



DOI:10.22144/ctujos.2024.349

CHIẾT XUẤT BETACYANIN TỪ VỎ QUẢ THANH LONG (*Hylocereus undatus*) VỚI SỰ HỖ TRỢ CỦA SÓNG SIÊU ÂM: THÔNG SỐ CHIẾT, SỰ ỔN ĐỊNH, VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Nguyễn Việt Nhân Hòa¹, Nguyễn Dương Thanh Trúc², Nguyễn Anh Tú², Trương Thị Hồng Ái², Huỳnh Thị Cẩm Đào², Phạm Gia Mỹ², Nguyễn Quốc Châu Thanh³, Lê Minh Nhân⁴, và Trần Thanh Tuấn^{5*}

¹Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Bách Khoa, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên Khoa Công nghệ Sinh hóa Thực phẩm, Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ Cần Thơ

³Khoa Khoa học Tự Nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

⁴Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

⁵Khoa Công nghệ Sinh hóa Thực phẩm, Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ Cần Thơ

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): tttuan@ctuet.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 24/05/2024

Sửa bài (Revised): 22/07/2024

Duyệt đăng (Accepted): 25/08/2024

Title: Extraction of betacyanin from dragon fruit peels (*Hylocereus undatus*) assisted with ultrasonic waves: Extracting parameters, stability, and bio-activity

Author(s): Viet Nhan Hoa Nguyen¹, Duong Thanh Truc Nguyen², Anh Tu Nguyen², Thi Hong Ai Truong², Thi Cam Dao Huynh², Gia My Pham², Quoc Chau Thanh Nguyen³, Minh Nhan Le⁴ and Thanh Tuan Tran^{5*}

Affiliation(s): ^{1,3}Can Tho University; ^{2,5}Chemical and Food Technology, Can Tho University of Technology; ⁴Can Tho University of Medicine and Pharmacy

TÓM TẮT

Betacyanin là nhóm chất màu tự nhiên quan trọng dùng để thay thế chất màu tổng hợp do đặc tính bền, không độc hại và có nhiều hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe. Trong nghiên cứu này, betacyanin từ vỏ quả thanh long ruột trắng (*Hylocereus undatus*) được chiết bằng ethanol và xử lý siêu âm. Ảnh hưởng của các thông số đến hiệu suất chiết và bền màu của betacyanin đã được khảo sát. Kết quả cho thấy việc bổ sung các acid hữu cơ vào ethanol làm tăng đáng kể hiệu quả chiết và bền màu của betacyanin, trong đó ascorbic acid hiệu quả hơn citric acid. Điều kiện chiết tối nhất đạt được là 40% (v/v) ethanol, 0,005 mol/L ascorbic acid, pH 2, 1/20 g/mL tỷ lệ rắn lỏng, 40°C, và 20 phút. Hiệu suất chiết betacyanin là 0,472 mg/g và sự phân hủy màu sau 24 giờ là nhỏ hơn 5%. Cao chiết chứa betacyanin có hoạt tính kháng oxy hóa và gây độc tế bào ung thư biểu bì KB. Như vậy, vỏ quả thanh long là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất betacyanin, mang đến giá trị kinh tế và môi trường.

Từ khóa: Ascorbic acid, betacyanins, chất màu tự nhiên, chiết dung môi với hỗ trợ siêu âm, vỏ quả thanh long

ABSTRACT

Betacyanin is an essential natural colorant to replace synthetic ones due to its durable, non-toxic properties and health-beneficial biological activities. In this study, betacyanin was extracted from dragon fruit peel (*Hylocereus undatus*) using ethanol and an ultrasonic treatment. The influence of parameters such as ethanol concentration, organic acid type and concentration, pH, temperature, time, and solid-liquid ratio on the extraction efficiency of betacyanin and their color stability in the extract were investigated. The results showed that the best condition for betacyanin extraction was 40% (v/v) ethanol, 0.005 mol/L ascorbic acid, pH 2, 1/20 g/mL solid-liquid ratio, at 40°C, and 20 minutes of ultrasonic time. Under the best extraction condition, the efficiency of betacyanin extraction was 0.472 mg/g and their color decomposition was less than 5% after 24 hours. The betacyanin extract showed antioxidant activity and toxicity to KB epidermoid cancer cells. Thus, with assisted ultrasound waves, betacyanin has been successfully extracted with high and stable extracting efficiency from dragon fruit peels. The dragon fruit peel can be a potential raw material for producing betacyanin, bringing high economic and environmental value.

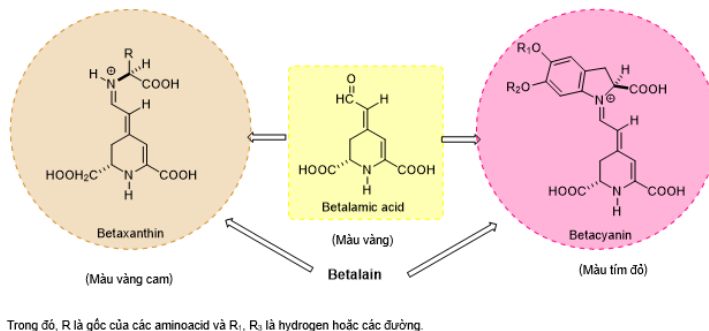
Keywords: Ascorbic acid, betacyanin, dragon fruit peel, natural colorants, ultrasound-assisted extraction

1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, xu hướng sử dụng các hợp chất màu tự nhiên và có hoạt tính sinh học có lợi làm phụ gia thực phẩm thay thế cho các phụ gia tổng hợp ngày càng tăng, nhằm tăng giá trị dinh dưỡng, tính cảm quan, và an toàn khi sử dụng sản phẩm (Kanatt, 2020; Zin et al., 2020). Tuy nhiên, so với chất màu tổng hợp, chất màu tự nhiên có một số nhược điểm như giá thành cao và tính ổn định màu kém do dễ bị ảnh hưởng của các yếu tố bên ngoài như nhiệt độ, pH, oxy, ánh sáng, và kim loại như Fe và Cu trong quá trình chế biến hoặc bảo quản (Ramadan & Mörsel, 2003). Hiện nay, có nhiều loại chất màu tự nhiên khác nhau và việc phân loại có thể dựa vào nguồn gốc như thực vật, động vật và vi sinh vật (Singh et al., 2023). Trong các nhóm màu thực vật, các betalain (còn gọi là anthocyanin nitrogen) với đặc tính sắc tố đỏ vàng đang thu hút nhiều mối quan tâm. Các betalain là chất chuyển hóa nitrogen thứ cấp, có cấu trúc khung cơ bản là betalamic acid (4-(2-oxoethylidene)-1,2,3,4-tetrahydropyrid-ine-2,6-di-carboxylic acid) và được chia làm hai nhóm gồm betaxanthin (màu vàng) và betacyanin (màu tím đỏ) dựa vào các nhóm thế trên

nguyên tử nitrogen (Hình 1) (Slimen et al., 2017). So với các hợp chất anthocyanin (một chất màu đang được sử dụng phổ biến hiện nay), betalain có nhiều đặc tính vượt trội như tính ổn định màu ở dãy pH rộng (khoảng pH 3 ÷ 7), nhiệt độ bền cao và dễ tan trong nước (Singh et al., 2023). Ngoài ra, nhiều hoạt tính sinh học của betalain cũng được tìm thấy như kháng khuẩn, kháng oxy hóa, chống tế bào ung thư và hạ lipid máu (Gengatharan et al., 2016; Otalora et al., 2019; Hu et al., 2020). Do đó, betalain có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghệ thực phẩm, thực phẩm chức năng, dược phẩm và vật liệu thông minh (Sivakumar et al., 2009; Qin et al., 2020).

