بررسی اثر آنزیم پکتیناز و فراصوت بر کیفیت و راندمان استخراج لیکوپن از گوجه فرنگی

سمیرا مهدوی طارونی[۱*]، علی معتمدزادگان[۲]، شبنم حمزه[۳]، سعید میرعرب رضی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی موسسه آموزش عالی تجن قائمشهر
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی موسسه آموزش عالی تجن قائمشهر
٤- دانشجوی دکتری صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(تاریخ دریافت: ۹٦/۰٦/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹٦/۱۰/۱۸)

چکیده

در این پژوهش به منظور افزایش راندمان و بررسی ویژگی‌های لیکوپن استحصالی، نمونه‌ها با دو تیمار فراصوت با قدرت ۱۰۰ وات در چهار زمان (صفر، ۲۰، ۳۰و ٤۰ دقیقه) و آنزیم پکتیناز در سه غلظت (۱، ۱/۵و ۲ درصد) پیش فراوری و سپس رنگدانه‌های لیکوپن با کمک حلال پترولیوم اتر- استون (نسبت ۱:۱) استخراج شدند. تیمار بهینه با نمونه استحصالی بدون استفاده از آنزیم و فراصوت مقایسه گردید. ویژگی‌های راندمان استخراج، ظرفیت آنتی اکسیدانی و شاخص های رنگی (b و a و L) اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای مورد استفاده و اثر متقابل آنها بر راندمان، ظرفیت آنتی اکسیدانی، شاخص a و نسبت a/b معنادار ($p<0.05$) و بر شاخص های L و b معنادار نبوده است. در کلیه شاخص‌های اندازه گیری شده، نمونه ۲ درصد آنزیم و ۳۰ دقیقه فراصوت بالاترین و نمونه شاهد (بدون آنزیم و فراصوت) پایین‌ترین امتیاز را به دست آورد. نمونه منتخب دارای راندمان استخراج (۷۰/۲۱ میلی گرم بر کیلوگرم)، ظرفیت آنتی اکسیدانی(۷۰/۲۰ درصد)، شاخص a (٤۵/۷۷) و نسبت a/b (۱/۳۳) و نمونه شاهد دارای راندمان استخراج (۲٦/۳۱ میلی گرم بر کیلوگرم)، ظرفیت آنتی اکسیدانی(٤۵/۵۳ درصد)، شاخص a (۳۰/۳۳) و نسبت a/b (۰/۸۷) بوده است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که به کمک آنزیم پکتیناز و پیش فراوری با فراصوت می‌توان راندمان استخراج و شاخص‌های کیفی لیکوپن استخراج شده را افزایش داد.

کلید واژگان: پکتیناز، فراصوت، لیکوپن.

* مسئول مکاتبات: samiramahdavi296@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۱- مقدمه

از نظر مصرف کنندگان مواد غذایی رنگ محصول بیانگر کیفیت آن است. به همین دلیل از رنگدانه‌های مختلفی در صنعت غذا استفاده می‌شود. اما امروزه به دلیل نگرانی‌ها از مصرف رنگ‌های سنتزی، توجه به استفاده از رنگدانه‌های طبیعی بیشتر شده است. در این بین کاروتنوئیدها به دلیل پراکندگی وسیعشان در منابع حیوانی و گیاهی و همچنین داشتن ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، کاربرد وسیعی در رنگدهی به مواد غذایی دارند. از مهم‌ترین کاروتنوئیدها می‌توان به لیکوپن[1] اشاره نمود [۱]. لیکوپن رنگدانه قرمز موجود در بسیاری از میوه‌ها و برخی سبزیجات بوده و یک کاروتنوئید با ۱۱ پیوند مزدوج و ۲ پیوند غیر مزدوج با وزن مولکولی ۵۳۶/۸۵ دالتون یک ترکیب چربی دوست[2] و نامحلول در آب است که به دلیل تعداد زیاد باندهای دوگانه مزدوج یکی از قوی‌ترین آنتی اکسیدان‌ها است [۲]. گوجه‌فرنگی از مهمترین منابع لیکوپن در طبیعت و منبع اصلی تولید این محصول در صنعت است. در صنعت تولید لیکوپن تکنیک‌های متعددی جهت استخراج بکار گرفته می‌شود که استفاده از حلال متداولترین می‌باشد. این روش کارایی بالا دارد ولی معایبی همچون هزینه بالا، مسائل ایمنی، انتشار ترکیبات آلی فرار به محیط را به همراه دارد که استفاده از روش‌های ترکیبی از روش‌های پیشنهادی پژوهشگران می‌باشد [۳]. در حال حاضر روش‌های استخراجی توسعه یافته برای لیکوپن، روی استفاده از سیال فوق بحرانی و استفاده از آنزیم تکیه دارند. همچنین استفاده از فراصوت[3] از جمله روش‌هایی است که توجه زیادی را به خود جلب کرده است [٤]. به دلیل پنهان بودن لیکوپن در درون ساختارهای غشایی کلروپلاست و دشواری حلال در نفوذ به بافت فشرده گوجه فرنگی و حل کردن رنگدانه لیکوپن، راندمان استخراج این رنگدانه از گوجه‌فرنگی پایین است به همین دلیل از آنجا که دیواره سلولی از سلولز و پکتین تشکیل شده است، می‌توان از آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی از قبیل سلولاز و پکتیناز برای افزایش بازیابی لیکوپن از گوجه‌فرنگی استفاده نمود [۵]. یکی از روش‌های جدید در زمینه استخراج استفاده از امواج فراصوت است. مکانیسم اصلی استخراج با امواج فراصوت به پدیده کاویتاسیون[4] مربوط می شود. فراصوت امواج مکانیکی است که فرکانس‌هایی بالاتر از شنوایی انسان، اما پایین‌تر از فرکانس‌های میکروویو (از۲۰ کیلوهرتز تا ۱۰ مگاهرتز) دارد. زمانی که یک موج صوتی از میان یک محیط الاستیک عبور می کند، باعث جابه جایی طولی ذرات شده، به عنوان یک پیستون در سطح محیط عمل کرده و در نتیجه یک توالی از انقباض و انبساط صورت می‌گیرد. که در نهایت باعث تولید حباب کاویتاسیونی شده که در نتیجه متلاشی شدن این حباب در طول چرخه انقباض انرژی زیادی آزاد شده که دیواره سلولی ماتریس گیاهی را پاره کرده و محتوای آن‌ها را در محیط آزاد خواهد کرد [٦]. استفاده از فراصوت مزایایی نسبت به سایر روش‌ها دارد ازجمله این مزایا: ساده بودن روش، بازدهی بیشتر و هزینه پایین‌تر است همچنین فراصوت می‌تواند دمای عملیاتی را کاهش دهد و امکان استخراج ترکیبات حساس به حرارت را فراهم سازد [۷]. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، استخراج لیکوپن به کمک روش آنزیم- فراصوت از گوجه فرنگی و مقایسه راندمان و کیفیت لیکوپن استخراج شده با روش متداول حلال است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده سازی نمونه

