

## بهینه‌سازی پیش‌تیمار آنزیمی شربت خام چغندر قند با استفاده از روش سطح پاسخ

ادریس آرژه<sup>1\*</sup>، میر خلیل پیروزی فرد<sup>2</sup>، سجاد پیرسا<sup>3</sup>

1- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

2- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

3- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: 97/05/14 تاریخ پذیرش: 98/01/20)

### چکیده

در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر متغیرهای پیش تیمار آنزیمی روی شاخص‌های تصفیه‌ای شربت خام چغندر از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی (سه فاکتور و در پنج سطح) استفاده شد. از این رو تاثیر دمای گرمخانه‌گذاری (55-40 درجه سانتی‌گراد)، زمان واکنش (100-20 دقیقه) و غلظت پکتیناز (0/001-0/02 درصد حجمی/حجمی) روی ویسکوزیته، کدورت، رنگ و درجه خلوص شربت خام چغندر قند مطالعه و به خوبی توسط یک مدل چند جمله‌ای درجه دوم برازش گردید ( $R^2 > 0/85$ ). نتایج آزمایشات نشان داد که دمای گرمخانه‌گذاری مهمترین متغیر تاثیرگذار روی شاخص‌های تصفیه‌ای می‌باشد، به طوری که روی اغلب پاسخ‌ها تاثیر معنی‌دار داشت. شرایط پیش تیمار آنزیمی بدست آمده در این مطالعه، شامل 0/012 درصد غلظت آنزیم در دمای 49 درجه‌سانتی‌گراد به مدت 65 دقیقه می‌باشد.

کلید واژگان: چغندر قند، پیش تیمار آنزیمی، آنزیم پکتیناز، روش سطح پاسخ

\*مسئول مکاتبات: E.arjeh@gmail.com

## 1- مقدمه

تولید شکر یک فرآیند چند مرحله‌ای و پیچیده است که مصرف انرژی در آن بسیار بالا می‌باشد. از همین رو فن‌آوری و روش‌هایی که بتوانند که عملکرد فرآیند و خط تولید را بهینه کنند، موجب کاهش قابل توجهی در مصرف انرژی در این صنعت می‌گردند. امروزه به غیر از روش شیمیایی متداول تصفیه‌ی قند (آهک-دی‌اکسید کربن) روش‌های فرآوری جدید (اغلب بر مبنای تکنولوژی غشایی و تصفیه شیمیایی جدید) نیز در حال توسعه هستند. شربت خام محصول فرآیند دی‌فوزیون خلال‌های چغندر می‌باشد که تقریباً حاوی 85 درصد آب، 13 درصد ساکارز و 2 درصد ترکیبات غیر قندی<sup>1</sup> می‌باشد. درجه خلوص شربت خام 85-88 درصد می‌باشد [1]. بنابراین با توجه به درجه خلوص پایین، بایستی تحت فرآیند تصفیه قرار بگیرد.

یکی از اهداف اصلی تولید کنندگان شکر طی مراحل تصفیه و رنگبری شربت خام چغندر، حذف هر چه بیشتر ناخالصی‌های غیرقندی از شربت و به دست آوردن شربت رقیق<sup>2</sup> با درجه خلوص و کیفیت بالاتر است. امروزه در اکثر کارخانه‌های قند روش کار (تصفیه شربت به روش کلاسیک) به این صورت است که به شربت خام 3-1 درصد آهک اضافه می‌کنند که در نتیجه آن مواد کلونیدی، نمک‌های غیرمحلول کلسیم، ترکیبات پکتینی و پروتئینی ته نشین می‌شوند. در مرحله بعد آهک اضافی در شربت به وسیله‌ی گاز کربنیک به کربنات کلسیم تبدیل شده و همزمان با آن نیز از ساکارات کلسیم ساکارز آزاد می‌شود [1].