Betalain được tìm thấy nhiều trong hạt, quả, hoa, lá, thân và rễ của các loài họ *Amaranthaceae*, *Cactaceae* và *Chenopodiaceae* như lê gai, thanh long và xoconostle (Hu et al., 2020). Trong đó, thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) và lê gai (*Opuntia spp.*) được báo cáo là nguồn cung cấp betalain tuyệt vời, với hàm lượng lần lượt 18,67 mg betacyanins/100 g và 20,160 mg betalain/100 g (Ramli et al., 2014; Jimenez-Alvarado et al., 2015).



Hình 1. Cấu trúc của betalamic acid, betacyanin, và betaxanthin

Các dung môi phân cực như nước, methanol, ethanol, acetone và ethyl acetate thường được sử dụng để chiết xuất betalain từ các vật liệu; trong đó, một số phương pháp chiết phổ biến hiện nay như ngâm dầm, sử dụng enzyme, soxhlet, hỗ trợ siêu âm hay vi sóng hoặc chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn như carbon dioxide (CO₂) (Moure et al., 2000; Naczek & Shahidi, 2004; Calva-Estrada et al., 2022). So với các phương pháp khác, phương pháp chiết với hỗ trợ siêu âm cho thấy có nhiều thuận lợi như hiệu quả chiết cao, thời gian chiết ngắn, nhiệt độ thấp, hạn chế phân hủy các hợp chất kém bền, ít tổn dụng môi và thiết bị vận hành đơn giản (Sivakumar

et al., 2009; Kumar et al., 2021). Với ưu điểm trên, phương pháp chiết dung môi với sự hỗ trợ của siêu âm được xem là phương pháp chiết thích hợp cho việc ly trích betalain.

Tại Việt Nam, cây thanh long được trồng phổ biến ở các tỉnh Nam Trung Bộ và Nam Bộ với ba loại chính là thanh long ruột trắng vỏ đỏ (*Hylocereus undatus*), thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) và thanh long ruột trắng vỏ vàng (*Selenicereus megalanthus*). Bình Thuận là tỉnh có diện tích trồng thanh long lớn nhất cả nước (khoảng 33.730 ha với sản lượng trên 650.000 tấn/năm và chủ yếu là thanh

long ruột trắng). Khoảng 80-85% quả thanh long được trồng xuất khẩu sang các nước Châu Á, Hà Lan, và Canada (Linh và ctv., 2019). Nhìn chung, thịt quả thanh long được sử dụng ở dạng quả tươi hoặc qua chế biến thành các sản phẩm đồ uống, trong đó vỏ được xem là phế phẩm trong quá trình chế biến. Một số nghiên cứu cho thấy rằng vỏ thanh long cũng chứa một lượng betalain đáng kể (chủ yếu là betacyanins) (Linh và ctv., 2019; Tran & Do, 2019). Như vậy, có thể nhận thấy nguồn nguyên liệu thanh long trong nước luôn có sẵn và dồi dào, và việc tận dụng vỏ quả thanh long từ quá trình chế biến có thể nâng cao hơn nữa giá trị thương mại của loại quả này. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu về chiết xuất betacyanins từ vỏ quả thanh long ruột trắng vỏ đỏ sử dụng phương pháp chiết dung môi với sự hỗ trợ siêu âm.

Nghiên cứu chiết xuất và đánh giá sự bền màu của betacyanin trong dịch chiết từ vỏ quả thanh long ruột trắng bằng phương pháp chiết hỗn hợp dung môi ethanol nước với sự hỗ trợ sóng siêu âm đã được tiến hành. Trong đó, ảnh hưởng của các nhân tố đến hiệu suất chiết betacyanins như nồng độ ethanol, loại acid hữu cơ, nồng độ acid, pH, nhiệt độ, thời gian siêu âm, và tỷ lệ rắn lỏng đã được nghiên cứu. Ngoài ra, hoạt tính kháng oxi hóa và độc tính trên tế

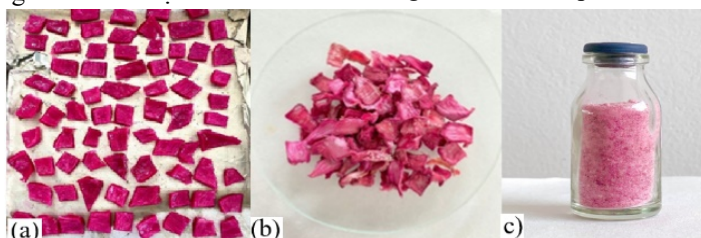
bào ung thư da KB của cao chiết chứa betacyanins cũng được xác định.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Chuẩn bị nguyên liệu: Quả thanh long ruột trắng (*Hylocereus undatus*) được thu mua tại chợ Cái Răng, Cần Thơ. Quả được chọn có khối lượng trung bình khoảng 500 g, chín hoàn toàn, vỏ không bị sâu hay dập nát. Vỏ được tách ra từ quả được loại bỏ phần xanh, rửa sạch, cắt nhỏ (kích thước 1 cm × 1 cm) và sấy ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi (khoảng 48 giờ). Vỏ sau sấy được nghiền thành bột mịn với kích thước nhỏ hơn 250 μm và được chứa trong lọ thủy tinh bao phủ bằng giấy bạc để tránh ánh sáng (Hình 2). Lọ chứa mẫu được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh và sử dụng cho các thí nghiệm chiết xuất tiếp theo.

Hóa chất: Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp từ Xilong Scientific Co., Ltd., Trung Quốc. Các dung dịch chiết ethanol (C₂H₆O, 99,7%) ở nồng độ khác nhau được điều chế bằng cách pha loãng với nước cất. Citric acid (C₆H₈O₇, ≥99,5%) và ascorbic acid (C₆H₈O₆, ≥99,0%) được thêm trực tiếp vào dung dịch ethanol đến nồng độ mong muốn. Các dung dịch hydrochloric acid (HCl, ~37%) và sodium hydroxide (NaOH, ≥96,0%) loãng (0,1 mol/L) được dùng để điều chỉnh pH của các dung dịch.