ابتدا نمونه‌های گوجه فرنگی با واریته Matin (با درجه رسیدگی کامل، وزن متوسط ۱٦۰ گرم و برداشت شده از مزارع تاکستان قزوین در نیمه دوم شهریور) خریداری و به خوبی شسته شدند. سپس نمونه‌ها توسط مخلوط‌کن خانگی (BH-703 W/S، چین، فرکانس ۵۰ هرتز و توان ٤۰۰ وات) هموژن شدند [۵]. نمونه‌های هموژن شده گوجه‌فرنگی در نایلون‌های زیپ‌دار بسته بندی شدند و تا زمان انجام آزمون در فریزر (دمای ۱۸- درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. برای هر بار آزمایش نمونه‌های گوجه فرنگی در دمای محیط یخ زدایی شدند [۸].

۲-۲- استخراج لیکوپن به روش آنزیم و فراصوت

مقدار ۲۰۰ گرم از نمونه گوجه فرنگی برای هر تیمار توسط ترازو دیجیتال (مدل PA4102، سوئیس) وزن شده و آنزیم

1. Lycopene
2. Lipophilic
3. ultrasound
4. cavitation

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

پکتیناز (تهیه شده از شرکت سیگما با فعالیت ۱u/mg و ٤-٥ pH = بهینه) به صورت وزنی/ وزنی (۱، ۱/٥و ۲ درصد) به نمونه‌ها اضافه شد. pH گوجه به کمک pH متر (Saritarious, PB11، ژاپن) اندازه گیری شد که در محدوده pH بهینه آنزیم بود. بعد از آن نمونه‌های آنزیم‌زنی‌شده در ٥٠ درجه سانتیگراد به مدت زمان ۲۰ دقیقه (با توجه به شرکت سازنده آنزیم) گرمخانه‌گذاری شدند. آماده سازی نمونه‌های آنزیم-فراصوت همانند استخراج با آنزیم بود با این تفاوت که پس از اضافه کردن آنزیم به نمونه‌ها، تیمارها تحت امواج فراصوت در دمای محیط قرار گرفتند. برای ایجاد امواج فراصوت از یک حمام فراصوت (مدل DSA100 -SK2- 4.0L، ساخت کره) با توان تولیدی ۱۰۰ وات و بسامد ثابت ٤٠ کیلوهرتز استفاده گردید. بعد از آن نمونه‌های فراصوت‌دهی شده در دمای ٥٠ درجه سانتی گراد به مدت زمان ۲۰ دقیقه گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد جهت استخراج با حلال، تیمارها در آون (فن آزماگستر GM55 ، ایران) در دمای ٤٥ درجه سانتیگراد به مدت ٢٤ ساعت خشک شدند. سپس نمونه‌های خشک شده با نسبت ۱ به ۱۰ حلال (استون / پترولیوم اتر با نسبت ۱:۱) مخلوط شده و تحت شرایط تاریک به قیف دکانتور منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد و پس از ۲۰ دقیقه توقف، فاز فوقانی حاوی لیکوپن جدا شده و فیلتراسیون عصاره از طریق کاغذ صافی واتمن صورت گرفت [٤]. بعد از عبور نمونه‌ها از کاغذ صافی، مخلوط حلال و لیکوپن جهت حذف حلال به دستگاه روتاری اواپراتور(IKA, RV05 Basic، ساخت آلمان) منتقل و توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلأ در دمای ٤٠°C و ٥٠ دور بر دقیقه تغلیظ شد. برای حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت پخش گردید و تا زمان خشک شدن کامل در دمای محیط در زیر هود قرار داده شد سپس درب پلیت را گذاشته و برای جلوگیری از نفوذ نور به طور کامل با فویل آلومینیومی پوشانده شد و نمونه‌ها تا انجام آزمون‌های بعدی در یخچال در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد [۹]. جهت تعیین مقدار غلظت لیکوپن، نمونه‌های خشک شده با نسبت ۱ به ۱۰ حلال (استون / پترولیوم اتر با نسبت ۱:۱) مخلوط شده و ۲ میلی لیتر عصاره به سل دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-2100، ساخت آمریکا) منتقل و جذب در طول موج ٥٠٣ نانومتر مشاهده شد [۸] .

۲-۳- استخراج لیکوپن به روش حلال

کلیه مراحل مانند تیمارهای اصلی بود با این تفاوت که نمونه‌ها ابتدا خشک شده و سپس بدون استفاده از آنزیم و فراصوت مورد استخراج با حلال قرار گرفتند [۸].