با وجود اینکه کاربرد آهک (به صورت کلسیم هیدرواکسید) در صنعت قند بسیار متداول است، اما قدرت و توانایی آن برای حذف ترکیبات پکتیکی بسیار پایین می‌باشد [2]. در نتیجه برای حذف پکتین در کارخانه‌های شکر به مقادیر زیادی آهک برای فرآیندهای روزانه نیاز است که این مقادیر بالا نیز به نوبه خود موجب تولید حجم زیادی گل<sup>3</sup> (آهک برجای مانده) می‌کند. در اغلب موارد گل تولیدی در اطراف کارخانه‌ها جمع‌آوری می‌گردد که برای محیط زیست بسیار مخرب می‌باشد. از طرف دیگر آهک

مورد استفاده برای تصفیه بخش مهمی از هزینه‌های عملیاتی در فرآیند تصفیه شربت خام را به خود اختصاص می‌دهد [3] که بایستی در مباحث اقتصادی مورد نظر باشد. بنابراین، حذف ترکیبات پکتیکی و بهبود درجه خلوص شربت خام برای کاهش مصرف آهک مورد نیاز طی فرآیند تصفیه ضروری می‌باشد به شرطی که تاثیر منفی بر کیفیت شربت تصفیه شده نهایی نداشته باشد [4]. در صنعت آب میوه نیز هنگام تولید آب میوه‌های شفاف حضور ترکیبات پکتیکی در دسر ساز هستند که برای رفع این مشکل از آنزیم‌ها (پکتیناز) استفاده می‌کنند.

پکتینازها جزو اولین آنزیم‌های هستند که در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفتند. در حال حاضر این آنزیم‌ها حدود 20 درصد از کل آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت را به خود اختصاص داده است، که دارای منشا گیاهی، قارچی، مخمری و باکتری می‌باشد [5]. پکتینازها با هیدرولیز ترکیبات پکتیکی موجب ناپایداری کمپلکس‌های پروتئین-پکتین می‌گردند. این کمپلکس‌ها دارای یک هسته پروتئینی با بار مثبت هستند که با مولکول‌های پکتین با بار مثبت احاطه شده‌اند. هیدرولیز جزئی مولکول‌های پکتین موجب در معرض قرار گرفتن سطوح با بار مثبت و ناپایداری کمپلکس‌ها می‌شود. بنابراین، دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات کاهش یافته و کمپلکس‌ها به هم پیوسته و تشکیل مولکول‌های بزرگتر می‌دهند. همزمان با این اتفاقات ته نشینی صورت می‌گیرد که از قانون استوک پیروی می‌کند [6]. با حذف پکتین توسط آنزیم‌ها ویسکوزیته نیز به شکل قابل توجهی کاهش می‌یابد که این امر موجب سهولت در انجام فرآیندهای بعدی (تغلیظ، اوپراسیون و کریستالیزاسیون) و کاهش انرژی مصرفی می‌گردد. دمای گرمخانه‌گذاری، pH، زمان واکنش و غلظت آنزیم فاکتورهایی هستند که تیمار آنزیمی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و بایستی در آزمایشات اولیه بهینه سازی شوند.

در سال‌های اخیر پژوهش‌های اندکی روی شربت خام چغندر صورت گرفته است. جاهد و همکاران (2014) شرایط تصفیه شربت خام چغندر با استفاده بتنونیت را مطالعه کردند. آنها گزارش کردند که تصفیه شیمیایی شربت با استفاده از بتنونیت موجب بهبود درجه خلوص و کدورت آنمی‌گردد. جذب سطحی ناخالصی‌ها از ویژگی‌های اصلی بتنونیت می‌باشد. اما بتنونیت نیز همانند آهک نمی‌تواند ترکیبات پکتیکی را به طور موثری جذب

1. Non-sucrose

2. شربت حاصل از کربناسیون دوم و قبل از ورود به اوپراتور

3. carbonation-lime residue

آزمایش‌ها، 500 میلی لیتر نمونه شربت خام در نظر گرفته شد و سپس تحت شرایط مورد نظر فرآوری گردید (جدول 1). بایستی هنگام اضافه کردن آنزیم شربت به آرامی همزده شود. دماهای مورد نظر برای انکوباسیون نیز با استفاده از یک حمام آب (ممرت، آلمان) تأمین گردید. در انتهای زمان واکنش، نمونه‌های تیمار شده سانتریفوژ (5 دقیقه، 4000 دور در دقیقه در دمای 25 درجه سانتی گراد) و رسوبات ته‌نشین شده جداسازی گردید (Kubota 6900, Japan). پارامترهای مورد نظر بلافاصله بعد از انجام تیمارهای آنزیمی اندازه‌گیری شدند.