Hình 2. Mẫu vỏ thanh long trước sấy (a), sau sấy (b) và được nghiền mịn (c)

2.2. Quy trình thí nghiệm

Cân 1,0 g bột nguyên liệu cho vào bình tam giác 100 mL chứa sẵn ethanol ở thể tích, nồng độ ethanol, nồng độ acid, và pH xác định. Sau đó, hỗn hợp được đặt vào bể siêu âm (Guangdong GT Ultrasonic Co., Ltd, China) và tiến hành siêu âm ở tần số 40 kHz với công suất 150 W trong khoảng thời gian và nhiệt độ xác định. Phần dịch lọc được tiến hành phân tích UV-Vis để xác định hàm lượng betacyanin chiết xuất. Để tìm điều kiện tốt nhất cho chiết xuất betacyanin từ bột nguyên liệu, ảnh hưởng của các yếu tố như nồng độ ethanol (20÷90% (v/v)), loại acid (citric acid và ascorbic acid), pH (2÷10), nồng

độ acid (0,001÷0,100 mol/L), nhiệt độ (33÷60°C), thời gian (10÷60 phút), tỷ lệ rắn lỏng (R/L) (1/10÷1/40 g/mL) được khảo sát; trong đó, phương pháp thay đổi lần lượt từng yếu tố với sự cố định các yếu tố còn lại được áp dụng. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để xác định sai số.

2.3. Phương pháp phân tích

Định lượng betacyanins: Betacyanins trong dịch chiết ethanol được định lượng bằng phương pháp đo quang phổ phân tử (UV-Vis, Biochrom Ltd., UK) tại bước sóng 532 nm. Hàm lượng betacyanins (m, mg/g) chiết xuất được từ bột vật liệu được tính theo công thức (1) (Das et al., 2019).

$$m \text{ (mg/g)} = \frac{A \times V \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times L \times W} \quad (1)$$

Trong đó: A là độ hấp thụ quang tại 532 nm. MW là khối lượng phân tử betacyanin (550 g/mol). V và DF lần lượt là thể tích dung môi (mL) và hệ số pha loãng. $\epsilon = 65000 \text{ L/mol}$. L là chiều dày cuvette thạch anh (1 cm) và W là khối lượng mẫu bột nguyên liệu (1,0 g).

Ngoài ra, để đánh giá độ bền của betacyanin trong dịch chiết ethanol, hàm lượng betacyanin trong các dung dịch chiết cũng được phân tích sau 24 giờ tại nhiệt độ phòng.

2.4. Phương pháp thử hoạt tính sinh học

Dung dịch ethanol chứa betacyanins ở điều kiện chiết xuất tốt nhất được cô quay chân không (Biolase Biodustry, Co., Ltd, Trung Quốc) để loại bỏ dung môi. Cao chiết thô thu được được tiến hành đo hoạt tính kháng oxi hóa bằng phương pháp DPPH và độc tính tế bào KB (Human epidermic carcinoma), ung thư biểu mô.

2.4.1. Phương pháp DPPH

Hoạt tính kháng oxi hóa của cao chiết thô được xác định dựa trên khả năng ức chế chất 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), chất tạo ra gốc tự do thông qua việc làm giảm màu của DPPH và được xác định bằng phương pháp đo hấp thụ quang ở bước sóng 517 nm (Marxen et al., 2007). Đầu tiên, dung dịch DPPH 1 mM trong methanol (MeOH) và chất thử (cao chiết) được pha trong nước khử ion. Trên đĩa 96 giếng, một dãy chất thử ở các nồng độ khác nhau được kết hợp với dung dịch DPPH trong 30 phút ở 37°C. Độ hấp thụ quang của DPPH sau phản ứng được đọc trên máy quang phổ Biotek ở bước sóng 517 nm. Phần trăm bẫy gốc tự do DPPH của mẫu thử (SC%) được tính theo công thức (2).

$$SC\% = (A_{\text{mẫu trắng}} - A_{\text{mẫu thử}}) \times 100 / A_{\text{mẫu trắng}} \quad (2)$$

EC₅₀ được tính theo giá trị SC tương quan với các nồng độ khác nhau của chất thử, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Curcumin được sử dụng làm chất đối chứng dương và dung dịch DPPH 1 mM trong methanol được dùng làm mẫu trắng.

2.4.2. Phương pháp thử độc tính tế bào

Dòng tế bào ung thư ở người KB được cung cấp bởi ATCC (the American Type Culture Collection). Dòng tế bào ung thư nghiên cứu được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy phù hợp có bổ sung thêm 10% huyết thanh phôi bò (FBS) và các thành phần cần thiết khác ở điều kiện tiêu chuẩn (5% CO₂;

37°C; độ ẩm 98%; vô trùng tuyệt đối) (Scudiero, 1988; Fresney; 1993).

Thử độc tế bào: 200 μL dung dịch tế bào KB ở nồng độ 3×10^4 tế bào/mL được cho vào đĩa 96 giếng trong môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) chứa các mẫu thử được pha loãng đến nồng độ 256 $\mu\text{g/ml}$ và các nồng độ pha loãng thấp hơn. Các giếng được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 3 ngày. Trong đó, đối chứng dương gồm 200 μL dung dịch tế bào 3×10^4 tế bào/mL và đối chứng âm gồm 200 μL môi trường nuôi cấy. Ellipticine (Sigma-Aldrich) được dùng làm chất đối chiếu. Sau 3 ngày nuôi cấy; tế bào được ủ với 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 0,2 mg/mL ở 37°C trong 4 giờ; loại bỏ môi trường, thêm 100 μL dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), lắc đều và đo hấp thụ quang ở bước sóng 540 nm. Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào (Growth inhibition) được tính theo công thức (3).

$$IC(\%) = \frac{A_{\text{Mẫu thử}} - A_{\text{Đối chứng dương}}}{A_{\text{Đối chứng âm}} - A_{\text{Đối chứng dương}}} \times 100 \quad (3)$$

Giá trị IC₅₀ được tính dựa trên kết quả số liệu phần trăm kìm hãm sự phát triển của tế bào.