۲-٤- محاسبه مقدار لیکوپن

برای این منظور از منحنی کالیبراسیون استفاده شد. به اینصورت است که از لیکوپن استاندارد تهیه شده از شرکت سیگما غلظت‌های ۰ تا ۲۰۰ppm تهیه شد. سپس جذب هریک از این غلظت‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٠٣nm تعیین شد و توسط نرم افزار EXCEL، منحنی جذب بر حسب غلظت و معادله ی خط زیر (رابطه ۱) بدست آمد [۸].

$$Y = ۰/۰۰٦٤x + ۰/۰۰۸٤ \quad ، \quad R^2 = ۰/ ۹۹۹۳$$

۲-٥- تعیین راندمان استخراج

ابتدا با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله منحنی لیکوپن، غلظت لیکوپن در نمونه مجهول بر حسب ppm (میکروگرم بر میلی لیتر) محاسبه شد. سپس مقدار لیکوپن موجود در ۱۰۰ گرم گوجه‌فرنگی طبق فرمول زیر (رابطه ۲) محاسبه شد. جهت انجام محاسبات بعدی مقدار لیکوپن بر حسب میلی‌گرم محاسبه شد [۹].

$$\text{Lycopene total mass } (\mu g) = (C \times V) \quad (۲)$$

V = حجم حلال مصرفی (ml) ، C = غلظت لیکوپن (µg/ml). سپس راندمان استخراج لیکوپن بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم گوجه فرنگی تازه براساس فرمول زیر (رابطه ۳) محاسبه شد:

$$\text{Yield (mg/kg)} = \text{Lycopene total mass/Wt} * 1000 \quad (۳)$$

که در آن Lycopene total mass = مقدار لیکوپن موجود در نمونه بر حسب میلی‌گرم (mg)، Wt =وزن گوجه فرنگی تازه بر حسب گرم (g) است [۹].

۲-٦- اندازه گیری رنگ

برای این منظور در ابتدا نمونه لیکوپن در هر تیمار به مقدار ۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ سی‌سی حلال (پترولیوم اتر / استون با نسبت ۱:۱) حل شد. شاخص‌های رنگ a*,b*,L* به‌طور مستقیم از دستگاه رنگ‌سنج هانترلب (ColorFlex ، آمریکا) به دست آمدند [۱۰].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۲-۷- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا ۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌های استخراج شده با ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۱Mm) مخلوط و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و شرایط تاریک نگهداری شدند. در نهایت میزان جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه گیری و فعالیت خنثی کنندگی رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر (رابطه ٤) بر حسب درصد محاسبه شد [۸]:

فعالیت خنثی کنندگی = (Ac-As)/Ac*100

که در آن Ac = جذب کنترل، As = جذب نمونه است.

۲-۸- طرح آماری

آزمایش‌ها به صورت طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شدند. میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ($p<0.05$) مقایسه شدند. آنالیز داده‌ها و مقایسات میانگین توسط نرم افزار SPSSانجام شده و نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم گردیدند.

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد اثر سطوح آنزیم (۱، ۱/۵ و ۲ درصد) و زمان فراصوت (صفر، ۲۰، ۳۰ و ٤٠ دقیقه) و اثر متقابل آنها بر میزان راندمان استخراج لیکوپن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پارامتر a و a/b حاصل از رنگ سنجی عصاره لیکوپن معنادار و بر پارامتر L و b معنادار نبود (جدول۱).

Table 1 Analysis of variance (ANOVA), comparison of extraction yield and quality of lycopene extracted by the enzyme and the enzyme-ultrasound treatment

Source	df	Mean Square					
		Antioxidant	Yield	L	a	b	a/b
Enzyme	2	22.277*	369.028*	1.229ns	21.334*	0.071ns	0.017*
Time	3	197.558*	1104.034*	5.249ns	152.879*	0.106ns	0.126*
Enzyme * Time	6	0.487*	7.835*	0.869ns	1.023*	0.019ns	0.001*
Error	24	0.156	0.539	2.737	0.137	0.52	0.000
Total	36	-	-	-	-	-	-

ns: non-significant, *: significant in 5% level

۳-۱- تاثیر سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت بر راندمان استخراج لیکوپن

بر طبق نتایج حاصل از آنالیز واریانس، اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت و اثر متقابل آنها بر میزان راندمان استخراج لیکوپن از گوجه‌فرنگی معنادار بود (جدول ۱). نتایج بررسی اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت نشان داد که با افزایش سطح آنزیم، میزان راندمان به صورت معناداری افزایش یافت و با اعمال فراصوت تا ۳۰ دقیقه میزان راندمان افزایش یافته و سپس با گذشت زمان میزان راندمان استخراج لیکوپن کاهش یافت. علت افزایش راندمان با افزایش سطح آنزیم را می توان اینگونه توجیه کرد که با افزودن آنزیم پکتیناز پکتین موجود در گوجه فرنگی هیدرولیز می‌گردد در نتیجه بخشی از لیکوپنی را که در ساختار سه بعدی خود محبوس کرده بود، آزاد می‌کند. پس لیکوپن بیشتری در دسترس حلال استخراج کننده قرار گرفته و لیکوپن بیشتری استحصال می‌گردد [۱۰]. نتایج این بخش با پژوهش انجام شده توسط باقری و همکاران (۱۳۹٤) جهت بهینه سازی استخراج رنگدانه‌های کاروتنوئیدی از گوجه فرنگی با استفاده از آنزیم صنعتی همی سلولاز مطابقت داشت. نتایج نشان داد که با افزایش میزان غلظت آنزیم میزان غلظت رنگدانه افزایش یافت [۱۱]. علت افزایش راندمان استخراج با افزایش زمان فراصوت تا ۳۰ دقیقه به پدیده کاویتاسیون مربوط می شود که طی آن حباب‌های بسیار ریزی در توده مایع تشکیل شده و به سرعت تا یک اندازه بحرانی رشد می کنند و سپس منفجر می‌گردند. هنگامی که حباب کاویتاسیون تولید شده نزدیک به سطح موادگیاهی متلاشی می‌شود و میکروجت را به طور مستقیم به سطح وارد می کند فشار و دمای بالای به کار گرفته شده در این فرایند، دیواره‌های سلولی ماتریس گیاهی را پاره کرده و باعث تخریب آن می‌گردد که در نهایت محتوای آنها را در محیط آزاد خواهد کرد [٦]. از طرفی نتایج نشان داد که راندمان استخراج بعد از گذشت ۳۰ دقیقه کاهش یافت. محققان

