بهینه سازی آنزیم بری حرارتی و تاثیر اسانس گلپر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس با استفاده از روش سطح پاسخ

نرجس آقاجانی[1*]

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰٦/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۰)

چکیده

آنزیم پراکسیداز یکی از آنزیم‌های مهم در بافت‌های گیاهی است که با پراکسید هیدروژن ترکیب و تولید کمپلکس فعالی می‌نماید. غیر فعال‌سازی این آنزیم می‌تواند زمان ماندگاری سبزیجات خام و منجمد را افزایش دهد. جهت غیر فعال‌سازی آنزیم پراکسیداز از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که محدودیت‌های مخصوص به خود را دارند. در این تحقیق اثر اسانس طبیعی گلپر و آنزیم‌بری حرارتی بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز بررسی شد و با روش سطح پاسخ بهینه سازی گردید. نتایج نشان داد که اسانس گلپر فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس را کاهش داد. شرایط بهینه برای غیر فعال سازی غیر حرارتی آنزیم پراکسیداز کرفس تحت تاثیر اسانس گلپر شامل: غلظت اسانس گلپر ppm ۵۰، زمان فعالیت آنزیم ٦۰ ثانیه و فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) ۰/٤٦۷۵۹۹ بود. شرایط بهینه در غیر فعال سازی حرارتی شامل: دمای آنزیم‌بری ۹۰ درجه سانتی گراد، زمان آنزیم‌بری ۵ دقیقه، زمان فعالیت آنزیم ۲۰ ثانیه و فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) ۰/۰٤۵۲۸۱۵ بود.

کلید واژگان: اسانس، فعالیت آنزیم پراکسیداز، بهینه سازی، روش سطح پاسخ.

* مسئول مکاتبات: n.aghajani3862@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

۱- مقدمه

میکروارگانیسم ها و فعل و انفعالات بیوشیمیایی دو عامل اساسی در فساد مواد غذایی می باشند. فعل و انفعالات بیوشیمیایی اصلی میوه و سبزی‌ها توسط مجموعه ای از آنزیم ها تسریع شده و بنابراین به منظور حفظ خواص طبیعی مواد غذایی باید آنزیم ها با استفاده از حرارت یا روش‌های دیگر غیر فعال شوند [۱].

برای پی بردن به کارآیی فرآیند آنزیم بری معمولاً وجود دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز مورد سنجش قرار می گیرد. این دو آنزیم که در حد گسترده ای در بافت های گیاهی وجود دارند دارای مقاومت حرارتی زیادی هستند. از این نظر، نابود شدن آن‌ها می تواند نشانه از بین رفتن سایر آنزیم ها باشد. در این مورد پراکسیداز از کاتالاز هم مقاوم تر است [۲].

فعال شدن سیستم های آنزیمی می تواند تغییرات رنگ، نرم شدن، تغییرات طعم و از دست رفتن ارزش غذایی محصولات کشاورزی را سبب شود. پراکسیداز می تواند به پرکسید هیدروژن متصل شده و ایجاد یک کمپلکس فعال نماید که می تواند با دامنه وسیعی از مولکولهای دهنده الکترون واکنش دهد بنابراین غیرفعال کردن این آنزیم سبب افزایش مدت نگهداری محصولات کشاورزی می شود. جلوگیری از فعالیت این آنزیم و بالطبع جلوگیری از قهوه‌ای شدن آنزیمی در میوه‌ها و سبزیجات معمولا با تیمارهای فیزیکی و شیمیایی مختلف صورت می‌گیرد که برخی از این تیمارها شامل: ۱) اسیدی کردن و در واقع کاهش pH و کاهش آب آزاد ۲) استفاده از مواد چلاته کننده ۳) استفاده از تیمار حرارتی می‌باشد. روش اخیر روش خوبی برای غیرفعال کردن آنزیم پراکسیداز بوده ولی خسارت حرارتی به مواد تغذیه ای و کیفیت محصول ممکن است رخ دهد. از طرف دیگر مصرف کننده، محصول تازه، بدون کاهش خصوصیات کیفی نظیر بافت، رنگ و ظاهر را ترجیح می‌دهد [۳] که ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی به دلیل حفظ شرایط زیست محیطی و نداشتن خطرات بهداشتی در این بین بیشتر مورد توجه واقع شده است.

اسانس ها ترکیبات طبیعی، بی رنگ و پیچیده ای از الکل، آلدئید، استر و ... هستند که دارای بوی مخصوص به خود بوده و در سلامت انسان نقش حائز اهمیت دارند. این ترکیبات وزن مولکولی کمتر از آب دارند و در سطح آب می مانند، فرار هستند و از آن ها به عنوان طعم دهنده غذا، آنتی اکسیدان و ضد میکروب استفاده می شود [٤]. سلولهای هدف اولیه برای ترکیبات موثره اسانس ها، سلولهای غشای سیتوپلاسمی بوده که تخریب غشاء سیتوپلاسمی باکتری و قارچ توسط مواد ترپنی مشاهده گردیده است [٥]. همچنین ترکیبات فنلی، وظایف غشا سیتوپلاسمی را مختل می کنند [٦]. خاصیت چربی دوستی منوترپن های غیرخطی، انحلال پذیری آن‌ها را در غشاء سیتوپلاسمی افزایش داده که منجر به جلوگیری از فعالیت آنزیم های داخل غشاء سیتوپلاسمی می شود [٥].