**Table 1** The central composite design used for purification of raw sugar beet juice with pectinase enzyme.

Exp. no.	Time (min)	Temperature (C)	Enzyme-Conc (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	36	43.0	0.0032
2	60	47.5	0.0095
3	60	47.5	0.0095
4	60	47.5	0.0095
5	60	47.5	0.0095
6	36	43.0	0.0157
7	60	47.5	0.0095
8	36	51.9	0.0157
9	60	47.5	0.0200
10	60	47.5	0.0095
11	84	43.0	0.0157
12	84	43.0	0.0032
13	60	47.5	0.0010
14	20	47.5	0.0095
15	36	51.9	0.0032
16	84	51.9	0.0157
17	100	47.5	0.0095
18	60	55.0	0.0095
19	84	51.9	0.0032
20	60	40.0	0.0095

## 2-3- اندازه‌گیری‌ها

### 2-3-1- ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه‌ها با استفاده از ویسکومتر دیجیتالی بروکفیلد (model LVDV-II + Pro, Brookfield Engineering ) (Laboratories, Inc., Middleboro, USA) در سرعت

و از سیستم حذف نماید [7]. برخی از دیگر از محققان نیز که روی شرایط تصفیه شربت با استفاده از غشاها (میکروفیلتراسیون، نانوفیلتراسیون) کار می‌کردند، گزارش نمودند که کاهش شار و انسداد غشاها مهمترین مشکلات موجود در این فرآیندها می‌باشد [8]. با توجه به توانایی آنزیم‌های پکتیناز در کاهش ویسکوزیته و حذف ترکیبات پکتیکی، پیش تیمار آنزیمی شربت خام می‌تواند راه حلی مناسب برای بر طرف نمودن مشکلات مذکور نیز باشد [9].

هدف اصلی از این مطالعه بررسی و امکان‌سنجی کاربرد آنزیم پکتیناز جهت حذف ناخالصی‌ها از شربت خام چغندر قند و بهبود ویژگی‌های آن می‌باشد. از همین رو از روش سطح پاسخ برای بهینه سازی شرایط پیش تیمار آنزیمی (دما انکوباسیون، زمان واکنش و غلظت آنزیم) شربت خام چغندر استفاده گردید.

## 2- مواد و روش‌ها

### 2-1- مواد

این پژوهش در سطح آزمایشگاهی در کارخانه قند پیرانشهر صورت گرفت. نمونه‌گیری شربت خام در انتهای بخش دیفوزیون کارخانه (قبل از فرآیند تصفیه) انجام گرفت. دیفوزر مورد استفاده در کارخانه از نوع برجی (B.M.A) بود. برای تیمار آنزیمی از آنزیم *Pectinex XXL* استفاده شد که از کارخانه آذرکام تهیه شد. *Pectinex XXL* یک آنزیم تجاری است که از اسپرژیلوس نایجر و اسپرژیلو آکواتیکوس تهیه می‌شود و در صنایع غذایی کاربرد گسترده‌ای دارد. فعالیت *Pectinex XXL* حداقل برابر 1000 PECTU/ml می‌باشد. همه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق دارای درجه آزمایشگاهی بودند و از شرکت‌های معتبر تهیه شدند.