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

مختلفی نیز روند مشابهی در استخراج به کمک فراصوت گزارش نمودند و آن را به تخریب ساختار با افزایش زمان نسبت داده و زمان کوتاه را برای استخراج پیشنهاد نمودند [۱۲]. این نتایج با پژوهش انجام شده توسط Xu وهمکاران (۲۰۱۳) برای استخراج لیکوپن از گریپ فروت به کمک فراصوت مطابقت داشت. آنها در این پژوهش به بررسی اثر فاکتورهای مختلف فراصوت بر استخراج لیکوپن پرداختند. نتایج این پژوهش نشان داد افزایش زمان فراصوت تا ۳۰ دقیقه اول باعث افزایش راندمان استخراج لیکوپن شده اما با افزایش زمان از ۳۰ به ۹۰ دقیقه راندمان استخراج لیکوپن کاهش یافت. در واقع با طولانی تر شدن زمان فراصوت به علت ایزومریزاسیون لیکوپن تمام ترانس و تخریب ساختار لیکوپن راندمان استخراج لیکوپن کاهش می‌یابد. همچنین رادیکال‌های هیدروکسیل تولید شده به کمک کاویتاسیون نیز می‌تواند بر ساختار لیکوپن تاثیر گذار باشد [۱۳]. بررسی اثر متقابل سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت بر میزان راندمان استخراج نشان داد در نمونه‌هایی که با ۱ و ۱/۵ درصد آنزیم استخراج شدند، با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه میزان راندمان به صورت معناداری افزایش یافت و بین میزان راندمان استخراج بعد از ۳۰ و ۴۰ دقیقه تفاوت معناداری مشاهده نشد و بالاترین میزان استخراج در زمان ۳۰ دقیقه به دست آمد. در نمونه‌هایی که با ۲ درصد آنزیم استخراج شدند با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه راندمان به صورت معناداری افزایش و بعد از آن با گذشت زمان تا ۴۰ دقیقه به صورت معناداری کاهش یافت (شکل ۱).

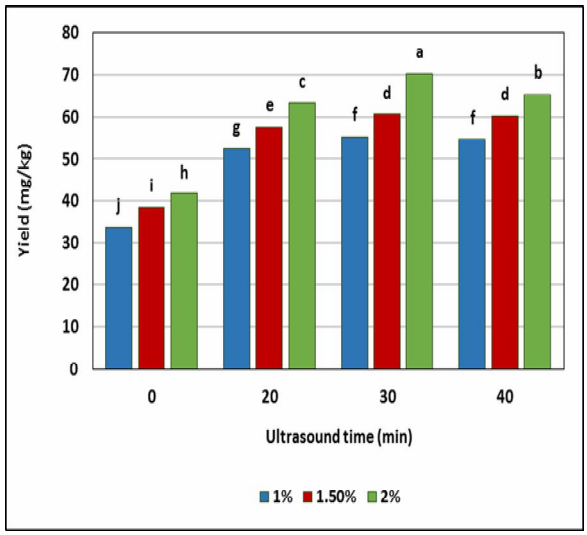

Fig 1 Effect of ultrasound time and enzyme concentration on extraction yield

بررسی اثر متقابل سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت بر راندمان استخراج لیکوپن نشان داد در مجموع راندمان استخراج لیکوپن در هر سه زمان فراصوت نسبت به حالت فراصوت نشده (آنزیمی) بیشتر می‌باشد که این نشان دهنده اثرمثبت فراصوت بر روی راندمان استخراج می‌باشد. در اثر متقابل آنزیم و فراصوت، فراصوت به مقدار زیادی دسترسی آنزیم را به سطح سوبسترا افزایش می‌دهد و سبب تشدید فرایند استخراج توسط آنزیم می‌شود [٤]. این نتایج با نتایج پژوهش Konwarh و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت. آنها به مقایسه سه روش آنزیم – فراصوت، آنزیم و حلال پرداختند. نتایج نشان داد انفجار سریع حباب‌های کاویتاسیون باعث تولید نیروی برشی زیادی در مایع در اطراف حباب‌ها می‌شود بنابراین انفجار حباب‌های کاویتاسیون، دسترسی آنزیم (سلولاز) را به سطح سوبسترا افزایش می‌دهد و در نهایت باعث افزایش راندمان استخراج لیکوپن از گوجه فرنگی می‌شود [٤].