همدا و کلین (۱۹۹۰) تأثیر α- توکوفول (ویتامین E)، دو فلاونوئید (کوئرستین و روتنیک اسید) و اسید سینامیک (کلروژنیک اسید) را در جلوگیری از فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره سبزیجات خام ارزیابی کردند [۷]. اسید کلروژنیک در غیرفعال کردن فعالیت پراکسیداز موثر است. آنتی اکسیدانها مدت نگهداری محصولات را افزایش داده و پایداری چربی و محصولات دارای چربی را بهبود می‌بخشند و باعث جلوگیری از افت کیفیت تغذیه‌ای و طعمی می‌شوند. فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره تعداد زیادی از سبزیجات مورد مطالعه قرار گرفته است [۸].

استفاده از اسانس میخک و رزماری روی عصاره چغندر برگی به ترتیب باعث کاهش ۵۹٪ و ۳٦٪ در فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با شاهد شد که در واقع نشان دهنده خواص آنتی اکسیدانی اسانس ها می‌باشد [۸]. به جرات می توان گفت گیاهان داروئی که مقدار پلی فنل های آن‌ها بالاتر است دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری هستند. لی و کلین (۱۹۸۹) نیز ثابت کردند غلظت‌های مورد استفاده در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس‌های گیاهی، مشابه با حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری در نظر گرفته می‌شود تا ضمن جلوگیری از فساد میوه، از قهوه‌ای شدن آنزیمی آن نیز ممانعت بعمل آید [۹].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

آنزیم پراکسیداز می تواند آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تبدیل کند که اکسیژن تولیدی برای فعالیت آنزیم های موثر در قهوه ای شدن آنزیمی (پلی فنول اکسیداز) و تشکیل ترکیبات قهوه ای مورد نیاز است. بنابراین غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز می تواند باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم های موثر در قهو ای شدن آنزیمی میوه شود. اسانس های گیاهی توانایی واکنش با اکسیژن محیط را داشته و خود می توانند نقش آنتی اکسیدانی داشته باشند. با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی این پژوهش می تواند تلاشی در آزمایش تأثیر این مواد در کاهش فعالیت آنزیم های موثر در قهوه‌ای شدن آنزیمی (پراکسیداز) و در نتیجه امکان حفظ رنگ و طعم میوه‌ها و سبزیجات خوراکی از طریق غیر فعال سازی این آنزیم به عنوان پیش نیاز فعالیت آنزیم های پلی فنل اکسیداز باشد.

هدف از انجام این پژوهش بررسی توانایی اسانس گلپر در غیرفعال سازی آنزیم پراکسیداز کرفس در مقایسه با روش آنزیم‌بری حرارتی است در واقع این تحقیق تلاشی برای بررسی امکان کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان آنزیم مسئول سنتز اتیلن و فعال کننده آنزیم های پلی فنل اکسیداز با استفاده از اسانس های طبیعی بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سبزی مورد استفاده

در این تحقیق کرفس که فعالیت آنزیم پراکسیداز بالایی دارد به عنوان منبع آنزیمی انتخاب و از بازار میوه و سبزی شهرستان همدان (ایران) تهیه شد. سپس از برگ کرفس جهت اندازه-گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده شد.

۲-۲- اسانس مورد استفاده

اسانس گلپر[1]، به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی از شرکت باریج اسانس تهیه و با استفاده از توبین ۸۰ در غلظت‌های ۵۰، ۱۲۵، ۲۰۰ ppm تهیه و تاثیر آنها بر فعالیت آنزیم پراکسیداز سبزیجات فوق آزمایش شدند.

۲-۳- روش ها

به منظور بررسی اثر اسانس مورد استفاده در غلظت های کاربردی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۲۵ درجه سانتی گراد و با اسپکتروفتومتر در ٤۷۰ نانومتر با استفاده از گواياکول (مرک) به عنوان سوبسترا و پراکسید هیدروژن (مرک) به عنوان دهنده هیدروژن اندازه‌گیری شد [۷].

۲-۳-۱- تهیه عصاره آنزیمی

برای این منظور ۱۰ گرم از سبزی مورد نظر توزین و ضمن افزودن ۳۰ میلی لیترآب مقطر (٤ درجه سانتی گراد) خرد گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) شد و مایع رویی که حاوی آنزیم پراکسیداز بود به عنوان عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت [۸].

۲-۳-۲- مخلوط واکنش

مخلوط سوبسترا شامل مخلوط ۱۰ میلی لیتر گایاکول ۱٪، ۱۰ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳٪ و ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سدیم بود و pH مخلوط واکنش روی ٦/۵ تنظیم شد [۷].

۲-۳-۳- اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز ۲/۸۷ میلی لیتر مخلوط سوبسترا، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره خام و ۰/۰۳ میلی لیتر آب مقطر که جمعا ۳ میلی‌لیتر بود به کووت منتقل و جذب نمونه ها به صورت سینتیکی در طول موج ٤۷۰ نانومتر قرائت شد.

۲-۳-٤- غیر فعال سازی غیر حرارتی آنزیم پراکسیداز

جهت بررسی اثر اسانس گلپر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۱۰ گرم از کرفس را در محلول تهیه شده از غلظت های ۵۰، ۱۲۵ و ۲۰۰ ppm از اسانس گلپر به مدت ۱ دقیقه غوطه ور و پس از ۱ ساعت فعالیت آنزیم پراکسیداز نمونه ها به صورت سینتیکی در طول موج ٤۷۰ نانومتر قرائت شد (جدول ۱ الف).

