بررسی اثر آنزیم گلوکزایزومراز بر محلول گلوکزی و هیدرولیز محلول شکر سفید با آنزیم انورتاز جهت تولید شربت با فروکتوز بالا

خدیجه شیرانی بیدآبادی[۱]، محمد حجت‌الاسلامی [۲*]، هومان مولوی[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
۲- عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
(تاریخ دریافت: ۹۵ /۰۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۳۰)

چکیده

امروزه در بازار مصرف مواد قندی تقاضا جهت تولید انواع شربت‌های قندی با فروکتوز بالا به دلیل کاربرد فراوان در صنایع غذایی و دارویی چشمگیر می‌باشد. در نتیجه هدف از انجام این پژوهش افزایش سطح فروکتوز در محلول قندی بود. بدین منظور در ابتدا سه نسبت آنزیم گلوکزایزومراز به سوبسترای گلوکزی (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲) مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج مشخص گردید که کم‌ترین میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز (۱۵ درصد) مربوط به نسبت ۰/۱ و بیش‌ترین میزان تبدیل (۲۵ درصد) مربوط به نسبت ۰/۲ بود. اما این در حالی بود که بین نسبت آنزیم به سوبسترا در سطح ۰/۱ و ۰/۲ اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد مشاهده نگردید. علاوه بر این نتایج نشان داد که درصد تبدیل قند گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکزایزومراز در زمان۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ ساعت به‌ترتیب ۱/۰۹، ۳/۱۷، ٥/٤٤، ٦/۲۹، ۷/۲۰، ۷/۸۱ و ۸/۰۳ درصد بود. هم‌چنین نتایج هیدرولیز محلول شکر سفید توسط آنزیم انورتاز رضایت‌بخش بود و در پایان زمان هیدرولیز میزان ساکاز در حداقل مقدار و میزان گلوکز و فروکتوز در حداکثر مقدار بود. البته لازم به ذکر است که میزان قند گلوکز بیش از قند فروکتوز در طی ٤ ساعت هیدرولیز با آنزیم انورتاز بود. هم‌چنین براساس نتایج مشخص گردید که نسبت ساکارز به قند اولیه در زمان صفر، ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت به ترتیب صفر، ٥۲/٦۲، ٥۲/۸۰، ٦۱ و ٦۹ و نسبت گلوکز به فروکتوز به ترتیب صفر، ۱/٦۲، ۱/۷۸، ۱/٥۳ و ۱/٥۸ بود.

کلید واژگان: شربت با فروکتوز بالا، شکر سفید، آنزیم گلوکزایزومراز، انورتاز.

[*] مسئول مکاتبات: mohojjat@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

۱- مقدمه

امروزه مصرف محلول‌های قندی حاوی فروکتوز بالا بیش از ساکارز رواج یافته است. این قند (فروکتوز) ۱/۸ برابر از ساکارز شیرین‌تر بوده و جذب آن نیاز به انسولین ندارد. لذا می‌تواند در غذاهای افراد دیابتی کاربرد بیشتری دارد. هم‌چنین به دلیل ویژگی‌های خاص خود نظیر خاصیت رسوب‌پذیری، میزان کریستاله شدن، طعم (بو و مزه) ویژه در صنایع مختلف غذایی از جمله انواع نوشابه‌ها، محصولات نانوایی (کیک، کلوچه، دونات، پیراشکی، بیسکوئیت و غیره)، شکلات و تافی‌ها و داروسازی استفاده می‌گردد [۱]. از این‌رو صنعت قند جهت تولید محصولی با فروکتوز بالا و در عین حال با کیفیت مطلوب به دنبال بهترین روش تبدیل محلول قندی گلوکز و ساکارز به فروکتوز جهت رسیدن به اهداف خود می‌باشد. باید گفت که تبدیل شیمیایی گلوکز به فروکتوز اولین بار در حدود صد سال پیش انجام گردید. اما به علت تولید رنگ و ترکیبات نامطلوب و قندهای غیرقابل استفاده همچون پسیکوز[1] این کار ناموفق اعلام شد. علت اصلی این امر عدم توانایی در کنترل دقیق شرایط محیط آزمایش و حداکثر تبدیل قند نهایتاً ۴۰ درصد بود. علاوه بر این استفاده از روش‌های شیمیایی مثل استفاده از ترکیباتی همچون آلومینات سدیم باعث ایجاد بدطعمی شده و از شیرینی نهایی قند می‌کاهد. در نتیجه تولید فروکتوز بدین صورت توانایی صنعتی شدن را نداشت. این در حالی بود که با کاربرد آنزیم گلوکز ایزومراز هیچ یک از معایب عنوان شده، مشاهده نگردید. لذا تولید این آنزیم (گلوکز ایزومراز) به سرعت افزایش یافت و به‌عنوان یک آنزیم مهم در صنعت تولید شربت‌های غنی از فروکتوز گسترش یافت. البته لازم به ذکر است که محققان صنایع غذایی علاوه بر بررسی عملکرد آنزیم گلوکز ایزومراز در تبدیل گلوکز به فروکتوز دوز مصرف آنزیم رو مورد مطالعه قرار دادند. علاوه بر این باید گفت جهت تولید قند مایع انورت که مخلوطی از گلوکز و فروکتوز است و از هیدرولیز ساکارز ایجاد می‌گردد، کاربرد آنزیم انورتاز برای بالا بردن کارایی تبدیل قند اولیه به گلوکز و فروکتوز وتولید محصولی با کیفیت قابل قبول و میزان فروکتوز متفاوت مورد توجه قرار گرفته است. در این راستای کاربرد آنزیم گلوکزایزومراز و انورتاز و دوز مصرف آنزیم مطالعات چندی انجام شده است. فلاحی (Fallahi) و کاظمی ویسری (Kazemivaisari) (۲۰۰۵) میزان ۰/۵ گرم آنزیم را به ازای ۵ میلی‌لیتر سوبسترا را که معادل ۰/۱ نسبت آنزیم گلوکز ایزومراز به سوبسترای گلوکزی بود را در شرایط دمایی ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷ تا ۷/۵ جهت تبدیل گلوکز به فروکتوز مناسب دانستند و اذعان داشتند این نسبت آنزیم به سوبسترا (۰/۱) بیش از سایر نسبت‌های مورد بررسی دارای عملکردی مطلوب در تبدیل گلوکز به فروکتوز بود [۲]. کاظمی ویسری و کشفی (۱۳۸٤) اذعان داشتند جهت تولید فروکتوز از گلوکز باید از ۰/۱ گرم آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت شده به ازای ۵ میلی‌لیتر سوبسترا (گلوکز) استفاده نمود که به گفته این محققین پایداری و عملکرد مناسب آنزیم به‌منظور حداکثر توانایی در تبدیل گلوکز به فروکتوز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۵ تا ۸/۰ مهیا گردید [۳]. علاوه بر این جوس لوئیس (José Luis) و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی تولید شربت با فروکتوز بالا با استفاده از ماده اولیه ذرت و آگاوا[2] با بهره‌گیری از آنزیم گلوکز ایزومراز پرداختند. نتایج این محققین نشان داد به ازای هر ٤/٤ کیلوگرم میوه تازه آگاوا، یک کیلوگرم شربت با بریکس ۷۰ تولید شد که مقدار فروکتوز در آن برابر با ۸۷/۹۲ درصد بود که همین امر نشان‌دهنده نسبت بالای فروکتوز به گلوکز در شربت آگاوا و کاهش سرعت تبدیل گلوکز باقی‌مانده به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز بود [٤]. هم‌چنین جانسان (Johnson) و همکاران (۲۰۰۹) به مطالعه تولید شربت با فروکتوز بالا از گلوکز موجود در کاساوا و ریشه سیب‌زمینی پرداختند. این محققین گزارش نمودند که درصد قند گلوکز در کاساوا (۲۲ تا ۲۵ درصد) بیش از سیب‌زمینی (١٤ تا ۱۵/۷ درصد) بود که همین امر سبب افزایش سرعت تبدیل گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز در شربت تهیه شده از کاساوا نسبت به شربت تهیه شده از سیب‌زمینی بود. البته نتایج این پژوهشگران با وجود اینکه نشان داد سرعت تبدیل گلوکز به فروکتور توسط آنزیم گلوکز ایزومراز در شربت تهیه شده از کاساوا بیشتر بود ولی میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز را در هر دو شربت تقریباً برابر و معادل ۳۷ تا ۳۸ درصد گزارش نمود [۵]. علاوه بر این جمشیدی مخبر و همکاران (۱۳۸٤) در این تحقیق بدین نتیجه دست یافتند که بعد از گذشت ۱۲ ساعت، واکنش ایزومریزاسیون و تبدیل گلوکز به فروکتوز به تعادل