۳-۲- تاثیر سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت بر فعالیت آنتی اکسیدانی لیکوپن

بر طبق نتایج حاصل از آنالیز واریانس، اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت و اثر متقابل آنها بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنادار بود (جدول ۱). نتایج بررسی اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت نشان داد با افزایش سطح آنزیم، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت معناداری افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد با اعمال فراصوت تا ۳۰ دقیقه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش و بعد از آن با گذشت زمان میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت. علت افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش آنزیم را می‌توان اینگونه توجیه کرد که آنزیم‌ها باعث پلیمریزه شدن پکتین و شکسته شدن ساختار آن از طریق هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی می‌شوند. در اثر شکسته شدن این پیوندها ترکیباتی که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند استخراج می‌گردند و سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی لیکوپن استخراجی می‌شود [۱۰]. نتایج این بخش با نتایج پژوهش انجام شده توسط دولت آبادی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی تاثیر غلظت آنزیم و زمان گرمخانه گذاری بر میزان استخراج لیکوپن از تفاله گوجه فرنگی مطابقت داشت. بر طبق نتایج، افزایش غلظت آنزیم از ۳۰ به ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منجر به افزایش فعالیت رادیکال گیرندگی عصاره شد [۸]. علت افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش زمان فراصوت تا ۳۰ دقیقه، فرکانس‌هایی است که سبب شکسته شدن بافت و خروج هر چه بیشتر لیکوپن می-

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

شود. نتایج بدست آمده بیانگر کاهش در میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی با افزایش زمان از ۳۰ به ٤٠ دقیقه می‌باشد. با طولانی تر شدن زمان فراصوت رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط فرایند کاویتاسیون مانند رادیکال‌های هیدروکسیل باعث افت توانایی آنتی اکسیدانی لیکوپن می‌شود [١٤]. فیاض مهر و آصفی (١٣٩١) تحقیقی را به منظور بررسی تاثیر امواج فراصوت بر مقدار و ظرفیت آنتی اکسیدانی لیکوپن استخراج شده از تفاله گوجه فرنگی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که طولانی‌تر شدن زمان فراصوت دهی باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌شود [٨]. بررسی اثر متقابل سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت نشان داد که در نمونه هایی که با ١ و ٢ درصد آنزیم استخراج شدند، با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه به صورت معناداری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت ولی بین زمان ۳۰ و ٤٠ دقیقه تفاوت معناداری نبود. در نمونه‌هایی که تحت فراصوت قرار نگرفتند با افزایش غلظت آنزیم از ١ به ١/٥ درصد تفاوت معناداری در مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده نشد. ولی در سایر نمونه ها با افزایش غلظت آنزیم میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت (شکل ٢).

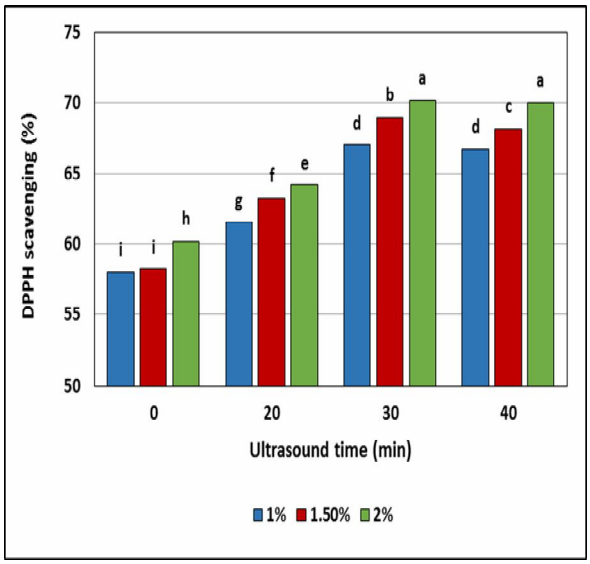

Fig 2 Effect of ultrasound time and enzyme concentration on antioxidant activity (DPPH scavenging activity)

نتایج نشان داد که در مجموع ظرفیت آنتی اکسیدانی در هر سه زمان فراصوت نسبت به حالت فراصوت نشده (آنزیمی) بیشتر می‌باشد که این نشان دهنده اثرمثبت فراصوت بر روی ظرفیت آنتی اکسیدانی می‌باشد. در اثر متقابل آنزیم و فراصوت، فراصوت اثر آنزیم‌ها را در بالابردن عملکردشان بیشتر می‌کند، در نتیجه بعضی از ترکیبات که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند مانند ویتامین ث و توکوفرول‌ها آزاد می‌شود. از طرفی با هیدرولیز شدن پکتین، ساختار آن تجزیه شده و برخی دیگر از رنگدانه‌هایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی که در ساختار پکتین وجود داشتند آزاد می‌گردند [٩و ٤]. این نتایج با نتایج کانوار و همکاران به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی لیکوپن به روش DPPH در تیمارهای آنزیمی و آنزیم – فراصوت مطابقت داشت. که بر طبق این نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی تیمار آنزیمی ۳۷/٥ درصد و تیمار آنزیم – فراصوت ۳۸/۲ درصد بود. که نشان دهنده افزایش فعالیت زیستی و پتانسیل جذب رادیکال آزاد لیکوپن استخراجی از پوست گوجه فرنگی با استفاده از روش ترکیبی آنزیم – فراصوت نسبت به تیمارهای آنزیمی است [٤].

۳-۳- تاثیر سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت بر پارامترهای حاصل از رنگ سنجی