۲-۳-۵- غیر فعال سازی حرارتی آنزیم پراکسیداز

۱۰ گرم از کرفس را توزین نموده و در محدوده زمانی ۱۰-۵ دقیقه و دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد لازم به ذکر است که محدوده دمایی و زمانی تیمار حرارتی با آزمون و خطا تعیین شد. سپس فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) نمونه ها به صورت سینتیکی در طول موج ٤۷۰ نانومتر قرائت شد (جدول ۱ ب).

1. Heracleum persicum

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

Table 1 Independent variables and their applied levels for optimization of peroxidase enzyme activity in celery under effect of a) Golpar essential oil (non thermal blanching) and b) thermal blanching

Independent variables	variables level			Treatment
	-1	0	+1	
The time of enzyme activity (second)	60	220	380	Golpar essential oil
Essential oil concentration (ppm)	50	125	200	
The time of enzyme activity (second)	20	200	380	Thermal blanching
Blanching temperature (^{0}C)	85	87.5	90	
Blanching time (minute)	5	7.5	10	

۲-٤- تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودار

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) انجام شد. جهت مقایسه میانگین ها CCD[2] با استفاده از نرم افزار Design Expert (۲۰۰۰) انجام گرفت و رسم نمودارهای سه‌بعدی و بدست آوردن معادلات ریاضی توسط نرم افزار Design Expert (6.0.2) صورت پذیرفت.

۲-۵- آزمایشات بهینه‌سازی

به منظور بهینه‌سازی فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر اسانس گلپر و آنزیم‌بری حرارتی، از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی با ۳ سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی برای غیر فعال سازی غیر حرارتی و طرح مرکب مرکزی با ۳ سطح و ٦ تکرار در نقطه مرکزی برای غیر فعال سازی حرارتی مورد استفاده قرار گرفت (۱+، ۰، ۱-) (جدول ۱). در غیر فعال سازی حرارتی آنزیم ها (آنزیم‌بری) محدوده‌ی متغیرهای مستقل زمان فعالیت آنزیمی (مدت زمان لازم برای واکنش آنزیم با سوبسترا و تشکیل رنگ) (X_1)، دمای آنزیم-بری (X_2) و زمان آنزیم بری (X_3) و در غیر فعال سازی غیر حرارتی محدوده‌ی متغیرهای مستقل، زمان فعالیت آنزیمی (X_1)، غلظت اسانس گلپر (X_2) از آزمون‌های اولیه استنتاج گردید. تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل های رگرسیونی چندجمله‌ای درجه‌ی اول و درجه دوم به منظور پیش‌بینی پاسخ، درنظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت معادله ۱ است.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} x_i x_j$$

2. Central Composite Design

از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. بهینه-سازی داده‌ها به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی)

که Y متغیر وابسته (فعالیت آنزیم پراکسیداز که به صورت جذب اسپکتروفتومتر) می باشد، β_0 ثابت بوده و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت‌های برآورد شده توسط مدل هستند. x_i و x_j سطح متغیرهای مستقل هستند و آنها به‌ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه‌ی دوم و متقاطع متغیرهای X_1، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. مدل، اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می-نماید[۱۰]. کلیه تیمارها در بهینه‌سازی در ۲ تکرار صورت پذیرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر غوطه وری در اسانس گلپر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس

نتایج مربوط به تاثیر اسانس گلپر و غلظت های مختلف آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره خام کرفس در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود اسانس گلپر در تمامی غلظت های مورد استفاده در کرفس تأثیر مثبت داشته و باعث کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است. نتایج تحقیقات سایر محققین نیز ارتباط فعالیت آنتی اکسیدانی و ممانعت کنندگی فعالیت آنزیم پراکسیداز اسانس های گیاهی در سبزیجات مختلف را نشان می دهد که موید نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰) و شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) کارایی اسانس های میخک، رازیانه و زیره در غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز سبزیجات مختلف (کاهو، کلم سفید، کلم قرمز، کدو خورشتی و سیب زمینی) را گزارش نمودند [۱۱ و ۱۲].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

Table 2 Effect of golpar essential oil on peroxidase activity and the percent relative peroxidase activity of crude extracts of celery

concntration		50 (mg/100 mL)	75 (mg/100 mL)	125 (mg/100 mL)	200 (mg/100 mL)
Crude extract of celery	900^{a}	527.5^{bc}	477.5^{cd}	343.75^{e}	298.75^{f}
Crude extract of celery	-	41.38^{bc}	46.94^{cd}	61.80^{e}	66.80^{f}

Superscript letters indicate that means with the same letters designation in a raw are not significantly different at $P<0.05$. Negative sign mean that proxidase activity increased more than blank sample (crude extracts).

۳-۲- بهینه‌سازی اثر متغیرهای مستقل بر غیر فعال سازی آنزیم پراکسیداز در کرفس

۳-۲-۱- مدل‌سازی غیر فعال سازی غیر حرارتی آنزیم پراکسیداز

طرح آزمایشی با سطوح کدبندی شده‌ی متغیرهای مستقل و نتایج فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب اسپکتروفتومتر) مربوط به تاثیر هر اسانس بر فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس در جدول ۳ آورده شده است.

Table 3 Central composite design, coded levels of independent variables and actual level of peroxidase activity of crude extracts of celery under effect of golpar essential oil.