1. Psicose

2. Agave

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

رسید. این در حالی بود که درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز حدود ۵۰ درصد گزارش شد [٦]. واسکوئز باهنا (Vasquez Bahena) و همکاران (۲۰۰٤) نیز به مطالعه هیدرولیز آنزیمی ساکارز با استفاده از آنزیم انورتاز تهیه شده از مخمر ساکارومایسز سرویزیه پرداختند. نتایج این محققین به وضوح نشان داد که آنزیم انورتاز توانایی بالایی در تبدیل ساکارز به فروکتوز و گلوکز داشت و بالاترین راندمان تولید زمانی که غلظت آنزیم ۰/۱۷۵ مول بود، رخ داد [۷]. از سوی دیگر آمایا دلگادو (Amaya Delgado) و همکاران (۲۰۰٦) هیدرولیز قند ساکارز با استفاده از آنزیم انورتاز بررسی نمودند. در این تحقیق سه غلظت متفاوت برای شربت ساکارز اولیه در نظر گرفته شد و در نهایت مشخص گردید که هر سه غلظت آنزیم توانایی هیدرولیز ساکارز رو را با راندمان بالا و عملکرد مناسب داشت ولی غلظت ۲ مول و کمتر از آن بیش‌ترین توانایی را جهت تبدیل ساکارز به قندهای فروکتوز و گلوکز از خود نشان داد [۸]. علاوه بر این توماتانی (Tomotani) و ویتولو (Vitolo) (۲۰۰٦) کاربرد استفاده از آنزیم انورتاز را روشی مناسب جهت تبدیل ساکارز به گلوکز و فروکتوز دانستند و بیان نمودند بهترین شرایط جهت حداکثر راندمان آنزیم انورتاز زمانی مهیا گردید که دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دبی ورودی ۱/٦ در هر ساعت، pH در حدود ۵/۵ و غلظت ۷۰ درصد بود [۹]. از این‌رو در مطالعه پیش‌رو به تأثیر آنزیم گلوکز ایزومراز و دوز مصرف آن بر شکر سفید در تبدیل محلول قندی به فروکتوز جهت تولید قند مایع با فروکتوز بالا پرداخته شد. هم‌چنین زمان ماند قندهای موجود در نمونه خروجی از ستون Eurocat Ca دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

شکر سفید از کارخانه قند اصفهان (اصفهان، ایران) و آب مقطر از شرکت تحقیقات کاوش (اصفهان، ایران) خریداری شدند. هم‌چنین آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت شده (EC.5315) از شرکت BDH انگلیس و آنزیم انورتاز تثبیت شده (EC 3.2.1.26) از شرکت سیگما الدریچ آمریکا خریداری شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تعیین میزان مصرف آنزیم گلوکزایزومراز

به منظور تعیین میزان آنزیم مورد استفاده، محلول گلوکزی (گلوکز خریداری شده از شرکت مرک، آلمان) با بریکس ۳۰ تهیه شد. سپس سه نسبت آنزیم به سوبسترا (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲) به نمونه‌های ٤۰ گرمی محلول گلوکزی افزوده گردید. در ادامه نمونه‌ها در بالن درب بسته ریخته شد و در بن‌ماری با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۱۲ ساعت نمونه‌گیری انجام شد. لازم به ذکر است جهت غیرفعال نمودن آنزیم گلوکز ایزومراز و بررسی میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز نمونه‌ها در ظروف در بسته به مدت یک ساعت در حمام آب و یخ قرار گرفتند [٦].