بر طبق نتایج حاصل از آنالیز واریانس، اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت و اثر متقابل آنها بر میزان پارامتر a* معنادار بود (جدول ١). نتایج نشان داد که با افزایش سطح آنزیم، پارامتر a* به صورت معناداری افزایش یافت. در اثر اعمال فراصوت و با گذشت زمان میزان پارامتر a* به صورت معناداری افزایش یافت که این افزایش تا ۳۰ دقیقه ادامه و بعد از آن با گذشت زمان از ۳۰ به ٤٠ دقیقه میزان پارامتر a* کاهش معناداری یافت. علت این امر را می توان این گونه توجیه کرد که با افزودن آنزیم پکتیناز پکتین موجود در گوجه فرنگی هیدرولیز می‌گردد در نتیجه بخشی از لیکوپنی را که در ساختار سه بعدی خود محبوس کرده بود، آزاد می‌کند. پس لیکوپن بیشتری در دسترس حلال استخراج کننده قرار گرفته و میزان لیکوپن بیشتری استحصال می‌گردد. از آنجا که که لیکوپن یک رنگدانه قرمز رنگ است و چون پارامتر a* صفت قرمزی رنگ یک نمونه را نشان می‌دهد، بنابراین با افزایش مقدار لیکوپن پارامتر a* نیز افزایش خواهد یافت [٩]. با گذشت زمان فراصوت تا ۳۰ دقیقه امواج فراصوت با ایجاد پدیده حفرگی باعث استخراج هرچه بیشتر لیکوپن و در نتیجه افزایش پارامتر a* می‌گردد. با طولانی‌تر شدن زمان فراصوت به علت ایزومریزاسیون و تخریب ساختار لیکوپن و در نتیجه کاهش راندمان استخراج لیکوپن، میزان این رنگدانه کمتر شده و این پارامتر نیز کمتر می‌گردد [١٥]. اثر متقابل آنزیم و زمان

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

فراصوت بر پارامتر a* نشان داد در تمامی تیمارها با به جز نمونه هایی که با ۲ درصد آنزیم استخراج شدند، با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه به صورت معناداری پارامتر a* افزایش و بعد از آن با گذشت زمان تا ٤٠ دقیقه به صورت معناداری کاهش یافت. اما در نمونه هایی که با ۲ درصد آنزیم استخراج شدند، با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه به صورت معناداری پارامتر a* افزایش یافت ولی بین زمان ۳۰ و ٤٠ دقیقه تفاوت معناداری نبود. همچنین در تمامی تیمارها به جز نمونه ای که ۳۰ دقیقه تحت تاثیر فراصوت بود، با افزایش غلظت آنزیم میزان پارامتر a* افزایش یافت. اما در نمونه هایی که ۳۰ دقیقه تحت تاثیر فراصوت بودند، بین تیمار ۱ و ۱/۵ درصد تفاوت معناداری نبود (شکل۳).

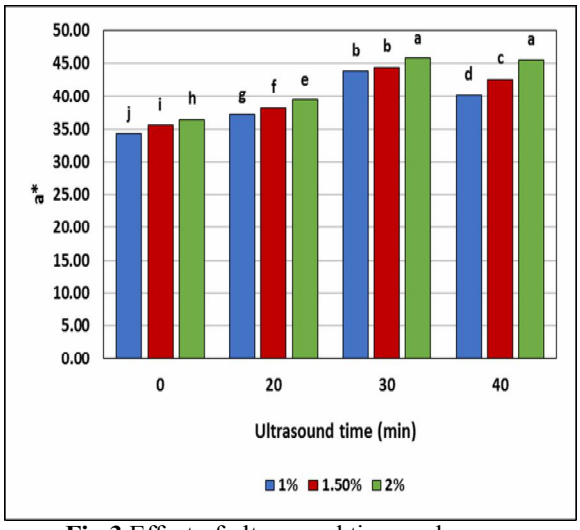

Fig 3 Effect of ultrasound time and enzyme concentration on the a* value

بررسی اثر متقابل سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت بر میزان پارامتر a* نشان داد میزان پارامتر a* در در هر سه زمان فراصوت نسبت به حالت فراصوت نشده (آنزیمی) بیشتر می‌باشد. علت این امر را اینگونه می توان توجیه کرد که در اثر متقابل آنزیم و فراصوت، فراصوت اثر آنزیم ها را در بالابردن عملکردشان بیشتر می‌کند و باعث استخراج هرچه بیشتر رنگدانه قرمز رنگ لیکوپن می‌گردد هر چه میزان استخراج لیکوپن بیشتر گردد پارامتر a* هم بیشتر می‌شود [٤]. بر طبق نتایج، اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت و اثر متقابل آنها بر میزان پارامتر b* و L* معنادار نبود اما بر میزان تغییرات فاکتور a/b معنادار بود (جدول ۱). نسبت a/b فاکتوری است که نشان دهنده کیفیت و میزان محتوای لیکوپن است. هر چقدر این فاکتور بالاتر باشد رنگ به قرمزی بیشتر می‌گراید [١٦]. نتایج بررسی اثر ساده سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت نشان داد که با افزایش سطح آنزیم، میزان این فاکتور به صورت معناداری افزایش یافت. تغییرات فاکتور a/b عصاره لیکوپن در اثر اعمال فراصوت طی گذشت زمان نشان داد که با اعمال فراصوت تا ۳۰ دقیقه میزان فاکتور a/b افزایش و بعد از آن با گذشت زمان میزان فاکتور a/b لیکوپن کاهش یافت. با افزایش غلظت آنزیم به دلیل تخریب بیشتر پکتین میزان راندمان استخراج لیکوپن افزایش می‌یابد. با افزایش میزان رنگدانه قرمز رنگ لیکوپن فاکتور a* نیز افزایش می‌یابد. از طرفی افزایش غلظت آنزیم بر شاخص a* اثر معنادار دارد ولی بر روی شاخص b* اثر معنادار ندارد. بنابراین با افزایش غلظت آنزیم نسبت a/b افزایش می‌یابد. افزایش نسبت a/b با افزایش زمان فراصوت تا ۳۰ دقیقه به این دلیل است که انفجار حباب‌های کاویتاسیونی در اثر پدیده کاویتاسیون نزدیک به سطح موادگیاهی دیواره های سلولی ماتریس گیاهی را تخریب و در نهایت محتوای آن ها را در محیط آزاد خواهد کرد [٦]. درنتیجه میزان راندمان استخراج لیکوپن و میزان فاکتور a* افزایش می‌یابد و از طرفی بر فاکتور b* اثری ندارد. با طولانی تر شدن زمان فراصوت تا زمان ٤٠ دقیقه این نسبت در نتیجه ایزومریزاسیون لیکوپن تمام ترانس و تخریب ساختار لیکوپن کاهش یافت [١٥]. اثر متقابل سطح آنزیم و زمان فراصوت بر فاکتور a/b از گوجه فرنگی نشان داد در تمامی تیمارها به جز نمونه‌هایی که با ۲ درصد آنزیم استخراج شدند با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه میزان فاکتور a/b به صورت معناداری افزایش یافت و و بعد از آن با گذشت زمان تا ٤٠ دقیقه به صورت معناداری کاهش یافت. اما در نمونه هایی که با ۲ درصد آنزیم استخراج شدند این فاکتور با گذشت زمان تا ۳۰ دقیقه به صورت معناداری افزایش یافت اما بین زمان ۳۰ و ٤٠ دقیقه تفاوت معناداری نبود. در نمونه های بدون فراصوت دهی با افزایش غلظت آنزیم از ۱/۵ به ۲ درصد تفاوت معناداری در مقدار a/b مشاهده نشد. همچنین در نمونه هایی که ۲۰ و ۳۰ دقیقه تحت فراصوت بودند با افزایش غلظت آنزیم از ۱ به ۱/۵ درصد تفاوت معناداری مشاهده نشد (شکل٤).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