Independent variables			Dependent variable (Response)
Treatment number	Essential oil concentration (x_1)	The time of enzyme (x_2)activity	Enzyme activity (absorbance)
1	0	0	0.081
2	1	1	1.417
3	1	-1	0.276
4	0	0	1.03
5	0	0	1.0٥
6	0	0	1.12
7	1	0	0.991
8	-1	-1	0.510
9	-1	1	1.503
10	-1	0	1.066
11	0	1	1.426
12	0	-1	0.292
13	0	0	1.02

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی مربوط به فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیراسانس گلپر به منظور انطباق مدل ریاضی و تعیین ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب به ترتیب در جدول ٤ آورده شده‌اند.

Table 4 Analysis variance of regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for predicting peroxidase enzyme activity in celery under effect of golpar essential oil.

Source	DF	Sum of squares	Mean of squares	F-Value	p-Value	Coefficient
Model	5	1.88	0.38	152.62	<0.0001	1.05^{**}
X_1	1	0.026	0.026	10.54	0.0141	-0.066^{*}
X_2	1	1.78	1.78	721.72	<0.0001	0.54^{**}
$X_1 \times X_1$	1	0.000733	0.000733	0.30	0.6025	0.016^{ns}
$X_2 \times X_2$	1	0.065	0.065	26.29	0.0014	-0.15^{**}
$X_1 \times X_2$	1	0.005476	0.005476	2.22	0.1798	0.037^{ns}
Residual	7	0.017	0.002466	-	-	
Lack of fit	3	0.011	0.003555	2.15	0.2361	
Pure error	4	0.0066	0.00165	-	-	
Total	12	1.90	-	-	-	

** significant at 1%, * significant at 5%, ^{ns} non significant

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات به منظور پیش‌بینی مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ٤)، معادلات پیشنهادی زیر برای فعالیت آنزیم پراکسیدازکرفس تحت تاثیر اسانس گلپر (Y) ارائه گردید:

$$Y= 1.05 - 0.066\ X_1 + 0.54\ X_2 - 0.15\ (X_2^2)$$

X_1 = غلظت اسانس گلپر، X_2 = زمان فعالیت آنزیمی

در بررسی تاثیر اسانس گلپر بر فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه‌ی دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضریب همبستگی بالا (R^2 =۰/۹۹۰۹) موید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۹/۰۹ درصد از کل تغییرات در دامنه‌ی مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. در مورد R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده[3] که به ترتیب ۰/۹۹۰۹ و ۰/۹۸٤٤ به دست آمدند، نیز بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها هستند.

مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش[4] مورد بررسی قرار گرفت که برای $P > ۰/۰۵$ معنی‌دار نبود. فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود ($P> ۰/۰۵$) و مدل بر اساس فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس (تحت تاثیر اسانس گلپر) برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده توانسته است که تغییرات در داده ها را به اندازه کافی توضیح دهد [١٤]، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.

جهت تعیین شرایط بهینه‌ی هر متغیر در حصول پایین ترین فعالیت آنزیمی، نمودارهای سه‌بعدی سطحی و کانتور[5] برای متغیرها در شکل ۱ ترسیم شده است.

همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است با افزایش زمان فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم پراکسیداز در یک غلظت ثابت از اسانس گلپر، افزایش می‌یابد که نتایج مربوط به ارتباط فعالیت‌آنزیمی با زمان واکنش آنزیمی، بیانگر افزایش دسترسی آنزیم به سوبسترا بوده که در تحقیق دارائی گرمه خانی و همکاران (۲۰۱۰) و نیز شهابی قهفرخی و همکاران (۲۰۱۳) نیز ثابت شده است. به گونه‌ای که در بالاترین زمان فعالیت‌آنزیمی انتخاب شده بیشترین فعالیت آنزیمی (جذب) مشاهده می گردد. با افزایش زمان فعالیت آنزیمی از شدت و نرخ فعالیت آنزیمی (جذب) کاسته می‌شود؛ این کاهش می‌تواند به علت کم‌شدن سوبسترای در دسترس آنزیم و کم‌شدن فعالیت اکسیداتیو آنزیم باشد؛ از سوی دیگر تشکیل ترکیبات ممانعت-کننده، از فعالیت آنزیمی نیز می‌تواند در این مورد اثرگذار باشند [١١ و ١٢].