۲-۲-۲- تبدیل آنزیمی گلوکز به فروکتوز توسط گلوکز ایزومراز

مقدار مشخصی از آنزیم گلوکزایزومراز تحت کنترل دما در ٦۰ درجه سانتی‌گراد و PH حدود ۷ به نمونه‌ها اضافه گردید. بدین ترتیب مقدار۳۰۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های هیدرولیز شده به کمک بی‌کربنات سدیم ۱۰ درصد به pH مورد نظر رسیدند. پس از آن مقدار ۲۰۰ پی‌پی‌ام بی‌سولفیت سدیم ($Na_2S_2O_5$) به‌ترتیب به‌منظور حذف اثر اکسیژن به نمونه‌ها افزوده گردید. در ادامه هریک از نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از رسیدن دما به ٦۰ درجه سانتی‌گراد، آنزیم در سطح تعیین شده به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت زمان ۱۲ ساعت به صورت در بسته در بن‌ماری نگه‌داری گردید و در فواصل زمانی مشخص نمونه‌گیری انجام شد. لازم به ذکر است جهت غیرفعال نمودن آنزیم گلوکز ایزومراز و بررسی میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز ۱۰ میلی‌لیتر از هریک از نمونه‌ها در ظروف در بسته به مدت یک ساعت در حمام آب و یخ قرار گرفتند [٦].

۲-۲-۳- تبدیل آنزیمی ساکارز به گلوکز و فروکتوز توسط انورتاز

مقدار مشخصی از آنزیم تحت کنترل دما در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH حدود ٤/۵ به نمونه‌ها اضافه گردید. بدین ترتیب که مقدار ٤ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به کمک اسید کلریدریک ۱ نرمال به pH مورد نظر رسیدند. سپس در بن‌ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

رسیدن دمای مورد نظر (۵۵ درجه سانتی‌گراد) آنزیم به نمونه‌ها اضافه شد (نسبت آنزیم به سوبسترا ۱۵۰۰۰ یونیت بر گرم در نظر گرفته شد) و مدت زمان ٤ ساعت به صورت در بسته در بن‌ماری نگه‌داری گردید. لازم به ذکر است جهت غیرفعال‌سازی آنزیم از بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد [۱۰]. در انتها نمونه‌های بدست آمده پس از آماده‌سازی به کمک دستگاه HPLC آنالیز شدند.

۲-۲-٤- زمان ماند قندهای موجود در محلول قندی خروجی از ستون Eurocat Ca دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

بدین منظور از دستگاه HPLC دارای دتکتور RI، ساخت شرکت کنوور[3] آلمان استفاده شد. ستون مورد نظر Eurocat Ca، فاز متحرک ستون آب و فلوریت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه با کنترل دما در ۷۵ درجه سانتی‌گراد از ویژگی‌های مورد نظر بود. هم‌چنین استانداردهای گلوکز، فروکتوز و ساکارز از شرکت سیگما (کشور آمریکا) خریداری شدند. لازم به ذکر است که نمونه آماده شده پس رقیق‌سازی از فیلتر سرنگی ۰/٤۵ میکرون عبور داده شد و به دستگاه تزریق گردید [٦].

۲-۲-۵- طرح آماری و روش آنالیز نتایج

نتایج بدست آمده در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار Mstat-c نسخه ۱/٤۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. بدین ترتیب میانگین سه تکرار با استفاده از آزمون دانکن (آزمون تعاقبی) در سطح ۵ درصد ($P<0.05$) مقایسه گردید و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین میزان مصرف آنزیم گلوکزایزومراز

در شکل ۱ تأثیر نسبت‌های مختلف آنزیم گلوکز ایزومراز به سوبسترای گلوکزی (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲) در تبدیل گلوکز به فروکتوز نشان داده شده است. همان‌گونه که نتایج به وضوح نشان می‌دهد با افزایش میزان نسبت آنزیم گلوکز ایزومراز به سوبسترای گلوکزی بر میزان تبدیل قند گلوکز به فروکتوز افزوده شد. به‌طوری که کم‌ترین درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز (۱۵ درصد) مربوط به نسبت آنزیم به سوبسترا در سطح ۰/۰۵ و بیش‌ترین درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز (۲۵ درصد) مربوط به نسبت آنزیم به سوبسترا در سطح ۰/۲ بود. اما این در حالی بود که بین نسبت آنزیم به سوبسترا در سطح ۰/۱ و ۰/۲ اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد مشاهده نگردید. از این‌رو جهت انجام واکنش ایزومریزاسیون با استفاده از آنزیم گلوکز ایزومراز و تبدیل گلوکز به فروکتوز در محلول قند سطح ۰/۱ (نسبت آنزیم به سوبسترا) انتخاب شد. بنابراین با توجه به عملکرد مشابه نسبت ۰/۱ و ۰/۲، با انتخاب نسبت پائین‌تر آنزیم گلوکز ایزومراز به سوبسترای گلوکزی (سطح ۰/۱) می‌توان هزینه تولید یک شربت با فروکتوز بالا را به دلیل صرفه‌جویی در مصرف آنزیم گلوکز ایزومراز کاهش داد. البته لازم به ذکر است که با استفاده از نسبت آنزیم گلوکز ایزومراز به سوبسترای گلوکزی در سطح ۰/۲ حالتی ژله‌ای و منعقد شده، مشاهده گردید که عملکرد مطلوب آنزیم گلوکز ایزومراز را در تبدیل گلوکز به فروکتوز دچار اختلال نمود که چنان‌چه فعالیت آنزیمی محاسبه شود بدون شک سطح ۰/۲ از عملکرد کمتری نسبت به سطح ۰/۱ برخوردار خواهد بود. به احتمال زیاد این امر در ارتباط با انتخاب سطح نامناسب و بیش از حد نیاز آنزیم جهت تبدیل مقدار گلوکز موجود به فروکتوز بوده است. در این راستا تامسون (Thompson) و همکاران (۱۹۷۵) با عبور ۵ گرم گلوکز از ستون حاوی ۰/۵ گرم آنزیم گلوکز ایزومراز (نسبت آنزیم به سوبسترا معادل ۰/۱ بود)، ٥٤ درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز را مشاهده نمودند و این نسبت (۰/۱) را بهترین نسبت جهت تبدیل گلوکز به فروکتوز معرفی کردند [۱۱]. علاوه بر این فلاحی (Fallahi) و کاظمی ویسری (Kazemivaisari) (۲۰۰۵) میزان ۰/۵ گرم آنزیم را به ازای ۵ میلی‌لیتر سوبسترا را که معادل ۰/۱ نسبت آنزیم گلوکز ایزومراز به سوبسترای گلوکزی بود را در شرایط دمایی ٦۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۷ تا ۷/۵ جهت تبدیل گلوکز به فروکتوز مناسب دانستند و اذعان داشتند این نسبت آنزیم به سوبسترا (۰/۱) بیش از سایر نسبت‌های مورد بررسی دارای عملکردی مطلوب در تبدیل گلوکز به فروکتوز بود [۲]. هم‌چنین جمشیدی مخبر و همکاران (۱۳۸٤) در مطالعه خود به بهینه‌سازی شرایط تولید شربت با فروکتوز بالا پرداختند. این محققین در مطالعه خود از میزان ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم آنزیم گلوکز ایزومراز به ازای ۵ میلی‌لیتر گلوکز خالص (سوبسترا) استفاده نمودند. براساس نتایج این محققین مشخص گردید که