Đồ thị và dữ liệu thu thập trong nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Origin version 2019b.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

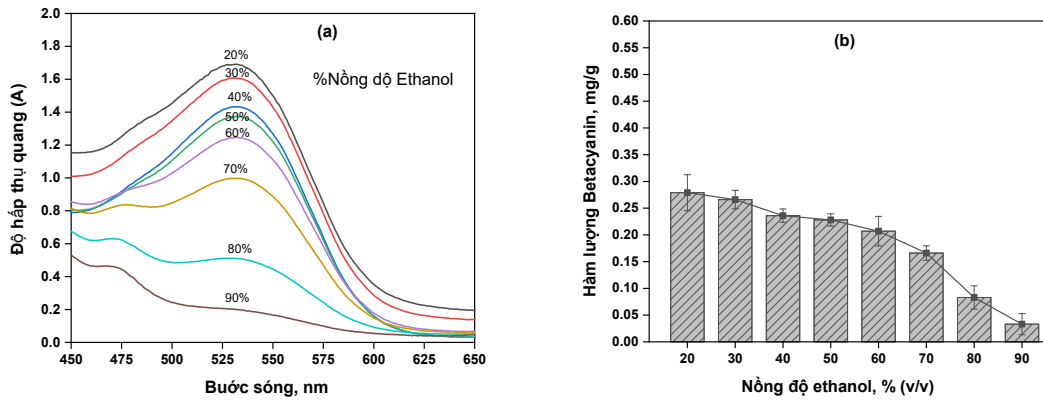
3.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất chiết betacyanin từ bột nguyên liệu

3.1.1. Nồng độ ethanol

Dựa vào đặc tính phân cực trong cấu trúc của các betalain mà các dung môi phân cực như nước, methanol, ethanol, và hỗn hợp của các dung môi đã được sử dụng để chiết xuất betalain (Silva et al., 2020). Các nghiên cứu chỉ ra rằng các dung môi dung môi nước cho thấy khả năng chiết hiệu quả betacyanin từ rau dền đỏ, rễ củ cải đỏ, quả lê, quả thanh long ruột đỏ (Prakash-Maran et al., 2013; Ramli et al., 2014; Das et al., 2019). Đối với các nguyên liệu chứa hàm lượng carbohydrate hòa tan cao như vỏ thanh long (khoảng 19-33%), việc sử dụng nước làm dung môi chiết có thể gây khó khăn cho quá trình tinh chế betalain do độ nhớt cao của dung dịch sau khi chiết (Fathordoobady et al., 2016, Tripathi et al., 2023). Mặt khác, so với methanol và ethyl acetate thì dung môi ethanol có nhiều ưu điểm trong việc chiết betalain như độc tính thấp, ít bay hơi, rẻ tiền, và ngăn cản sự hòa tan các carbohydrate từ nguyên liệu (Sanchez-Gonzalez et al., 2013; Das et al., 2019). Tuy nhiên, betacyanin trong ethanol thì

kém bền hơn so với trong nước. Do đó, để hạn chế sự hòa tan của các carbohydrate và bền hóa chất chiết betacyanin, hỗn hợp ethanol/nước đã được sử

dụng để chiết xuất betacyanin từ bột nguyên liệu trong nghiên cứu này.

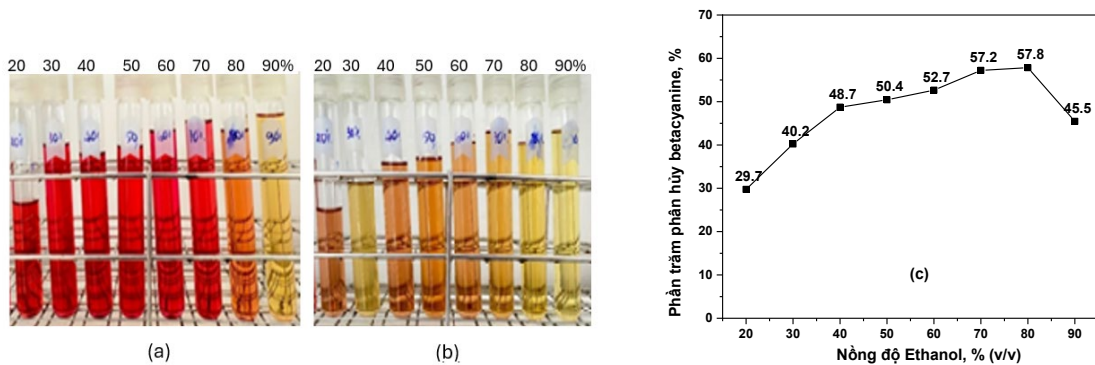


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol lên độ hấp thụ quang A (a) và hiệu quả chiết betacyanin (b)

([ethanol] = 20÷90 % (v/v), R/L=1/20 (g/mL), t = 30 phút, T = 33°C, pH = 6.8)

Để xem xét ảnh hưởng của hàm lượng ethanol đến hiệu suất chiết xuất betacyanin từ bột vật liệu, nồng độ ethanol tăng từ 20% đến 90% (v/v). Hỗn hợp phản ứng chiết được siêu âm trong 30 phút, tỷ lệ rắn lỏng là 1/20 g/L tại nhiệt độ 33°C. Kết quả Hình 3(a) đã xác nhận rằng thành phần betalain chính trong vỏ thanh long là betacyanin, điều này được thể hiện qua độ hấp thụ cực đại A của dung dịch chiết ở 532 nm (Tran & Do, 2019). Ngoài ra, sự suy giảm độ hấp thụ A của dịch chiết cũng cho thấy sự suy giảm hiệu quả chiết betacyanin khi tăng nồng độ ethanol. Cụ thể, Hình 3(b) cho thấy rằng hàm lượng betacyanin giảm từ 0,279 xuống 0,033 mg/g khi tăng nồng độ ethanol từ 20 đến 90% (v/v). Kết quả này là tương đồng với các kết quả nghiên cứu trước đây về hiệu quả chiết betalain bởi nước tốt