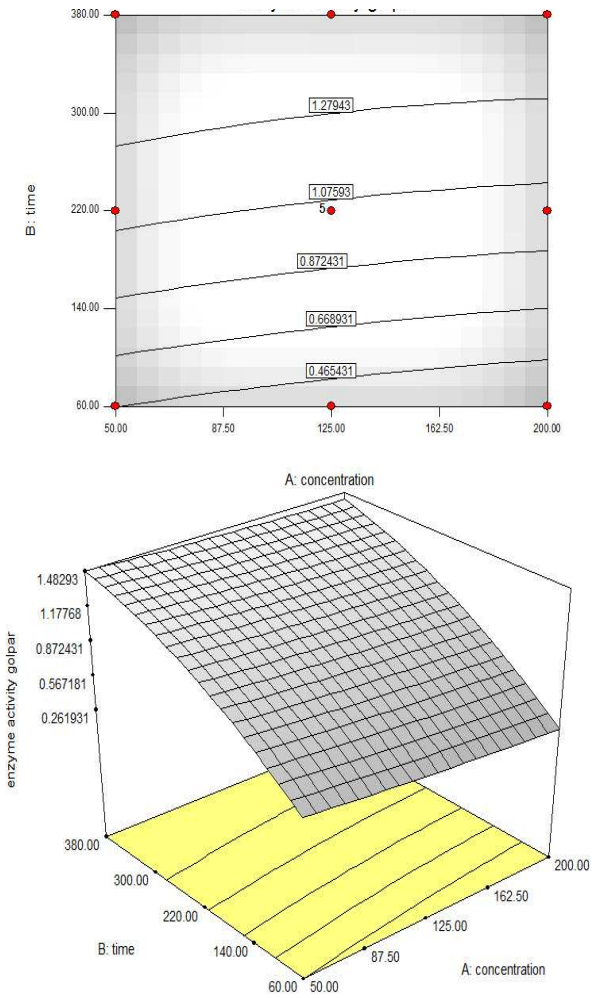

Fig 1 Response surface showing (3D surface and contour plot) of the effect of different enzymatic time and golpar essential oil concentration on the peroxidase enzyme activity

همانطور که مشاهده می شود با افزایش غلظت اسانس گلپر در زمانهای اولیه فعالیت آنزیم، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز مشاهده می شود اما در زمان های فعالیت آنزیمی بالاتر، افزایش غلظت اسانس منجر به کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می شود (شکل ۱) که با نتایج کاشانی نژاد و دارائی گرمه‌خانی (۲۰۱۳) مطابقت داشت. در زمان های فعالیت آنزیمی طولانی تر و غلظت‌های بالاتر اسانس، به دلیل ترکیب شدن اسانس با اکسیژن محیط از واکنش قهوه ای شدن آنزیمی ممانعت شده و در نتیجه فعالیت آنزیم پراکسیداز کنترل می شود [١٤].

3. Adjusted R-Squared
4. Lack of fit
5. Contour plot

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

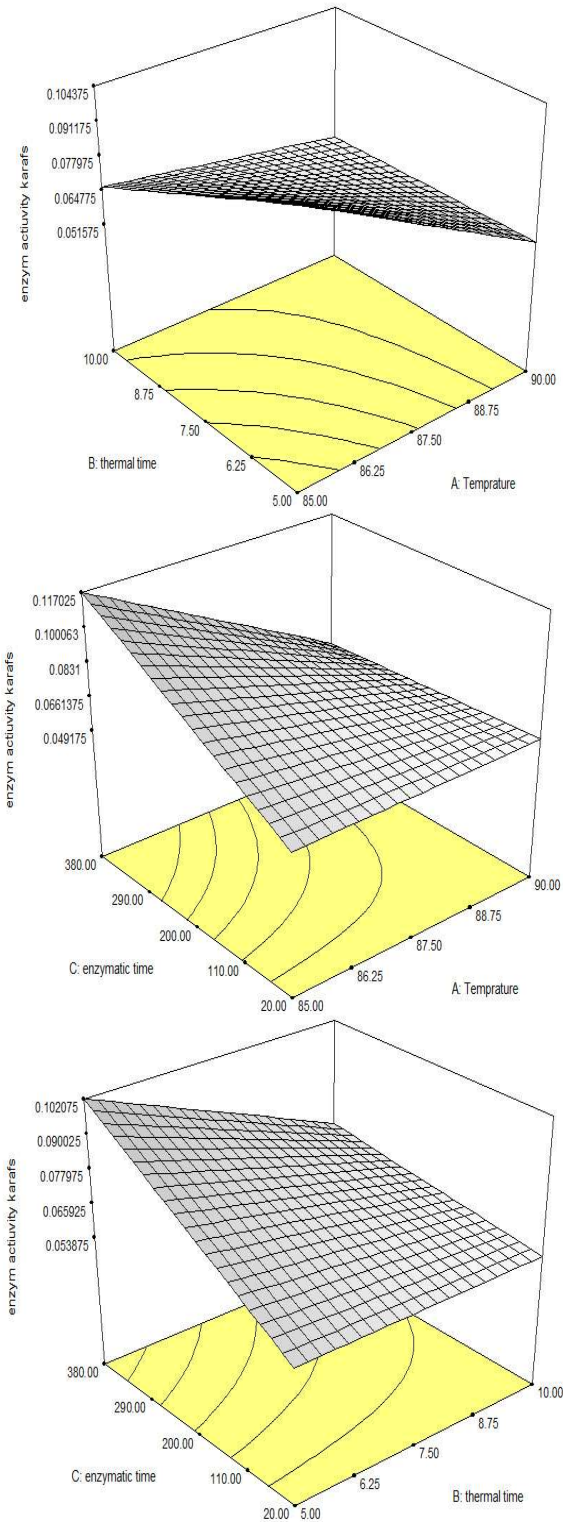

Fig 2 Response surface plot of the peroxidase enzyme activity in celery under effect of a) different blanching time and temperature (the time of enzyme activity 200 second) b) different blanching temperature and different enzyme activity time (blanching time of 7.5 minute) c) different blanching time and different enzyme activity time (blanching temperature of 87.5 ^{0}C)

جدول ۵ شرایط تعیین شده برای متغیرهای مستقل (جهت بهینه سازی غیر فعال سازی غیر حرارتی آنزیم پراکسیداز کرفس) و شرایط بهینه شده را نشان می دهد. متغیرهای مستقل (غلظت اسانس و زمان فعالیت آنزیمی) حداقل در نظر گرفته شده است. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان هدف فرآیند حداقل در نظر گرفته شده است. در فرآیند بهینه‌سازی به تمامی پارامترهای مستقل وزن و اهمیت یکسان داده شد. با توجه به شرایط مورد نظر راه حل‌های پیش‌بینی شده که براساس مطلوبیت در جدول ۵ مرتب شده است و هرچه مطلوبیت به ۱ نزدیک تر باشد مناسبترین و بهترین شرایط خواهد بود که راه حل اول به عنوان بهترین شرایط جهت دست‌یابی به شرایط بهینه در نظر گرفته شد (مطلوبیت ۰/۹٤۵).