3. KNAUER, GERMANY

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

با افزایش میزان آنزیم گلوکزایزومراز میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز افزایش یافت به‌طوری که به‌ترتیب با استفاده از ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ گرم آنزیم گلوکز ایزومراز میزان ۰/۱۸، ۰/۲۳ و ۰/۲٤ گرم فروکتوز تولید گردید [٦]. نتایج این محققین با نتایج پیش‌رو مطابقت داشت. از سوی دیگر کاظمی ویسری و کشفی (۱۳۸٤) اذعان داشتند جهت تولید فروکتوز از گلوکز باید از ۰/۱ گرم آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت شده به ازای ۵ میلی‌لیتر سوبسترا (گلوکز) استفاده نمود که به گفته این محققین پایداری و عملکرد مناسب آنزیم به‌منظور حداکثر توانایی در تبدیل گلوکز به فروکتوز در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۷/۵ تا ۸ مهیا گردید [۳].

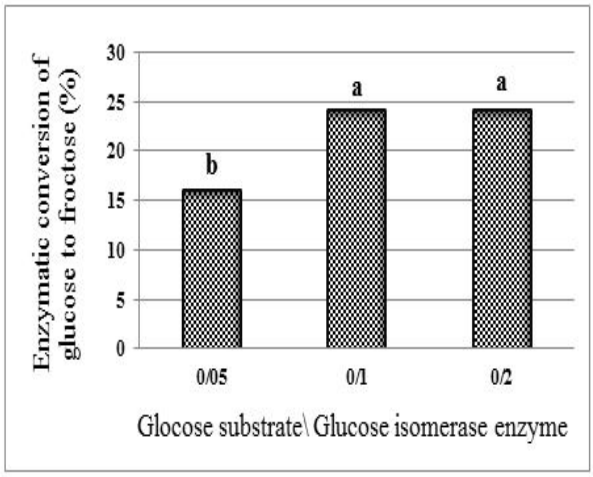

Fig 1 The effect of different ratios of glucose isomerase enzyme /glucose substrate on conversion of glucose to fructose.

. Different letters show the statistical significant differences (P<0.05)

۳-۲- تبدیل آنزیمی گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز (برحسب درصد)

در شکل ۲ درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز در محلول قندی توسط آنزیم گلوکز ایزومراز در طی مدت زمان ۱۲ ساعت و با فواصل زمانی صفر،۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ ساعت نشان داده شده است. نتایج بدست آمده به وضوح نشان داد که درصد تبدیل قند گلوکز به فروکتوز در زمان‌های۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ ساعت به‌ترتیب ۱/۰۹، ۳/۱۷، ۵/٤٤، ٦/۲۹، ۷/۲۰، ۷/۸۱، ۸/۰۳ درصد بود. هم‌چنین براساس نتایج حاصله مشخص شد که با گذشت زمان (در طی مدت زمان ۱۲ ساعت) میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز کاهش یافت. در ارتباط با عامل بازدارنده بر ایزومریزاسیون آنزیمی (تبدیل گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکزایزومراز) این مسئله مطرح است که میزان عملکرد آنزیم گلوکز ایزومراز بسیار تحت تأثیر فروکتوز موجود در محیط است و در واقع کاهش عملکرد آنزیم گلوکزایزومراز جهت تبدیل گلوکز به فروکتوز را میزان قند فروکتوز موجود در محلول قندی تعیین می‌کند. این بدان معناست که هر چقدر نسبت فروکتوز به گلوکز کمتر باشد (در ساعات اولیه) درصد تبدیل قند گلوکز به فروکتوز یا ایزومریزاسیون بیشتر است که در پژوهش پیش‌رو نیز چنین عملکردی مشاهده گردید.

در راستای ارزیابی درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز در طی یک واکنش آنزیمی رند (Rand) (۱۹۵۵) در طی تحقیق خود توانست با استفاده از آنزیم گلوکز ایزومراز از نشاسته ذرت، تاپیوکا، کاساوا، گندم و پالپ چغندرقند، شربت با فروکتوز بالا تولید نماید. هم‌چنین در این مطالعه مشخص شد که تولید شربت با فروکتوز بالا و سرعت تبدیل گلوکز به فروکتوز به شدت تحت تأثیر ماده اولیه مورد استفاده و میزان فروکتوز موجود در آن بود. به گونه‌ای که با افزایش میزان فروکتوز در محلول قندی، درصد تبدیل و عملکرد آنزیم گلوکز ایزومراز به شدت کاهش یافت [۱۲]. علاوه بر این جوس لوئیس (José Luis) و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی تولید شربت با فروکتوز بالا با استفاده از ماده اولیه ذرت و آگاوا[4]در طی یک واکنش آنزیمی (بهره‌گیری از آنزیم گلوکز ایزومراز) پرداختند. نتایج این محققین نشان داد که هر دو شربت تولیدی دارای رفتار جریان نیوتنی بودند و به لحاظ دانسیته، رطوبت، فعالیت آبی، مواد جامد کل، قند کل و احیاء با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نداشتند. علاوه بر این نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که به ازای هر ٤/٤ کیلوگرم میوه تازه آگاوا، یک کیلوگرم شربت با بریکس ۷۰ تولید شد که مقدار فروکتوز در آن برابر با ۸۷/۹۲ درصد بود که همین امر نشان‌دهنده نسبت بالای فروکتوز به گلوکز در شربت آگاوا و کاهش سرعت تبدیل گلوکز باقی‌مانده به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز بود [٤]. هم‌چنین جانسان (Johnson) و همکاران (۲۰۰۹) مطالعه تولید شربت با فروکتوز بالا از گلوکز موجود در کاساوا و ریشه سیب‌زمینی پرداختند. این محققین گزارش نمودند که درصد قند گلوکز در کاساوا (۲۲ تا ۲۵