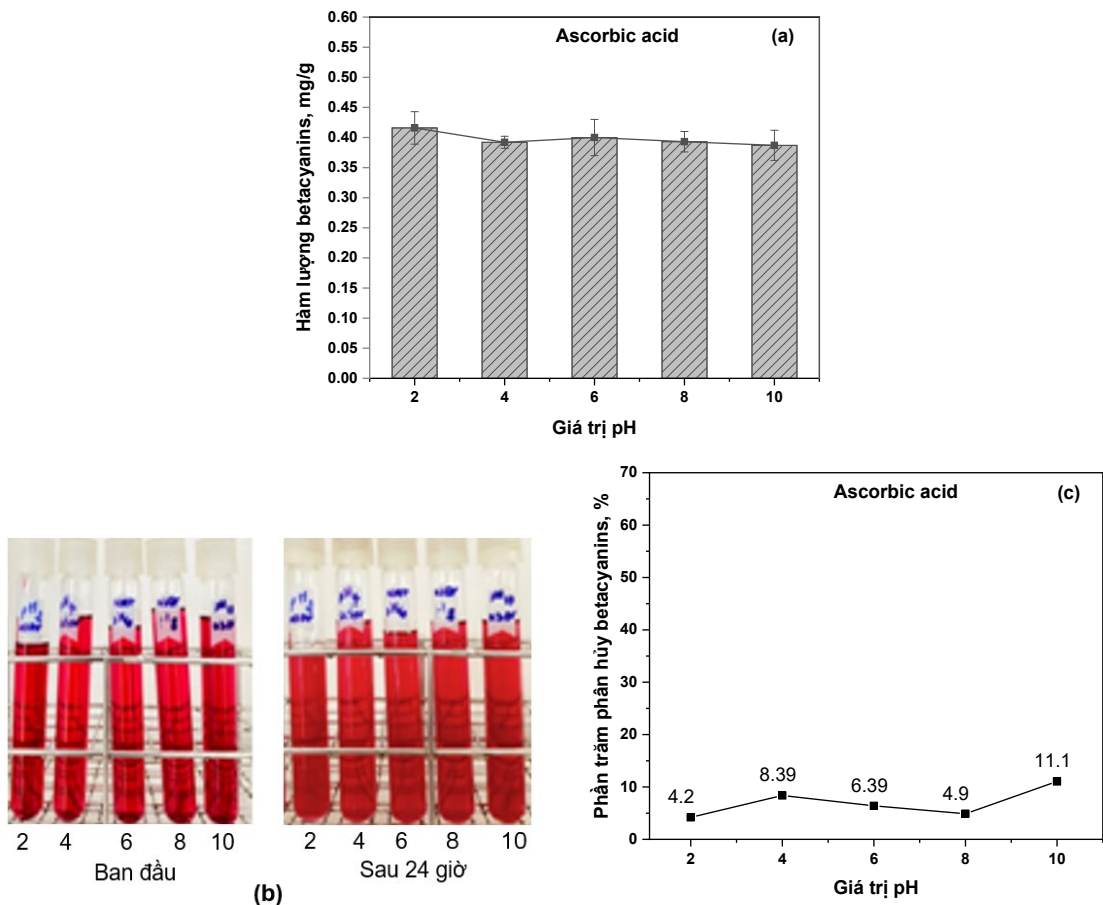
hơn ethanol (Gonzalez et al., 2013; Das et al., 2019). Mặt khác, ảnh hưởng của ethanol đến sự bền của betacyanin trong các dịch chiết cũng được quan sát trong 24 giờ tại nhiệt độ phòng. Ở Hình 4, phần trăm phân hủy betacyanin trong dịch chiết tăng đáng kể từ 29,7% đến 57,8% khi tăng nồng độ ethanol. Kết quả này được cho là sự thân hạch của phân tử ethanol tấn công vào liên kết aldimine (N=CH) làm giảm độ bền của betacyanin (Das et al., 2019). Mặc dù các dung dịch ở 20 và 40 % (v/v) ethanol cho thấy hiệu quả chiết và sự bền betacyanin cao hơn so với các nồng độ khác nhưng độ nhớt cao của các dung dịch này cũng được quan sát. Do đó, 40% (v/v) ethanol được xem là nồng độ tốt nhất cho sự chiết betacyanin từ bột vật liệu.



Hình 4. Hình ảnh màu dịch chiết betacyanin ban đầu (a), sau 24 giờ (b), và ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến phần trăm phân hủy màu betacyanin sau 24 giờ (c)

Trong khi đó, sự hiện diện của ascorbic acid trong dịch chiết đã làm tăng đáng kể hiệu quả chiết và độ bền của betacyanin và cao hơn so với citric acid (Hình 6). Cụ thể, hiệu quả chiết betacyanin đạt giá trị cao nhất tại pH 2 với 0,416 mg/g và giảm nhẹ còn 0,387 mg/g khi tiếp tục tăng pH. Điểm nổi bật là phần trăm phân hủy màu betacyanin chỉ nằm trong khoảng 4,2 đến 11,1%. Kết quả này có thể là do sự tương tác của ascorbic acid với betacyanin

thông qua liên kết hydrogen và ngăn cản sự phân hủy betacyanin theo phương trình (4). Ngoài ra, hoạt tính kháng oxy hóa của ascorbic acid cũng góp phần đáng kể làm tăng độ bền màu của betacyanin trong dịch chiết (Azeredo, 2009; Khan & Giridhar, 2014). Như vậy, pH 2 được chọn là điều kiện tốt nhất cho sự chiết betacyanin với sự hiện diện của ascorbic acid.



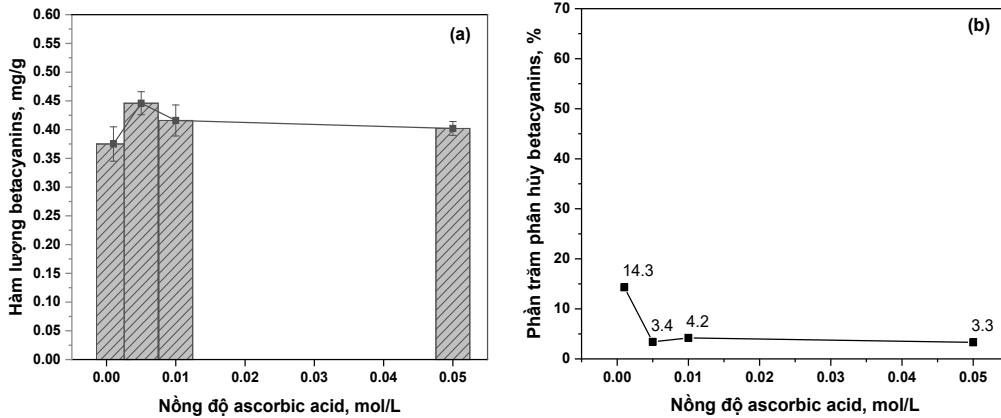
Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến hiệu quả chiết (a) và tính bền của betacyanin ((b)&(c)) có sự hiện diện của ascorbic acid

([Ethanol] = 40% (v/v), [Ascorbic acid] = 0,01 mol/L, pH = 2÷10, R/L = 20 g/mL, T = 33°C, t = 30 phút)

3.1.3. Nồng độ của ascorbic acid

Để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ascorbic acid đến hiệu quả chiết betacyanin từ bột vật liệu, nồng độ của ascorbic acid được thay đổi từ 0,001 đến 0,1 mol/L với sự cố định pH của dung dịch tại 2, tỷ lệ rắn lỏng 1/20 g/mL, nhiệt độ 33°C và thời gian siêu âm 30 phút. Ở Hình 7(a), hiệu quả chiết betacyanin tăng mạnh từ 0,375 mg/g đến 0,446 mg/g khi tăng nồng độ ascorbic acid từ 0,001 đến 0,005