۳-۲-۲- بهینه سازی غیر فعال سازی حرارتی فعالیت آنزیم پراکسیداز در کرفس

طرح آزمایشی با سطوح کدبندی شده‌ی متغیرهای مستقل و نتایج فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب اسپکتروفتومتر) مربوط به غیر فعال سازی حرارتی آنزیم پراکسیداز کرفس در جدول ٦ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی مربوط به غیر فعال سازی حرارتی آنزیم پراکسیداز کرفس به منظور انطباق مدل ریاضی و تعیین ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب به ترتیب در جدول ۷ ارائه شده‌است.

با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ۷)، مدل پیشنهادی زیر برای فعالیت آنزیم پراکسیدازکرفس تحت تاثیر تیمار حرارتی (Y) ارائه گردید:

$$Y= 0.069-0.017\ X_1 - 0.0096\ X_2 + 0.014X_3 + 0.009375\ (X_1 \times X_2) - 0.017\ (X_3 \times X_1) - 0.009375\ (X_3 \times X_2)$$

X_1 = دمای آنزیم بری، X_2 = زمان آنزیم بری، X_3= زمان فعالیت آنزیم

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

Table 5 optimization of different condition for inactivation of peroxidase enzyme activity in celery under effect of golpar essential oil

condition	goal	Lower limit	upper limit	upper Weight	Lower Weight	import ance	Optimum condition
Essential oil concentration	minimum	50 ppm	200 ppm	1	1	3	50
The time of enzyme activity	minimum	60 second	380 second	1	1	3	60
Peroxidase enzyme activity	minimum	0.276	1.503	1	1	3	0.467599

Table 6 Central composite design, coded levels of independent variables and actual level of peroxidase activity of crude extracts of celery under thermal blanching

Treatment number	Independent variables			Dependent variable (Response)
	Blanching (x_1) temperature	Blanching time (x_2)	The time of enzyme activity (x_3)	Enzyme activity (absorbance)
1	1	0	0	0.048
2	1	-1	-1	0.048
3	1	1	1	0.049
4	0	0	0	0.085
5	-1	0	0	0.075
6	1	-1	1	0.052
7	0	0	-1	0.074
8	0	0	0	0.069
9	-1	1	-1	0.049
10	0	0	0	0.074
11	0	1	0	0.049
12	0	0	0	0.069
13	1	0	1	0.052
14	0	-1	0	0.070
15	1	-1	1	0.156
16	1	1	1	0.084
17	0	0	0	0.072
18	1	1	-1	0.051
19	0	0	0	0.068
20	0	0	1	0.078

Table 7 Analysis variance of regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for predicting peroxidase enzyme activity in celery under effect of thermal blanching

Source	DF	Sum of squares	Mean of squares	F-Value	p-Value	Coefficient
Model	6	0.0096	0.0016	12.92	<0.0001	0.069**
X_1	1	0.003	0.0028	22.79	0.000٤	-0.017**
X_2	1	0.0009	0.0009	7.44	0.0172	-0.0096*
X_3	1	0.0021	0.0021	16.98	0.00١٢	0.014**
$X_1 \times X_2$	1	0.0007	0.0007	5.68	0.0331	0.009375*
$X_1 \times X_3$	1	0.0023	0.0023	18.94	0.0008	-0.017**
$X_2 \times X_3$	1	0.0007	0.0007	5.68	0.0331	-0.009375*
Residual	13	0.0016	0.0016			-
Lack of fit	8	0.0014	0.0001	4.34	0.0615	-
Pure error	5	0.0002	0.00004			-
Total	19	0.0112				

** significant at 1%, * significant at 5%, ns non significant

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه-ی اول به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضـرایب مـشخص مـی-باشد. R^2 =۰/۸٥٦٤ موید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل بـرازش شـده توانـسته ۸٥/٦٤ درصد از کل تغییرات در دامنه‌ی مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 واقعی و R^2 تعدیل شـده کـه بـه ترتیـب ۰/۸٥٦٤ و ۰/۷۹۰۱ به دست آمدند، بیانگر توصیف مناسـبی از پراکنـدگی داده‌ها بوده اند.

آزمون فقدان برازش نشان داد که مدل بر اساس فعالیت آنـزیم پراکسیداز کرفس (تحت تاثیر تیمار حرارتـی) بـرازش خـوبی داشته و مدل ایجاد شده توانسته است که تغییـرات داده هـا را به اندازه کافی توضیح دهد لذا این مـدل جهـت پـیش‌بینـی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.

در غیر فعال سازی حرارتی جهت تعیین شرایط بهینه‌ی هر متغیر در حصول پایین ترین فعالیت آنزیمی، نمودارهای سه-بعدی سطحی برای متغیرها در شکل ۲ ترسیم شده است.