4. Agave

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

درصد) بیش از سیب‌زمینی (۱٤ تا ۱۵/۷ درصد) بود که همین امر سبب افزایش سرعت تبدیل گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکز ایزومراز در شربت تهیه شده از کاساوا نسبت به شربت تهیه شده از سیب‌زمینی بود. البته نتایج این پژوهشگران با وجود اینکه نشان داد سرعت تبدیل گلوکز به فروکتور توسط آنزیم گلوکز ایزومراز در شربت تهیه شده از کاساوا بیشتر بود ولی میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز را در هر دو شربت تقریباً برابر و معادل ۳۷ تا ۳۸ درصد گزارش نمود [۵]. علاوه بر این جمشیدی مخبر و همکاران (۱۳۸٤) در این تحقیق بدین نتیجه دست یافتند که بعد از گذشت ۱۲ ساعت، واکنش ایزومریزاسیون و تبدیل گلوکز به فروکتوز به تعادل رسید. این در حالی بود که درصد تبدیل گلوکز به فروکتوز حدود ۵۰ درصد گزارش شد [٦].

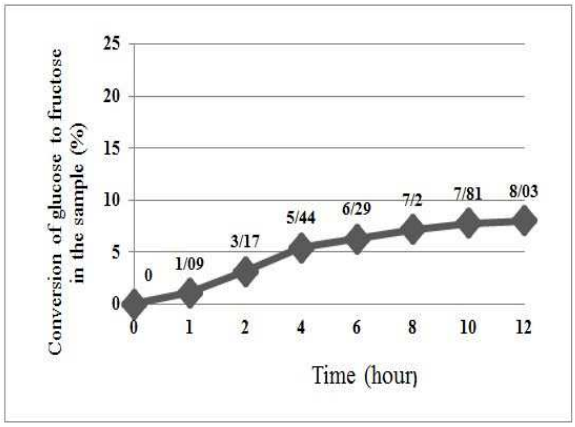

Fig 2 Conversion of glucose to fructose (in sugar solution) in presence of glucose isomerase enzyme during 12 hours.

۳-۳- تبدیل آنزیمی ساکارز به گلوکز و فروکتوز توسط انورتاز

در شکل ۳ اثر هیدرولیز ساکارز و تبدیل آن به دو قند گلوکز و فروکتوز با استفاده از آنزیم انورتاز در طی زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت نشان داده شده است. هم‌چنین در شکل ٤ و ۵ به‌ترتیب نسبت ساکارز هیدرولیز شده به قند اولیه و نسبت تولید گلوکز به فروکتوز در طی چهار ساعت هیدرولیز آنزیمی آورده شده است. همان‌گونه که نتایج به وضوح نشان می‌دهد با افزایش زمان هیدرولیز از صفر به ٤ ساعت از میزان قند ساکارز کاسته و بر میزان قند گلوکز و فروکتوز به‌طور معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد افزوده شد. به گونه‌ای که در پایان زمان ٤ ساعت میزان ساکارز در حداقل مقدار و میزان دو قند گلوکز و فروکتوز در حداکثر مقدار خود بود. اما میزان قند باقی‌مانده (ساکارز) و هم‌چنین قندهای تولید شده (گلوکز و فروکتوز) در زمان‌های یک و دو ساعت با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد نداشتند. علاوه بر این نکته قابل توجه اینجاست که از زمان شروع هیدرولیز با آنزیم انورتاز تا یک ساعت اولیه بیش‌ترین میزان تغییرات در کاهش قند اولیه (ساکارز) و افزایش قندهای تولیدی (گلوکز و فروکتوز) وجود داشت و شیب نمودار نسبت به سایر زمان‌های هیدرولیز بیشتر بود. علاوه بر این باید گفت که میزان تولید قند گلوکز بیش از قند فروکتوز بود. هم‌چنین اختلاف میزان قند گلوکز و فروکتوز تولید شده در طی هیدرولیز با آنزیم انورتاز در ساعات پایانی کمتر از ساعات اولیه بود. زیرا همان‌طور که مشاهده می‌شود بعد از زمان ۲ ساعت هیدرولیز آنزیمی شیب نمودار نسبت گلوکز به فروکتوز روندی نزولی داشت. لازم به ذکر است که میزان مصرف آنزیم انورتاز به دلیل رایج بودن آن در تولید انواع مختلف شربت‌های قندی براساس منابع موجود انتخاب گردید و هیچ‌گونه آزمونی در پژوهش پیش‌رو جهت تعیین مقدار مصرف آن در نظر گرفته نشد.

با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت که آنزیم انورتاز به خوبی قابلیت هیدرولیز ساکارز و تبدیل آن به قندهای گلوکز و فروکتوز را داشت. در راستای کاربرد روش هیدرولیز آنزیمی (با آنزیم انورتاز) جهت تولید شربت اینورت مطالعات چندی انجام شده که به برخی از آن‌ها اشاره می‌گردد و لازم به ذکر است که با نتایج پیش‌رو تا حدود زیادی مطابقت داشتند. گلدستون (Goldstein) و همکاران (۱۹۷۷) به منظور تولید شربت اینورت از ساکارز دو روش هیدرولیز اسیدی و روش هیدرولیز آنزیمی را مورد استفاده قرار دادند. براساس نتایج این محققین مشخص گردید که با کاربرد آنزیم انورتاز جهت هیدرولیز ساکارز به قندهای گلوکز و فروکتوز، راندمان تولید به ۹۰ درصد رسید. این در حالی بود که این پژوهشگران اذعان نمودند راندمان تولید شربت اینورت با اسید نیز قابل قبول بود اما مشکل بزرگی که ایجاد نمود تغییرات رنگی قابل ملاحظه‌ای بود که در طول انورتاسیون با آنزیم انورتاز هیچ‌گونه از این تغییر رنگ‌های نامطلوب در نمونه مشاهده نگردید و تقریباً رنگ نمونه هیدرولیز شده با آنزیم بدون تغییر باقی ماند [۱۰]. هم‌چنین واسکوئز باهنا (Vasquez Bahena) و همکاران