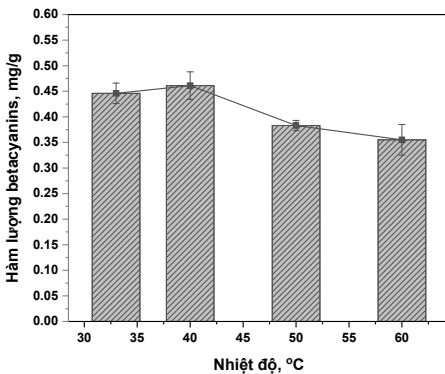
mol/L và sau đó giảm nhẹ đến 0,402 mg/g khi tiếp tục tăng nồng độ acid. Như vậy, việc tăng nồng độ acid quá cao có thể ngăn cản sự truyền khối của betacyanin vào dung dịch chiết và làm giảm sự chiết. Kết quả kiểm tra sự bền màu betacyanin sau 24 giờ cho thấy rằng việc tăng nồng độ ascorbic acid trong dung dịch chiết sẽ làm giảm sự phân hủy của betacyanin từ 14,3% xuống còn 3,4% (Hình 7(b)). Dựa vào kết quả đạt được, nồng độ ascorbic acid tốt nhất được chọn là 0,005 mol/L.



Hình 7. Ảnh hưởng nồng độ của Ascorbic acid đến hiệu quả chiết (a) và phần trăm phân hủy betacyanin (b)

([Ethanol] = 40% (v/v), [Ascorbic acid] = 0,001÷0,050 mol/L, pH = 2, R/L = 20 g/mL, T = 33°C, t = 30 phút)

3.1.4 Nhiệt độ chiết

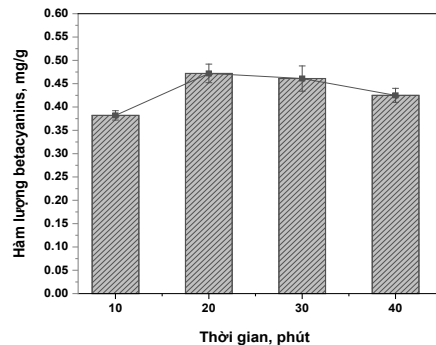


Hình 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu quả chiết và tính bền của betacyanin ([Ethanol] = 40% (v/v), [Ascorbic acid] = 0,005 mol/L, pH = 2, R/L = 20 g/mL, T = 33÷60°C, t = 30 phút)

Nhìn chung, khi tăng nhiệt độ có thể làm tăng hiệu quả chiết các hợp chất từ vật liệu do tăng tốc độ truyền khối và giảm độ nhớt của dung môi chiết (Al-Dhabi, 2017). Tuy nhiên, ở nhiệt độ cao, các hợp chất hữu cơ như betacyanin có thể bị phân hủy dẫn đến sự mất màu, và giảm hoạt tính của chúng (phương trình (4)). Ngoài ra, việc tăng nhiệt độ quá cao cũng làm giảm hiệu ứng tạo bọt của sóng siêu âm dẫn đến giảm hiệu suất chiết các hợp chất. Do đó, nhiệt độ đánh siêu âm sẽ được thực hiện ở nhiệt độ từ 33 đến 60°C. Các thông số chiết như nồng độ ethanol, nồng độ ascorbic acid, giá trị pH, tỷ lệ rắn lỏng, và thời gian siêu âm sẽ được cố định lần lượt tại 40% (v/v), 0,005 mol/L, 2, 1/20 g/mL, và 30 phút. Kết quả ở **Hình 8** cho thấy rằng 40°C là nhiệt

độ tốt nhất cho sự chiết betacyanin dưới điều kiện siêu âm với hiệu quả chiết là 0,461 mg/g.

3.1.5 Thời gian chiết



Hình 9. Ảnh hưởng của thời gian độ đến hiệu quả chiết ([Ethnaol] = 40% (v/v), [Ascorbic acid] = 0,005 mol/L, pH = 2, R/L = 20 g/mL, T = 40°C, t = 10÷ 40 phút)

Để tìm thời gian siêu âm tốt nhất cho hiệu suất chiết betacyanin, thời gian siêu âm sẽ được tiến hành từ 20 đến 60 phút tại 40°C tại 40% (v/v) ethanol, 0,005 mol/L ascorbic acid, pH 2, 1/20 g/mL tỷ lệ rắn lỏng. Ở **Hình 9**, 20 phút là thời gian siêu âm tốt nhất với hiệu quả chiết đạt 0,472 mg/g và việc kéo dài thời gian làm giảm hiệu quả chiết còn 0,425 mg/g sau 60 phút. Kết quả này được cho là tăng hiệu ứng xâm thực của dung môi được gây ra bởi sóng siêu âm do tăng sự hydrat hóa, phân mảnh và hình thành lỗ nhỏ trên mô thực vật khi kéo dài thời gian siêu âm (Silva et al., 2020), từ đó làm tăng sự phân tán chất tan vào dung dịch chiết. Tuy nhiên, việc tiếp xúc

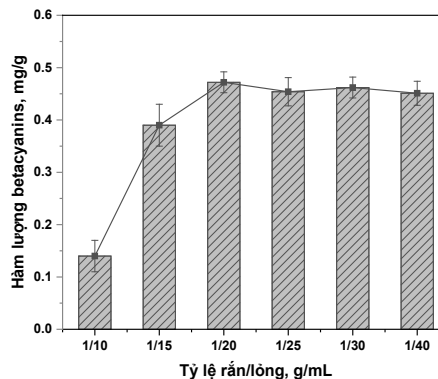
hiệt và năng lượng trong thời gian dài có thể dẫn đến sự phân hủy betacyanin.