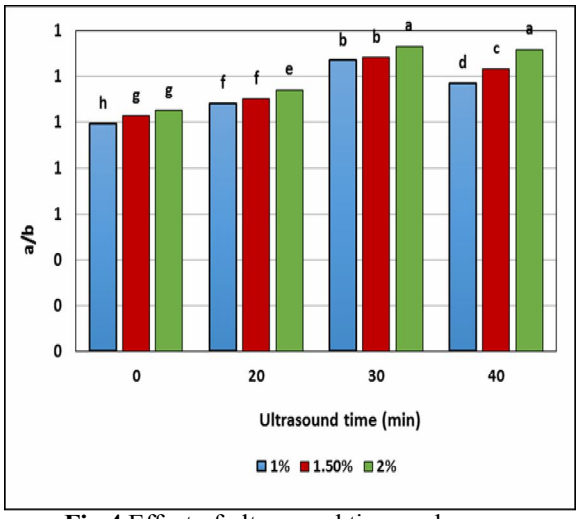

Fig 4 Effect of ultrasound time and enzyme concentration on the a/b value

بررسی اثر متقابل سطوح مختلف آنزیم و زمان فراصوت نشان داد که به دلیل تخریب دیواره سلولی به کمک آنزیم و پدیده کاویتاسیونی فراصوت و نقش کمک کننده فراصوت در فرایند استخراج به کمک آنزیم، بیشترین نسبت a/b مربوط به تیمار آنزیم- فراصوت (زمان ۳۰ دقیقه) است.

۳-۳- مقایسه دو روش آنزیم – فراصوت و حلال

مقایسه دو روش حلال و آنزیم-فراصوت نشان داد که راندمان استخراج، ظرفیت آنتی اکسیدانی و پارامتر a* و a/b عصاره حاصل از استخراج به طور معناداری نسبت به روش حلال بیشتر است اما تاثیر معناداری بر پارامتر L* و b* نداشت (شکل۵). ترکیب دو روش استخراج به کمک فراصوت و استخراج آنزیمی باعث بالا رفتن این پارامترها به دلیل خروج هرچه بیشتر لیکوپن و به دنبال آن افزایش راندمان و افزایش سایر موارد است. در واقع آنزیم سبب افزایش استخراج می‌گردد و از سوی دیگر هم اعمال فراصوت سبب افزایش استخراج و تشدید فرایند استخراج توسط آنزیم می‌شود [٤]. Li و همکاران (۲۰۱٤) ، پژوهشی را جهت استخراج لیکوپن از پاپایا به کمک فراصوت انجام دادند. در این پژوهش جهت استخراج از سه روش: فراصوت، حلال و سوکسله استفاده شد. نتایج پژوهش نشان داد فراصوت روشی موثر برای افزایش راندمان استخراج لیکوپن نسبت به دو روش دیگر است [۱۷].

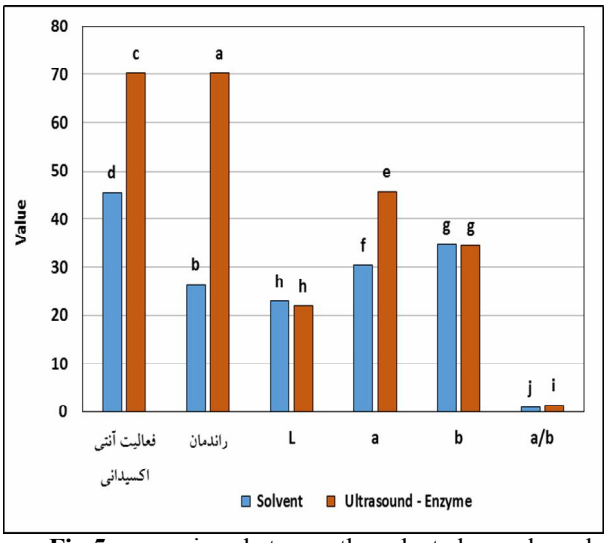

Fig 5 comparison between the selected sample and blank

٤- نتیجه گیری

جایگزین نمودن لیکوپن به عنوان عامل رنگ دهنده به جای رنگ‌های مصنوعی به کار رفته در مواد غذایی که تهدیدی برای سلامتی مصرف کنندگان آنها محسوب می شود، دارای اهمیت فراوانی است در این تحقیق دو متغیر زمان فراصوت و غلظت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون‌های انجام شده تحت تاثیر فراصوت با آزمون‌های بدون تاثیر فراصوت مقایسه شد و نتایج نشان داد که در صورت به کار گیری فراصوت میزان راندمان استخراج لیکوپن، ظرفیت آنتی اکسیدانی، پارامتر a* (معرف رنگ قرمز رنگدانه) و نسبت a/b افزایش می‌یابد. بنابراین فراصوت یک روش موثر در استخراج لیکوپن از گوجه فرنگی است.