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

(۲۰۰٤) نیز به مطالعه هیدرولیز آنزیمی ساکارز با استفاده از آنزیم انورتاز تهیه شده از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* پرداختند. نتایج این محققین به وضوح نشان داد که آنزیم انورتاز توانایی بالایی در تبدیل ساکارز به فروکتوز و گلوکز داشت و بالاترین راندمان تولید زمانی که غلظت آنزیم ۰/۱۷۵ مول بود، رخ داد [۷]. از سوی دیگر دیگر آمایا دلگادو (Amaya Delgado) و همکاران (۲۰۰٦) هیدرولیز قند ساکارز با استفاده از آنزیم انورتاز بررسی نمودند. در این تحقیق سه غلظت متفاوت برای شربت ساکارز اولیه در نظر گرفته شد و در نهایت مشخص گردید که هر سه غلظت آنزیم توانایی هیدرولیز ساکارز رو را با راندمان بالا و عملکرد مناسب داشت ولی غلظت ۲ مول و کمتر از آن بیش‌ترین توانایی را جهت تبدیل ساکارز به قندهای فروکتوز و گلوکز از خود نشان داد [۸]. علاوه بر این توماتانی (Tomotani) و ویتولو (Vitolo) (۲۰۰٦) کاربرد استفاده از آنزیم انورتاز را روشی مناسب جهت تبدیل ساکارز به گلوکز و فروکتوز دانستند و بیان نمودند بهترین شرایط جهت حداکثر راندمان آنزیم انورتاز زمانی مهیا گردید که دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دبی ورودی ۱/٦ در هر ساعت، pH در حدود ۵/۵ و غلظت ۷۰ درصد بود [۹]. سفرک (Safarik) و همکاران (۲۰۰۹) تولید قند اینورت را با استفاده از سلول‌های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* محصور شده در میکروذرات مغناطیسی آلژینات بررسی کردند. لازم به ذکر است که این مخمر قابلیت تولید آنزیم انورتاز جهت هیدرولیز ساکارز و تبدیل آن به قندهای انورت را داشت. نتایج این پژوهشگران نشان داد که سرعت تبدیل ساکارز به قندهای انورت در مخلوط واکنش به شدت تحت تأثیر غلظت ساکارز در محلول قندی بود و افزایش غلظت ساکارز موجود در مخلوط واکنش را از ۵ به ۵۰ درصد عاملی اثرگذار بر کاهش سرعت تبدیل ساکارز به قندهای گلوکز و فروکتوز معرفی نمودند [۱۳]. هم‌چنین مارکوز (Marquez) و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش نمودند که با افزایش غلظت ساکارز در مخلوط واکنش سرعت تبدیل ساکارز توسط آنزیم انورتاز آزاد و تثبیت شده (غیرمتحرک) به شدت کاهش یافت هرچند که آنزیم انورتاز در تمام غلظت‌های مصرفی نتیجه مطلوبی را در هیدرولیز ساکارز از خود نشان داد [۱٤].

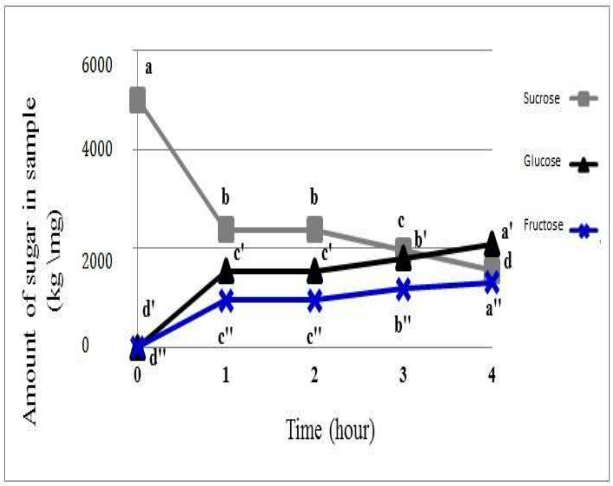

Fig 3 The effect of hydrolysis and conversion of sucrose to glucose and fructose in presence of invertase enzyme.
Different letters show the statistical significant differences (P<0.05).

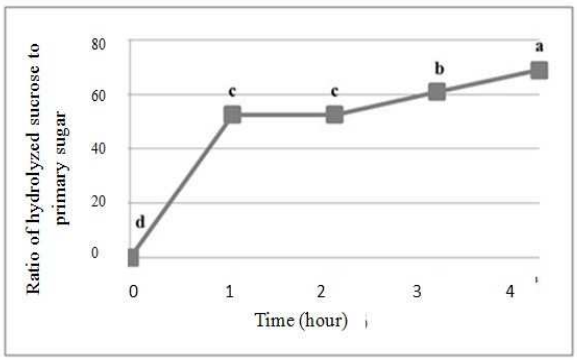

Fig 4 Ratio of hydrolyzed sucrose to primary sugar in presence of invertase enzyme during 4 hours.
Different letters show the statistical significant differences (P<0.05).

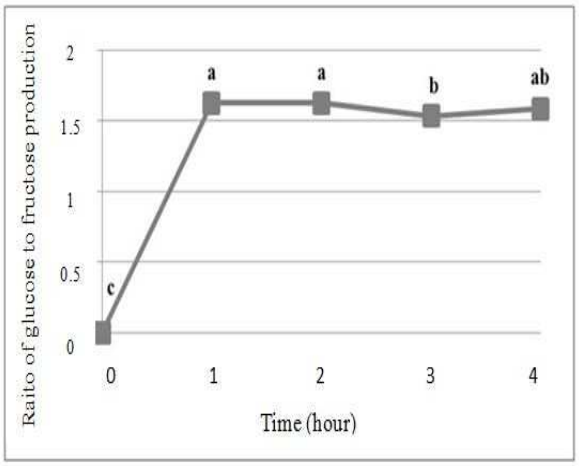

Fig 5 Ratio of glucose to fructose production in presence of invertase enzyme during 4 hours.
Different letters show the statistical significant differences (P<0.05).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