همان‌طور که در شکل ۲ الف مشخص است فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) با افزایش دمای آنزیم‌بری روند نزولی داشته به طوریکه پایین ترین فعالیت مربوط به دمای ۹۰ درجه سانتی گراد و بالاترین فعالیت آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد. هر عاملی که به نحوی باعث تغییر جایگاه های فعال یا ماهیت پروتئینی آنزیم شود باعث غیر فعال سازی دائمی آنزیم می شود. تیمار حرارتی (آنزیم‌بری) به دلیل دناتوره کردن بخش پروتئینی آنزیم منجر به تغییر شکل آنزیم و جایگاه های فعال آن شده و در نتیجه غیر فعال سازی آنزیم را به دنبال دارد. همانطور که از شکل ۲ الف مشاهده می شود در دماهای پایین تر با افزایش زمان حرارت دهی فعالیت آنزیم پراکسیداز (جذب) افزایش می یابد که می تواند به علت فعال شدن آنزیم و رسیدن دمای محیط به دمای بهینه برای فعالیت آنزیم باشد اما در دماهای بالاتر روند برعکس می شود بطوریکه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد با افزایش زمان حرارت دهی از میزان فعالیت آنزیم (جذب) کاسته می شود [۱٤].

شکل ۲ ب نمودار سه بعدی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس در زمانهای مختلف فعالیت آنزیم و دماهای مختلف آنزیم‌بری (زمان آنزیم‌بری ۷/۵ دقیقه) را نشان می‌دهند. همانطور که مشاهده می‌شود در دمای ثابت با افزایش زمان فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد که نشان دهنده افزایش دسترسی آنزیم به سوبسترای لازم برای واکنش آنزیمی می‌باشد. این روند در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قابل توجه بوده درحالیکه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد از شدت افزایش فعالیت آنزیم کاسته می شود که می تواند ناشی از دناتوره شدن بخش پروتئینی آنزیم در اثر حرارت و غیر فعال شدن آنزیم باشد.

تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس در زمانهای مختلف فعالیت آنزیم و زمانهای مختلف آنزیم‌بری (دمای آنزیم‌بری ۸۷/۵ درجه سانتی گراد) در شکل ۲ ج ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود در زمان آنزیم‌بری ثابت با افزایش زمان فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم افزایش می یابد که در زمانهای اولیه آنزیم‌بری سرعت افزایش فعالیت آنزیم شدیدتر از زمانهای انتهایی آنزیم‌بری (۱۰ دقیقه) می باشد که می تواند به علت تاثیر دما در زمانهای طولانی حرارت دهی بر ساختار پروتئینی آنزیم پراکسیداز و غیر فعال سازی آن باشد. با افزایش زمان حرارت‌دهی از میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاسته شده به طوری که حتی زمان ۳۸۰ ثانیه هم جهت دسترسی آنزیم به سوبسترا کافی نبوده و فعالیت آنزیم روند ثابتی را طی کرده که در حقیقت می‌توان گفت آنزیم غیر فعال شده است.

جدول ۸ شرایط تعیین شده برای متغیرهای مستقل (جهت بهینه سازی غیر فعال سازی حرارتی آنزیم پراکسیداز کرفس) و شرایط بهینه شده را نشان می دهد. از آنجا که در فرآیندهای حرارتی به منظور حفظ مواد مغذی و ویتامین‌ها از فرآیند دمای بالا و زمان کوتاه (HTST) استفاده می شود تا حداقل خسارت تغذیه ای ایجاد شود، بنابراین همانطور که در جدول ۸ مشاهده می شود دمای آنزیم‌بری حداکثر و سایر متغیر های مستقل (زمان آنزیم‌بری و زمان فعالیت آنزیمی) حداقل در نظر گرفته شده است. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان هدف فرآیند حرارتی حداقل در نظر گرفته شده است. در فرآیند بهینه سازی به تمامی پارامترهای مستقل وزن و اهمیت یکسان داده شد. با توجه به شرایط مورد نظر ۸ راه حل پیش بینی شده که براساس مطلوبیت بهترین راه حل در جدول ۸ ارائه شده است و هرچه مطلوبیت به ۱ نزدیک تر باشد مناسبترین و بهترین شرایط خواهد بود که راه حل اول (با شرایط: دمای آنزیم‌بری ۹۰ درجه سانتی گراد، زمان آنزیم‌بری

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

۵ دقیقه و زمان فعالیت آنزیم ۲۰ ثانیه)به عنوان بهترین شرایط جهت دست یابی به شرایط بهینه در نظر گرفته شد. در صورت اعمال شرایط راه حل اول فعالیت آنزیم پراکسیداز برابر با مقدار ۰/۰٤٥٢٨١٥ می باشد (مطلوبیت ۱).