### 2-2- روش‌ها

در ابتدا به منظور حذف ذرات معلق نمونه‌های شربت از یک صافی پارچه‌ای عبور داده شدند. pH نمونه‌ها با استفاده از اسید سیتریک در pH 5/8 تنظیم و از طرح آزمایشات خارج گردید. در این pH میزان نورسیون ساکارز در حداقل مقدار خود می‌باشد [1] و آنزیم‌ها به خوبی کار می‌کنند [10]. برای هر یک از

استفاده گرديد. روش سطح پاسخ يك مجموعه ويژه از تكنيك‌هاي رياضي و آماری است كه برای طراحی آزمایشات، مدلسازی و بهينه‌سازي فرآيندها مفيد می‌باشد [13].

طراحی آزمایشات و آناليزهای آماری با استفاده از نرم افزار ديزاين اكسپرت مدل 10/0/1 انجام گرفت. آزمایشات بر اساس طرح مركب مرکزی صاف (CCRD) در پنج سطح و سه فاکتور با شش تکرار در نقطه مرکزی طراحی گرديد. زمان واكنش (20-100 دقیقه)، دمای گرمخانه‌گذاري (40-55 درجه سانتی گراد) و غلظت آنزيم (0/001-0/02 درصد حجمی/حجمی) نیز به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. دامنه متغیرها براساس آزمایشات اولیه و پژوهش‌های پيشين انتخاب گرديد. در آخر داده‌های بدست آمده از آزمایشات با يك مدل چند جمله‌ای درجه دوم برازش داده شدند:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (4)$$

که  $b_0$  ضريب ثابت،  $b_1, b_2, b_3$  ضرایب خطی،  $b_{11}, b_{22}, b_{33}$  ضرایب درجه دو،  $b_{12}, b_{13}, b_{23}$  ضرایب برهمکنش و  $X_1$  (زمان واكنش)،  $X_2$  (دمای گرمخانه‌گذاري) و  $X_3$  (غلظت آنزيم) متغیرهای وابسته بودند. توابع پاسخ (Y) شامل ويسکوزيته، کدورت، رنگ و درجه خلوص بود. کفایت مدل با استفاده از  $R^2$ ،  $R^2$  تعديل (اصلاح) شده<sup>1</sup> و تست عدم تطابق<sup>2</sup> مورد بررسی قرار گرفت. بهينه‌سازي پاسخ‌ها نیز با استفاده از روش‌های بهينه‌یابی عددی و گرافیکی نرم افزار مذکور انجام گرفت.

### 3- نتایج و بحث

#### 3-1- مدلسازی RSM (گزینش مدل مناسب)

به منظور حصول مدل‌های تجربی برای پيش‌بینی هر کدام از پاسخ‌ها (ويسکوزيته، رنگ، کدورت و درجه خلوص)، رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم (رابطه 4) بر داده‌های به دست آمده از آزمایش‌ها برازش شدند. سپس این مدل‌ها تحت آناليز آماری قرار گرفتند تا مدل مناسب گزینش گردد. به طور متداول

100 دور بر دقیقه با اسپیندل شماره 61 اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق انجام شد و نتایج بر حسب میلی پاسکال ثانیه گزارش گرديد.

#### 2-3-2- کدورت

کدورت نمونه‌ها با استفاده از یک توریدومتر دیجیتالی (Hach Company, Box 389, Loveland, Colo, USA) تعیین گردید و نتایج بر حسب NTU گزارش گرديد.

#### 2-3-3- رنگ

رنگ نمونه‌ها مطابق دستورالعمل ایکومزا و با استفاده از یک طیف سنج مدل UV-2100 (SCINCO, Seoul, South Korea) در طول موج 420 نانومتر تعیین گردید [11]. نتایج با استفاده از فرمول زیر محاسبه و بر حسب واحد ایکومزا (IU) گزارش گرديد:

$$C \text{ (IU)} = 10^5 \times A/L \times \text{Brix} \times \rho \quad (1)$$

که A جذب در طول موج 420 نانومتر؛ L طول مسیر عبور نور (mm)؛ Brix غلظت مواد جامد محلول در نمونه‌ها و  $\rho$  دانسیته نمونه‌ها می‌باشد.