۳-٤- زمان ماند قندهای موجود در نمونه خروجی از ستون Eurocat Ca دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

نتایج بدست آمده از زمان ماند قندهای موجود در نمونه خروجی از ستون Eurocat Ca دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (ارائه شده در شکل ٦) نشان داد که به ترتیب قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز از ستون خارج شدند و به‌ترتیب زمان ماند کمتری را در ستون دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا داشتند. لازم به ذکر است که به‌ترتیب زمان ماند قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز در ستون مورد نظر حدود ۱۱، ١٤ و ۱۸ دقیقه بود. باید گفت که این رخداد (خروج قندها در زمان متفاوت از ستون دستگاه کروماتوگرافی) تحت تأثیر قطبیت و اندازه قندها می‌باشد. در ارتباط با زمان ماند و خروج انواع قندها (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) از ستون دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا گزارشات چندی موجود است. سلمان (Salman) و همکاران (۲۰۱۱) به منظور اپتیمم نمودن جداسازی قندها (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) از ۳ محلول با غلظت‌های مختلف Ca-EDTA استفاده کردند [۱۵]. در نهایت مقادیر قندها از سطح زیر منحنی پیک خروجی محلول‌های استاندارد اندازه‌گیری شد و زمان ماند برای ساکارز برابر با ۱۷/٤٥ دقیقه، گلوکز برابر ۲۱/۹۸ دقیقه و فروکتوز برابر ۲۵/۹٦ دقیقه به ثبت رسید. همان‌گونه که مشهود است ترتیب خروج قندها با نتایج پیش‌رو مطابقت داشت ولی در زمان ماند قندها در ستون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اختلاف مشاهده گردید. هم‌چنین جمشیدی مخبر و همکاران (۱۳۸٤) در مطالعه خود در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید شربت غنی از فروکتوز به این نتیجه دست یافتند که بیشتر قند ساکارز در دقایق اولیه، قند گلوکز در زمان ۱۵ دقیقه و قند فروکتوز در زمان ۳۵ دقیقه از ستون دستگاه خارج شد [٦]. علاوه بر این موسوی و شوندی (۱۳۸۷) تحقیقی را به منظور بررسی مقادیر قندهای موجود در ٤ نوع خرمای ایرانی (حلاوی، دیری، زاهدی، سایر) انجام دادند. براساس منحنی‌های به‌دست آمده از نتایج این پژوهشگران خروج قندها از ستون بسته به قطبیت و اندازه به‌ترتیب به ساکارز، گلوکز و نهایتاً فروکتوز تعلق گرفت و زمان ماند آن‌ها به‌ترتیب ۵/۲۸، ٦/۱۳ و٦/٦٦ دقیقه بود [١٦].

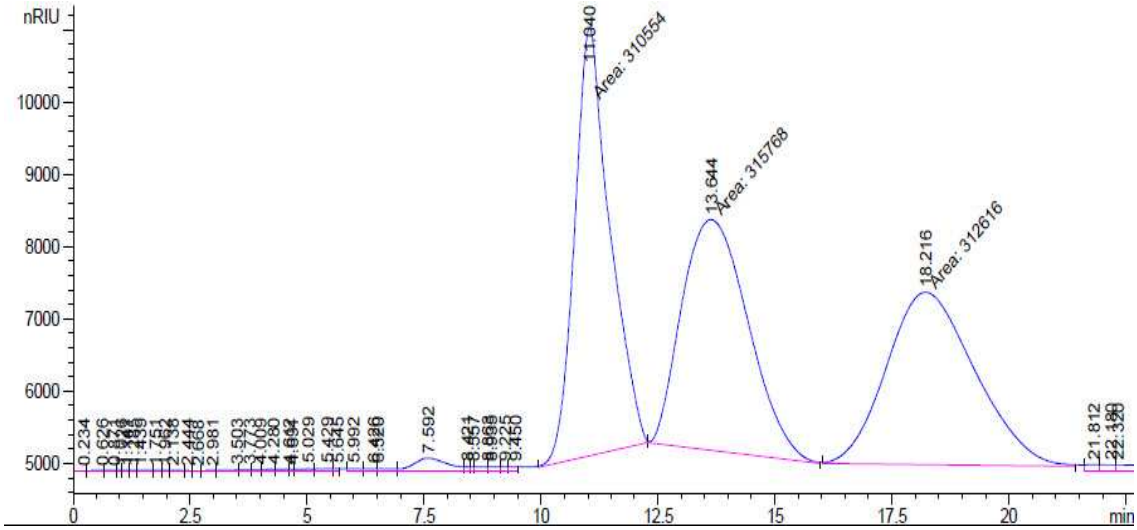

Fig 6 The retention time of different sugars in HPLC column.

٤- نتیجه‌گیری

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر آنزیم گلوکزایزومراز بر محلول گلوکزی وآنزیم انورتاز بر محلول شکر سفید جهت تولید شربت قندی با فروکتوز بالا بود. بدین منظور در ابتدای امر میزان مصرف آنزیم گلوکزایزومراز مورد نیاز مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که میزان مصرف آنزیم انورتاز به دلیل رایج بودن آن در تولید انواع مختلف شربت‌های قندی براساس منابع موجود انتخاب گردید. نتایج بدست آمده بیانگر آن بود که در میان نسبت‌های مختلف آنزیم گلوکزایزومراز به سوبسترای آنزیمی (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲) دو نسبت ۰/۱ و ۰/۲ بهترین عملکرد را از خود نشان دادند که جهت صرفه‌جویی در هزینه نسبت ۰/۱ انتخاب گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که درصد تبدیل قند گلوکز به فروکتوز در زمان۱، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ ساعت به‌ترتیب ۱/۰۹، ۳/۱۷، ۵/٤٤، ٦/۲۹، ۷/۲۰، ۷/۸۱

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

و ۸/۰۳ درصد بود که این بیانگر اینست که با گذشت زمان ایزومریزاسیون میزان تبدیل گلوکز به فروکتوز توسط آنزیم گلوکزایزومراز کاهش یافت. حصول چنین نتیجه‌ای تحت تأثیر غلظت فروکتوز موجود در محیط بود. علاوه بر این با بررسی زمان ماند قندهای موجود در نمونه خروجی از ستون دستگاه کروماتوگرافی مایع مشخص گردید که خروج قندها تحت تأثیر قطبیت و اندازه آن‌ها بود که به موجب آن به‌ترتیب قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز از ستون مورد نظر دستگاه کروماتوگرافی مایع خارج شدند. در انتها با بررسی اثر آنزیم انورتاز بر محلول قندی ساکارز نتایج رضایت‌بخشی حاصل گردید و در پایان چهار ساعت هیدرولیز آنزیمی، قند ساکارز در حداقل مقدار و دو قند تولیدی (گلوکز و فروکتوز) در حداکثر مقدار خود بودند. البته لازم به ذکر است که از زمان شروع هیدرولیز محلول قندی ساکارز با آنزیم انورتاز تا یک ساعت اولیه بیش‌ترین میزان تغییرات در کاهش قند اولیه (ساکارز) و افزایش دو قند گلوکز و فروکتوز مشاهده گردید.