3.1.6 Ảnh hưởng của tỷ lệ rắn – lỏng

Lượng dung môi chiết ảnh hưởng đến tốc độ truyền khối của hợp chất vào dung dịch chiết. Ở tỉ lệ dung môi thấp, độ nhớt của dung dịch cao, điều này gây khó khăn hơn cho hiệu ứng xâm thực do áp suất siêu âm trong chu trình phải vượt qua lực kết dính mạnh hơn trong dung dịch có độ nhớt cao. Sự chênh lệch nồng độ cao hơn của chất tan làm tăng độ khuếch tán và độ hòa tan của chất tan trong dung môi làm tăng thêm quá trình chiết. Ở mức dung môi cao, cường độ siêu âm tác động lên nền sản phẩm phụ cao hơn gây ra hiệu ứng phân mảnh, xói mòn và hình thành lỗ chân lông nhiều hơn, do đó làm tăng năng suất. Sự gia tăng diện tích tiếp xúc giữa vật liệu và dung môi cũng có thể làm tăng hiệu suất chiết (Maran & Priya, 2014). Tuy nhiên, việc sử dụng lượng lớn dung môi cũng đồng thời làm tăng chi phí cho quá trình thu hồi. Do đó, ảnh hưởng của tỷ lệ vật liệu và dung dịch chiết được khảo sát từ 1/10 đến 1/40 g/mL. Các thông số chiết được cố định tại 40% (v/v) ethanol, 0,005 mol/L ascorbic acid, pH 2, 40°C và 20 phút. Kết quả **Hình 10** cho thấy rằng lượng dung môi tăng làm tăng đáng kể hiệu quả chiết betacyanin từ 0,140 đến 0,472 mg/g khi tỷ lệ tăng từ 1/10 đến 1/20 g/mL, tiếp tục tăng lượng dung môi thì hiệu quả chiết dao động không tăng đáng kể (khoảng 0,021 mg/g). Do đó, tỷ lệ rắn lỏng 1/20 g/mL được chọn là điều kiện tốt nhất cho sự chiết betacyanin.

Từ các kết quả đạt được, điều kiện tốt nhất chiết betacyanins từ bột vỏ thanh long bởi dung dịch ethanol với sự hỗ trợ của sóng siêu âm là 40% (v/v) ethanol, 0,005 mol/L ascorbic acid, pH 2, tỷ lệ rắn lỏng 1/20 g/mL, nhiệt độ 40°C và thời gian siêu âm là 20 phút. Trong điều kiện tốt nhất, hàm lượng chiết xuất betacyanins đạt được là 0,472 mg/g. Như vậy, phương pháp siêu âm cho thấy có sự rút ngắn thời gian chiết đáng kể, giảm tiêu thụ năng lượng, và sự phân hủy hợp chất màu betacyanins sau khi chiết bằng cách sử dụng ascorbic acid ở nồng độ thích hợp. Do đó, dung dịch ethanol chứa betacyanins sau khi chiết ở điều kiện tốt nhất được cô quay chân

không để thu được cao chiết và đánh giá hoạt tính sinh học.



Hình 10. Ảnh hưởng của tỷ lệ rắn/lỏng đến hiệu quả chiết betacyanins (pH = 2, [Ascorbic acid] = 0,005 mol/L, [Ethanol] = 40% (v/v), R/L = 1/10÷1/40 g/mL, T = 40°C, t = 20 phút)

3.2 Hoạt tính sinh học của dịch chiết betacyanins

Vì hoạt tính sinh học của betacyanins phụ thuộc vào nguồn nguyên liệu và phương pháp chiết xuất nên trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng oxy hóa của cao chiết chứa betacyanin dưới điều kiện chiết siêu âm tốt nhất đã được xác định. Ngoài ra, hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu mô KB cũng được kiểm tra, đây là hoạt tính sinh học ít được công bố trước đây. Kết quả đo hoạt tính kháng oxy hóa và độc tính tế bào KB của cao chiết từ vỏ quả thanh long ở các nồng độ khác nhau được trình bày ở **Bảng 1** và **Bảng 2**. Mặc dù, khi tăng nồng độ của dịch chiết thì hoạt tính kháng oxy hóa của dịch chiết ($EC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$) tăng nhưng thấp hơn so với chất đối chứng là curcumin ($EC_{50} = 7,64 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$). Kết quả này là tương tự với tài liệu được báo cáo trước đây về hoạt tính kháng oxy hóa yếu của dịch chiết từ quả thanh long với sự hỗ trợ của siêu âm (Thirugnanasambandham & Sivakumar, 2017). Tương tự, hoạt tính gây độc tế bào KB của dịch chiết cũng cho thấy hoạt tính yếu với $IC_{50} > 256 \mu\text{g/mL}$ so với chất tham chiếu Ellipticine với $IC_{50} = 0,43 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$. Như vậy, với hoạt tính kháng oxy hóa và độc tính tế bào của dịch chiết vỏ quả thanh long, các nghiên cứu sâu hơn là cần thiết để đánh giá toàn diện hoạt tính sinh học của từ vỏ quả này và hướng tới các ứng dụng thực tế.

Bảng 1. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa

Mẫu	Nồng độ thử (µg/mL)	%Bắt giữ gốc tự do	Giá trị EC ₅₀ (µg/mL)	
Dịch chiết từ vỏ thanh long	256 64 16 4	20 0 0 0	>256	
Curcumin (Chất tham chiếu)	32 8 2 0,5	95 52 19 7		
				7,64 ± 0,5

Bảng 2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu bì KB

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm ức chế dòng tế bào KB (%)
Dịch chiết từ vỏ thanh long	256 64 16 4 IC ₅₀	23 13 10 2 >256
Ellipticine (Chất tham chiếu)	IC ₅₀ (µg/mL)	0,43 ± 0,02

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu chiết xuất betacyanin từ vỏ thanh long ruột trắng (*Hylocereus undatus*) bằng dung dịch ethanol kết hợp với đánh siêu âm đã thực hiện. Ảnh hưởng của các thông số chiết như nồng độ ethanol, loại acid hữu cơ, nồng độ acid, pH, thời gian, nhiệt độ, tỷ lệ rắn lỏng đến hiệu quả chiết xuất và sự bền màu betacyanin trong dung dịch sau khi chiết cũng đã được khảo sát. Việc thêm các acid hữu cơ vào dung dịch chiết đã làm tăng đáng kể sự bền màu của betacyanin so với chỉ dùng dung dịch ethanol; trong đó, ascorbic acid cho thấy hiệu quả bền màu tốt hơn citric acid. Điều kiện chiết xuất tốt nhất được xác định là 40% (v/v) ethanol, 0,005 mol/L ascorbic acid, pH 2, 1/20 g/mL tỷ lệ rắn lỏng, 40°C với 20 phút thời gian siêu âm. Hàm lượng chiết betacyanin dưới điều kiện tốt nhất là 0,472 mg betacyanin/g bột vỏ nguyên liệu. Cao chiết chứa betacyanin thu được cũng cho thấy có hoạt tính kháng oxy hóa theo phương pháp DPPH và độc tính trên tế bào biểu mô KB. Kết quả nghiên cứu xác nhận rằng khả năng thu hồi betacyanin từ vỏ thanh long bằng ethanol với sự hỗ trợ siêu âm là đạt được với hiệu suất cao. Betacyanin thu được có thể sử dụng như một phụ gia màu trong nhiều lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, dược phẩm và vật liệu. Hơn nữa, việc tận dụng nguồn nguyên liệu phế phẩm như vỏ thanh long có thể mang lại lợi ích kinh tế cũng như môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Dhabi, N. A., Ponnuragan, K., Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>