Table 8 optimization of different condition for thermal inactivation of peroxidase enzyme activity in celery

condition	goal	Lower limit	upper limit	upper Weight	Lower Weight	importance	Optimum condition
Blanching temperature	minimum	$85^{\circ}C$	$90^{\circ}C$	1	1	3	90
Blanching time	minimum	5 minute	10 minute	1	1	3	5
The time of enzyme activity	minimum	20 second	380 second	1	1	3	20
Peroxidase enzyme activity (absorbance)	minimum	0.048	0.156	1	1	3	0.0452815

٤- نتیجه‌گیری

این پژوهش در واقع مطالعه اولیه استفاده از برخی از ترکیبات طبیعی در جهت کاهش آنزیم های دخیل در شروع فساد میوه-ها و سبزیجات بود و در آینده نیاز به برآورد میزان غلظت مورد استفاده برای هر محصول و روشهای تسهیل کننده در کاربرد این ترکیبات می باشد. در واقع این تحقیق تلاشی برای بررسی امکان کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز به عنوان آنزیم مسئول سنتز اتیلن و فعال کننده آنزیم های پلی فنل اکسیداز با استفاده از اسانس های طبیعی بود که در شرایط برون زیست[6] انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی غلظت های استفاده شده اسانس گلپر (۵۰، ۱۲۵ و ppm ۲۰۰) بخوبی قادر به کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز کرفس هستند. همچنین بهترین شرایط جهت غیر فعالسازی این آنزیم در کرفس، در شرایط غلظت اسانس ppm ۵۰ و زمان فعالیت آنزیمی (مدت زمان تماس آنزیم و سوبسترا) ٦۰ ثانیه و بهترین شرایط مربوط به غیرفعالسازی حرارتی مربوط به شرایط دمای آنزیم بری ۹۰ درجه سانتی گراد در مدت ۵ دقیقه و زمان فعالیت آنزیم ۲۰ ثانیه بود.

۵- منابع

[1] Shahedi, M. and Kadivar, M. 1954. Principle of fruit and vegetable processing and preservation. Shahrekord University Publication, 318 p, [in Persian].

[2] Fatemi, H. 2007. Principle of food preservation technology. Sahami Enteshar Compani Publication, 2thed, 462 p, [in Persian].

[3] Nicoli, M. C., Anese, M. and Severini, C. 1994. Combined effects preventing enzymatic browning reactions in minimally processed fruits. Journal of Food Quality, 17, 221-229.

[4] Omidbigi, R. (2009). Medicinal plant production and processing. Astan Ghodse Razavi publisher, 5thed, 653 p, [in Persian].

[5] Cox, S. D., Mann, C. M. and Markham, J. L. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88, 170–175.

[6] Sikkema, J., de Bont, J. A. M. And Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews, 59, 201–222.

[7] Hemeda, H. M. and Klein, B. P. 1990. Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts. Journal of Food Science, 55, 184-186.

[8] Ponec, A. G., Del Valle, C. E. and Roura, S. I. 2004. Natural Essential Oil as Reducing Agents of Peroxidase Activity in Leafy Vegetable, LWT, 37, 199-204.

[9] Lee, H.C. and Klein, B. P. 1989. Evaluation of combined effects of heat treatment and antioxidant on peroxidase activity of crude extract of green peas, Food Chemistry, 32, 151-158.

[10] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escaleira, L.A. (2008). Response Surface Methodology (RSM) As a Tool For Optimization In Analytical Chemistry. Talanta. 76, 965–977.

[11] Daraei Garmakhany, A., Mirzai, H. O., Aghajani, N. and kashiri, M. 2010.

6. Invitro

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

Investigation of Natural Essential Oil Antioxidant Activity on Peroxidase Enzyme in Selected Vegetable. Journal of Agricultural Science and Technology, 4(3), 78-84.

[12] Shahabi Ghahfarrokhi, I, Daraei Garmakhany, A, Kashaninejad, M. and Dehghani. A. A. 2013. Estimation of Peroxidase Activity in Red Cabbage by Artificial Neural Network (ANN). Quality Assurance and Safety of Crops and Foods, 5(2), 163-167.

[13] Taheri, A. 2011. Antioxidative Properties of Rainbow Sardine (Dussumieria Acuta) Protein Hydrolysate: Optimization Using Response Surface Methodology. International Food Congress-Novel Approaches in Food Industry, MAY 26-29. Pp: 39-43.

[14] Kashaninejad, M. and Daraei Garmakhany, A. 2013 .Application of Essential Oils as Natural Antioxidant in Reduction of Peroxidase Enzyme Activity. Reported research at Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, [in Persian].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

Optimization of thermal blanching and the effect of Golpar essential oil on peroxidase enzyme activity of celery by response surface methodology

Aghajani, N. [1*]

1. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Bahar Faculty of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

(Received: 2016/08/23 Accepted: 2017/01/29)

Proxidase enzyme is one of the most important enzymes in plant tissues which can bind to hydrogen peroxide and produce an activated complex, therefore inactivation of the enzyme may increase the shelf life of raw and un-blanched frozen vegetables. Nowadays, consumer's trend has been oriented to use fresh products or foods prepared by little process, therefore producers are interested the ways to increase shelf life by use of alternative methods. In this study the effect of natural essential oil (Golpar oil) and thermal blanching on peroxidase enzyme activity were investigated and optimization of peroxidase enzyme inactivation was performed using response surface methodology. Results showed that peroxidase activity of celery extracts was affected by the essential oil and its activity was reduced. Optimum conditions for non-thermal inactivation of proxidase enzyme under effect of golpar oil were included Golpar concentration 50 ppm, the time of enzyme activity 60 second and enzyme activity (absorption) 0.467599. Optimum conditions for thermal inactivation of peroxidase enzyme of celery were included blanching temperature 90 ^{o}C, blanching time 5 minutes, the time of enzyme activity 20 second and enzyme activity (absorption) 0.0452815.

Keywords: Essential oil, Peroxidase enzyme activity, Optimization, Response surface methodology.

*Corresponding Author E-Mail Address: n.aghajani3862@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]