٥- منابع

[1] Ranjbar, A., Maghsoudlou, Y., Ghorbani, M. and Sadeghi Mahounak, A.R. 2012. The role of ethanol treatment and pectinase enzyme on the yield of lycopene extraction from waste of tomato processing industry. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 8 (1), 9-15.

[2] Shi, J., Memaguer, M. 2000. Lycopene in tomato; chemical and physical properties affected by food processing. Critical review in food science and nutrition, 40, 1-42.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

[3] Fayyazmehr, B. and Asefi, N. 2012. Effect of ultrasound waves on amount and antioxidant capacity of extracted lycopene from tomato residue. Journal of food research, 22 (3), 241-248.

[4] Konwarh, R., Pramanik, S., Kalita, D., Lata Mahanta, CH. and Karak, N. 2012. Ultrasonication – A complementary 'green chemistry' tool to biocatalysis: A laboratory-scale study of lycopene extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 19, 292–299.

[5] Choudhari, S. M. and Ananthanarayan, L. 2006. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. Food chemistry, 102, 77-81.

[6] Chemat, F . Zill-e-Huma, Kamran Khan, M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry, 18, 813–835.

[7] Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principlws from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8, 303-313.

[8] Dolat abadi, Z., Elhami Rad, A.H., Akhlaghi Feyzabad, H. and Steiri, H. 2016. Investigating the effect of enzyme concentration and incubation time on the amount of lycopene from tomato pulp. The Journal of Food Science and Technology, 8 (3), 25-31.

[9] Haroon, S. 2014. Extraction of Lycopene from Tomato Paste and its Immobilization for Controlled Release. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters of Science in Material & Processing Engineering. The University of Waikato.

[10] Saberi, S. 2015. Investigation of the Effect of Pectinase and Solvent Type on Extraction Efficiency and Quality Characteristics of Tomato Lycopene. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters of Science in Agriculture Engineering food Science & Technology. Sari Agricultural Science and Natural Resource University.

[11] Bagheri, R., Ghadi, A. and Jalaliyan, M. 2015. Optimization of Carotenoid Pigment Extraction from Tomato Using Hemicellulase Industrial Enzyme. Twenty-third National Congress of Iranian Food Science and Technology, Mashhad, Iran.

[12] Zhao, S., Kwok, K.C. and Liang, H. 2007. Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from Radix Bupleuri. Separation and Purification Technology, 55, 307-312.

[13] Xu, Y. and Pan, S. 2013. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (Citrus paradise Macf.). Ultrason. Sonochem, 20, 1026-1032.

[14] Lianfu, Z. and Zelong, L. 2008. Optimization and comparison of ultrasound/ microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. Ultrason Sonochem, 15, 731–737.

[15] Liao, Jianqing., Zheng, Nan. and Qu, Baida. 2016. An Improved Ultrasonic-Assisted Extraction Method by Optimizing the Ultrasonic Frequency for Enhancing the Extraction Efficiency of Lycopene from Tomatoes Food Anal, Methods, 9, 2288–2298.

[16] Akbari, A., Shahedi, M., Hamdami, N., Dokhani, SH. and Sadeghi, M. 2009. The kinetics of moisture loss and comparison of the quality of tomato leaves in the drying stage were carried out using three methods: solar drying, traditional sunshine and dry air. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 2 (47), 445-459.

[17] Li, A.N., Li, SH., Xu, D.P., Xu, X.R., Chen, Y.M., Ling, W.H., Chen, F. and Li, H.B. 2014. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Lycopene from Papaya ProcessingWaste by Response Surface Methodology Food Anal. Methods, 8 (5), 1207-1214.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Evaluation of the effect of pectinase and ultrasound treatment on quality and extraction yield of lycopene from tomato

, Motamedzadegan, A. [2], Hamzeh, SH. [3], Mir Arab Razi, S. [4*]Mahdavi Taroni, S. [1]

1. M Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Institute of Higher Education Tajan of Ghaemshahr
2. Associate Prof, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty and Natural Resource of Sari
3. Faculty Member, Department of Food Science and Technology, Institute of Higher Education Tajan of Ghaemshahr
4. Ph. D student, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty and Natural Resource of Sari

(Received: 2017/09/19 Accepted: 2018/01/08)

In current study, colorant fraction of tomatoes containing lycopene was extracted using pectinase (1, 1.5 and 2 percent) and ultrasound assisted (0, 20, 30 and 40 min) pretreatment perior to solvent extraction by petroleum ether – aceton (1:1 ratio). Selected treatments were compared with the blank sample extracted without any pretreatments. Extraction yield, antioxidant capacity and colorimetric parameters of the resulted lycopene were evaluated. Results showed that the effect of enzyme concentration and sonication time and their interaction had significant effects on the extraction yield, antioxidant capacity, a-value and a/b index ($p < 0.05$); whereas, they had no significant effect on L and b parameters. The sample treated with 2% pectinase and 30 min ultrasound showed the highest yield (70.21 mg/kg), antioxidant activity (70.20%), a-value (45.77) and a/b (1.33) in comparison with non-treated sample with the lowest yield (26.31 mg/kg), antioxidant activity (45.53%), a-value (30.33) and a/b (0.87). It is concluded that pretreatment with pectinase and ultrasound would increase the yield of extraction and functional properties of the extracted lycopene.

Key words: Pectinase, Ultrasound, Lycopene.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

*Corresponding Author E-Mail Address: samiramahdavi296@yahoo.com