Azeredo, H. (2009). betaxanthins: properties, sources, applications, and stability—a review. *Food Science and Technology International*, 44, 65–2376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>

Castro-Enríquez, D. D., Montaña-Leyva, B., Del Toro-Sánchez, C. L., Juárez-Onofre, J. E., Carvajal-Millan, E., Burrueal-Ibarra, S. E., Tapia-Hernández, J. A., Barreras-Urbina, C. G., & Rodríguez-Félix, F. (2020). Stabilization of betalains by encapsulation - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 1587-1600. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04120-x>

Calva-Estrada, S. J., Jimenez-Fernandez M., & Lugo-Cervantes, E. (2022). Betalains and their applications in food: The current state of processing, stability and future opportunities in the industry. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100089>

Das, M., Saeid, A., Hossain, M. F., Jiang, G. H., Eun, J. B., & Ahmed, M. (2019). Influence of extraction parameters and stability of betacyanins extracted from red amaranth during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 643–653. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3519-x>

Linh, Đ. T. M., Mai, N. T. Q., & Thùy, P. T. P. (2020). Tối ưu hóa quá trình tách chiết betacyanin từ vỏ quả thanh long (*Hylocereus undatus*) bằng phương pháp vi sóng. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 129, 11–20.

Fathordoobady, F., Mirhosseini, H., Selamat, J., & Manap, M. Y. A. (2016). Effect of solvent type and ratio on betacyanins and antioxidant activity of extracts from *Hylocereus polyrhizus* flesh and peel by supercritical fluid extraction and solvent extraction. *Food Chemistry*, 202, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.121>

- Fresney, R. I. (1993). *Culture of animal Animal Cells* (3rd ed.). John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2016). Stability of betacyanin from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and its potential application as a natural colourant in milk. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*(2), 427–434. <https://doi.org/10.1111/ijfs.2016.51.issue210.1111/ijfs.12999>
- Hu, H., Yao, X., Qin, Y., Yong, H., & Liu, J. (2020). Development of multifunctional food packaging by incorporating betalains from vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) into quaternary ammonium chitosan/fish gelatin blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, *159*, 675–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.103>
- Jimenez-Alvarado, R., Aguirre-Alvarez, G., Campos-Montiel, R. G., ContrerasEsquivel, J. C., Pinedo-Espinoza, J. M., Gonzalez-Aguayo, E., & Hernandez- Fuentes, A. D. (2015). Effect of High-Pulsed Electric Fields on the extraction yield and quality of juices obtained from the endocarp on nine prickly pear (*Opuntia* spp.) varieties. *Jokull*, *65*(3), 414–435.
- Kanatt, S. R. (2020). Development of active/intelligent food packaging film containing Amaranthus leaf extract for shelf life extension of chicken/fish during chilled storage. *Food Packaging and Shelf Life*, *24*, 100506. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105410>
- Khan, M. I., & Giridhar, P. (2014). Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in *Rivina humilis* L. berry juice. *LWT - Food Science and Technology*, *58*(2), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.027>
- Kumar K., Srivastav S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *70*, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Maran, J. P., Priya, B. (2014). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, *70*, 530-536. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.032>
- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., & Hansen, U. (2007). Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors*, *7*(10), 2080–2095. <https://doi.org/10.3390/s7102080>
- Moure, A., Franco, D., Sinerio, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Lema, J. M. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 3890–3897. <https://doi.org/10.1021/jf000048w>
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1–2), 95-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Otalora, M. C., de Jesús Barbosa, H., Perilla, J. E., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2019). Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. *LWT*, *103*, 222-227. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.074>
- Prakash-Maran, J., Manikandan, S., & Mekala, V. (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box-Behnken design with desirability function. *Industrial Crops and Products*, *49*, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.012>
- Qin, Y., Liu, Y., Zhang, X., & Liu, J. (2020). Development of active and intelligent packaging by incorporating betalains from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel into starch/polyvinyl alcohol films. *Food Hydrocolloids*, *100*, 105410. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105410>
- Ramadan, M.F., & Mörsel, J. T. (2003). Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: a good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins, and sterols. *Food Chemistry*, *83*(3), 447-456. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00128-6)
- Ramli, N. S., Ismail, P., & Rahmat, A. (2014). Influence of conventional and ultrasonic-assisted extraction on phenolic contents, betacyanin contents, and antioxidant capacity of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *The Scientific World Journal*, *2014*, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/964731>
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M. R., San Martin-Martinez, E., & Zepeda, L. G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61* (49), 11995–12004. <https://doi.org/10.1021/jf401705h>
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Kenneth, D. P., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H.,

- Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48, 4827-4833.
- Singh, T., Pandey, V. K., Dash, K. K., Zanwar, S., & Singh, R. (2023). Natural bio-colorant and pigments: Sources and applications in food processing. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100628
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100628>
- Sivakumar, V., Anna, J. L., Vijayeeswarri, J., Swaminathan, G. 2009. Ultrasound-assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, 116, 782-789.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.03.009>
- Slimen, I. B., Najar, T., & Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 675-689.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04208>
- Silva, D. V. T., Baião, D. S., Ferreira, V. F., Paschoal, V. M. F. (2022). Betanin as a multipath oxidative stress and inflammation modulator: a beetroot pigment with protective effects on cardiovascular disease pathogenesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 539-554.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1822277>
- Sinko, P. J. (2006). *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* (6th ed.): Ionic Equilibria (pp. 161-185). Lippincott Williams & Wilkins (LWW), New York, USA.
- Silva, J. P. P., Bolanho, B. C., Stevanato, N., Massa, T. B., & da Silva, C. (2020). Ultrasound-assisted extraction of red beet pigments (*Beta vulgaris* L.): Influence of operational parameters and kinetic modeling. *Journal of Food Processing and Preservation*, June, 44(10), e14762.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14762>
- Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V. (2017). Microwave-assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1), 41-48.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.02.001>
- Tran, T. M. T., & Do, V. Q. (2019). Studies on betalains chemistry from the Vietnamese red dragon fruits (*Hylocereus polyrhizus*) by LC-ESI-MS/MS. *CTU Journal of Innovation and Sustainable Development*, 11(1), 87-94.
<https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2019.012>
- Tripathi, M., Diwan, D., Shukla, A.C., Gaffey, J., Pathak, N., Dashora, K., Pandey, A., Sharma, M., Guleria, S., Varjani, S., Nguyen, Q. D., & Gupta, V. K. 2023. Valorization of dragon fruit waste to value-added bioproducts and formulations: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2254930>
- Zin, M. M., Marki, E., & Banvolgyi, S. (2020). Conventional extraction of betalain compounds from beetroot peels with aqueous ethanol solvent. *Acta Alimentaria*, 49(2), 163-169.
<https://doi.org/10.1556/066.2020.49.2.5>