶۶ درصد بود. این درصد خلوص برای مصارف طیور و آبزیان مناسب بوده و برای خلوص بیشتر می‌توان تعداد دفعات عبور ملاس از ستون را افزایش داد. نظر به اجرای این‌پروژه در فاز آزمایشگاهی و پایلوت نیمه صنعتی، پایلوت صنعتی آن در کارخانه‌ای در شمال غرب کشور آغاز شده است.

۵- سپاسگزاری

فازآزمایشگاهی ونیمه‌صنعتی این پروژه با حمایت ستاد گیاهان دارویی و طب سنتی معاوت علمی و فناوری ریاست جمهوری و در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند طراحی و اجراگردید که به این ترتیب از همکاران محترم مراکز فوق الذکر تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

۱. آمار گمرک جمهوری اسلامی ایران،۱۳۹۷. آمار واردات‌به تفکیک ماه، کشور طرف معامله، گمرک وکدتعرفه،طی‌سال۱۳۹۷ https://www.irica.ir/file_manager/1396015/1396015.htm

۲. انجمن‌صنفی‌کارخانجات قند و شکر ایران، ۱۳۹۹. صورت عملکرد بهره برداری کارخانه های قند چغندری‌ونیشکری‌کشوردرسال۱۳۹۹. http://www.isfs.ir/amalkard/HTML/1399.pdf

۳. نعمتی، الف،۱۳۸۰. اثرات جایگزینی کولین بوسیله بتایین‌برروی‌عملکرد و کیفیت لاشه در جوجه‌های گوشتی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ایلام. ایران.

4. Abdollahian Noghabi, M., 1999. Ecophysiology of sugar beet cultivars and weed species subjected to water deficiency stress. PhD Thesis. The University of Reading. England.
5. Abdollahian Noghabi, M. and Sadeghian Motahar, S. Y., 2002. Changes in the concentration of glycinbetainee, glutamin and sugars in sugar beet subjected to soil moisture deficit. *Proceeding of the 65th IIRB congress.Belgium*.
6. Asadi, M., 2007. *Beet sugar hand book*. Wiley and son Inc. 884 pages.
7. Brown, R. J., Nees, R. A. and Arthur, N., 1952. Recovery of nitrogenous and other compounds. U.S. Patent No. 2586295.
8. Bubinik, Z., Pour, V., Gruberova, A., Starhova, H., Hinkova, A. and Kadlec, P., 2004. Application of continuous chromatographic separation in sugar processing. *Journal of Food Engineering*, 61, pp.509-513.
9. Cha-um, S., Kirdmanee, Ch. and Supaibulwatana, K., 2004. Biochemical and physiological responses of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa* L. ssp indica cv. KDML105) to salt stress. *Science Asia*, 30, pp. 247-253.
10. Craig, S. A. S., 2014. Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, pp. 539-549.
11. Clarke, S. J. and Rouge, B., 1995. Softening and purification of molasses

or syrup. United States Patent No.5,454,875

12. Gorham, J., 1995. Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism. In: (ed. Walsgrove, R. M.) *Amino acids and their derivatives in higher plants*. P:.173-203. Cambridge University Press, Cambridge.
13. Grieve, C. M. and Grattan, S. R., 1983. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 70, pp.303-307.
14. Heikkila, O. H., Jaakko, A. M. and DED. Millner, JJ. Virtanen., 1981. Betaine recovery process. Us patent 4359430 A.
15. Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2007. NaCL as a physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. *Comptes Rendus Biologies*, 330, pp.806-813.
16. Kapadia, G. J., Azuine, M.A., Rao, G.S., Aria, T., Lida, A. and Tokuda, H., 2011. Cytotoxic effect of the red beet root (*Beta vulgaris* L.) extract compared to doxorubicin (Adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry,* 11(3), pp.280-284.
17. Kapadia, G.J., Rao, G.S., Ramachandran, C., Iida, A., Suzuki, N. and Tokuda, H., 2013. Synergistic cytotoxicity of red beet root (*Beta vulgaris* L.) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines. *Journal of complementary and Integrative Medicine*, 10(1), pp. 113-122.
18. Karki, A., Heikkilä, H., Jumppanen, J., Tiihonen, J., Tervala, T., Mäyrä, N., Ravanko, V., Paananen, H. and Paatero, E., 2002. Use of a weakly acid cation exchange resin for chromatographic separation of carbohydrates. WO/2002/027038.
19. Lechner, J. F. and Stoner, G. D., 2019. Red beetroots and betalines as cancer chemoprotective agents. *Molecules*, 24, pp.1-12,1602 doi:10.3390/molecules24081602.
20. Mahn, K., Hoffmann, C. and Marlander, B., 2002. Distribution of quality components in different morphological sections of sugar beet (*Beta _vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*. 17, pp. 29–39.
21. Moghaieb, R. E. A., Saneoka, H. and Fujita, K., 2004. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritime*. *Plant Science*, 166, pp. 1345-1349.
22. Niazi, B. H., Athar, M. and Rozema, J., 2004. Salt tolerance in the fodder beet and sea beet: Analysis of Biochemical relations. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30 (1-2), pp.78-88.
23. Saari, P., 2011. Industrial scale chromatographic separation of valuable compounds from biomass hydrolysates and side streams. *PhD thesis*. School of chemical Technology, Aalto university. Finland.
24. Shaw, B., Thomas, T. H. and Cooke, D. T., 2002. Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to drought and nutrient deficiency stress. *Plant Growth Regulation*, 37, pp. 77-83.
25. Van, L. J., and Wach, W., 2011. Process for the recovery of betaine from molasses. WO2011141175 A1.
26. Watkins, R. and Bacon, C., 2016. Soap from sugar beet. *British Sugar Beet Review*, 84(1), pp. 25-27.

(Original Research Paper)

Optimizing Betaine Extraction from Sugar Beet Molasses by Ion Exchange Chromatography Method

Samar Khayamim.[1]*, Babak Babaee[2], Hamid Noshad [2], Dariush Taleghani [2]

1- Assistant professor of Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.
2- Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received:17/02/2022 Accepted:27/04/2022

Abstract

Sugar beet is important for amino acids like glycine betaine beside sugar because it has medicinal effects in poultry, fish and also in human as it is used for anti-cancer drugs. This design was conducted in order to optimize betaine extraction from sugar beet molasses in ion exchange chromatography method. Firstly, an experiment was conducted in factorial based on completely randomized design with three replications for optimizing suitable extraction condition of different injected materials to chromatography column. The first factor was injected materials including potassium chloride, pure sucrose and betaine, the second factor was related to column temperature including 25, 50 and 75°C and the third factor was different resins including experimental, commercial 1 and 2 resins. The extracted volumes of these injected materials were significantly different. The best temperature for betaine extraction was 75°C.the best resin for betaine extraction was commercial resin 1 in which betaine was extracted with more quantity and efficiency and faster in comparison with other resins. Secondly betaine of sugar beet molasses was extracted based on optimum condition at first step. The purity of extracted betaine was 54, 64 and 79% with mean of 65.66. This experiment was conducted in experimental level which would be useful for performing at industrial level in different sugar factories of the country to extract betaine from sugar beet molasses

.

KeyWords: Chromatography, Glycine Betaine Extraction, Molasses, Resin, Temperature.

*Corresponding Author: samar.khayam@gmail.com