۵- منابع

[1] Elahi, M., Razavi, S.M.A., Baratiyan Gharghi, Z., and Pezeshki, P. 2010. Physical and quality properties of socrose invert syrup. *Journal of Iraninan Food Science and Technology*, 6(2): 105-112 [in Persian].

[2] Fallahi, P., and Kazemivaisari, Ae. 2005. Fructose enrichment of date syrup using immobilized glucose isomerase enzyme. *18th National Congress on Food Technology*, Mashhad.I.R.Iran, 15-16 oct [in Persian].

[3] Kazemivaisari, Ae., and Kashfi, J. 2005. Fructose production from glucose by enzymathic method. *10th National Congress of Chemistry Engineering, Sistan & Balochestan University, Ira* [in Persian].

[4] José Luis, M., González, V.G., Bernardino Nicanor, A., and Gloria Ramos Ramírez, E. 2011. Enzymatic production of high fructose syrup from Agave tequilana fructans and its physicochemical Characterization. *African Journal of Biotechnology*, 10(82): 19137-19143.

[5] Johnson, R., Padmaja, G., and Moorthy, S.N. 2009. Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 616–620.

[6] Jamshidi Mokhber, M., Vosoghi, M., Alamzadeh, A. 2005. Study and optimization the production of high fructose syrup of date syrup. *Proceedings of the nutritional Iranian Chemical Engineering Congress*, Sistan & Balochestan University [in Persian].

[7] Vasquez Bahena, J., Montes-Horcasitas, M.C., Ortega Lopez, J., Magana Plaza, I., and Flores Cotera, L.B. 2004. Multiple steady states in a continuous stirred tank reactor: an experimental case study for hydrolysis of sucrose by invertase. *Process Biochemistry*, 39(12): 2179-2182.

[8] Amaya Delgado, L., Hidalgo Lara, M.E., and Montes Horcasitas, M.C. 2006. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*, 99(2): 299-304.

[9] Tomotani, E.J., and Vitolo, M. 2007. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, 80: 662–667.

[10] Goldstein, H., Barry, P.W., Rizzuto, A.B., Venkatasubramanian, K., and Vieth, W.R. 1977. Continuous enzymic production of invert sugar. Amstar Corp., Corporate Res. & Development, 266 Kent Avenue, Brooklyn, New York 1121, USA. *Journal of Fermentation Technology*, 55(5): 516-524.

[11] Thompson, K., Johnson, R., and Lloyd, N. 1975. Process for isomerizing glucose to fructose. Unitrd state Patent, Report No: US3788945 A.

[12] Rand, M.N. 1955. This is liquid sugar, A technical guide for the liquid sugar user, Refined Syrup & Sugars, INC. Yonkers, New York.

[13] Safarik, I., Sabatkova, Z., and Safarikova, M. 2009. Invert sugar formation with Saccharomyces cerevisiae cells encapsulated in magnetically responsive alginate microparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321 (10): 1478-1481.

[14] Marquez, L.D.S., Cabral, B.V., and Freitas, F. F. 2008. *J.Mol.Catal*. B:Enzym, 51: 86.

[15] Salman, M.T., Alghamdi, M.A., Bazadi, S.S., and Abdel-Hamid, S. 2011. Determination of fructose, glucose and sucrose in Taifgrape using high performance liquid chromatography and analysis of mineral salts. *Archives of Applied Science Research*, 3(6): 488-496.

[16] Mosavi, A., Shavandi, M.A. 2008. Qualitative and quantitative sugar analysis in four date species by HPLC for investigation on application waste in fermented industry. *18th National Congress on Food Technology*, Mashhad.I.R.Iran, 15-16 oct [in Persian].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

Evaluation the Glucose Isomease Enzyme Effect on Glucose Solution and Hydrolysis of White Sugar by Invertas Enzyme for High Fructose Syrup Production

Shirani Bidabadi, Kh. [1], Hojatoleslami, M. [2*], Molavi, H. [2]

1. M.Sc of Food Science and Technology, Azad University, Shahrkord Branch
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Azad University, Shahrkord Branch

(Received: 2016/05/15 Accepted:2016/07/20)

Today demand for the production of various high fructose syrup production was increased for application in food and pharmaceutical industries. So the aim of this study was increased the amount of fructose and sugar solution. At first the ratio of enzyme glucose isomerase to the glucose substrate (0.05, 0.1 and 0.2) was studied. Based on results the lowest amount of conversion of glucose to fructose (15%) was in 0.1 proportion and the highest amount of conversion (25%) was in 0.2 proportion. Although no significant diffrence was observed in 0.1 and 0.2 ratio ($p \leq 0.05$). Also the results indicated the convesion of glucose to fructose by glucose isomerase during 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12hr were respectively 1.09, 3.17, 5.44, 6.29, 7.20, 7.81 and 8.03%. The results of white sugar hydrolysis by invertas was acceptable and the content of sucrose was in lowest amount and the glucose and fructose were in highest level at the end of hydrolysis. It should be noted that the amount of glucose over than fructose by invertas enzyme after 4hr hydrolysis. Also the results showed the ratio of sucrose to raw sugar in 1, 2, 3 and 4 hr were respectievly 52.62, 52.80, 61 and 69 and the proportion glucose to fructos were 1.62, 1.78, 1.53 and 1.58 %.

Keywords: High fructose syrup, White sugar, Glucose isomease enzyme, Invertas.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-13]

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