#### 2-4-3-2- درجه خلوص

درجه خلوص و مقدار ساکارز نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل‌های ایکومزا و به روش زیر محاسبه شدند: 50 میلی‌لیتر از نمونه‌ها را همراه با 8 میلی‌لیتر محلول آلومینیوم سولفات (200 گرم بر لیتر) و 5 میلی‌لیتر محلول هیدرواکسید سدیم دو مولار در یک بالن حجمی 200 میلی‌لیتر ریخته و سپس به حجم رساندیم [12]. بعد از فیلتر کردن محتوای بالن، چرخش نوری نمونه‌ها ( $\alpha$ ) با استفاده از پلاریومتر (Saccharomat, Schmidt + Haensch, Germany) اندازه‌گیری شد. مقدار ساکارز و درجه خلوص براساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

$$POL = (2\alpha \times 100) / 66.4 \quad (2)$$

$$Q = (POL \times 100) / \text{Brix} \quad (3)$$

که POL میزان ساکارز (%);  $\alpha$  چرخش نوری نمونه‌ها (°); Q درجه خلوص (%) و Brix غلظت مواد جامد محلول (%) می‌باشد.

#### 2-4-2- طرح آزمایشات و آناليزهای آماری

در این پژوهش برای بررسی و بهينه‌سازي تاثیر پارامترهای فرآیند آنزیمی روی متغیرهای وابسته (پاسخ‌ها) از روش سطح پاسخ

1. adjusted R2  
2. lack of fit

آمارای معنی‌دار باشد یا نباشد. به این ترتیب بالا بودن  $R^2$  همیشه کفایت مدل را نشان نمی‌دهد. به همین دلیل بهتر است از  $R^2$  اصلاح‌شده نیز برای بررسی مناسب بودن مدل استفاده شود. برخلاف  $R^2$ ،  $R^2$  اصلاح‌شده تنها در صورتی افزایش می‌یابد که شرایط جدید، مدل را بیش از حالتی که از نظر تصادفی مورد انتظار است، بهبود بخشد [14].

نتایج حاصل از آنالیز واریانس و برازش داده‌ها در طرح مرکب مرکزی در جدول 2 نشان داده شده است. بر اساس این نتایج مشخص شد که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به شکل مناسبی با متغیرهای پاسخ (Y) برازش پیدا کرده است. با توجه به مقادیر بالاتر  $R^2$ ،  $R^2$  اصلاح‌شده و همچنین غیر معنی‌دار بودن آزمون عدم تطابق مربوط به مدل‌های درجه دوم نتیجه می‌گیریم که در برازش داده‌ها مدل درجه دوم توان بیشتری را دارا می‌باشد (جدول 2).  $R^2$  برای همه متغیرهای پاسخ بالاتر از 0/85 بود که نشان می‌دهد مدل مورد نظر به شکل مناسبی تغییرات در پاسخ‌ها را پیش‌گویی می‌کند.

جهت بررسی صحت مدل از ضریب تبیین ( $R^2$ )،  $R^2$  اصلاح‌شده و آزمون عدم تطابق استفاده می‌شود. از نظر آمارای مدلی مناسب است که آزمون عدم تطابق آن معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین مقدار ضریب تبیین ( $R^2$ ) و  $R^2$  اصلاح‌شده باشد.

معنی‌دار بودن آزمون عدم تطابق برای یک مدل، بیانگر آن است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند و در نتیجه نمی‌توان از مدل برای پیش‌گویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود. بنابراین عدم معنی‌داری عدم تطابق بدین معنی است که مدل توانسته است به خوبی بر داده‌های مورد بررسی برازش شود. ضریب تبیین ( $R^2$ ) به عنوان نسبت تغییرات توصیف شده توسط مدل به تغییرات کل بیان می‌شود که معیاری از درجه تناسب برازش می‌باشد و مقدار عددی آن بین صفر و یک تغییر میکند و هرچه مقدار  $R^2$  به یک نزدیکتر شود، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد [13].

لازم به ذکر است که اضافه کردن یک متغیر به مدل، همیشه باعث افزایش  $R^2$  می‌شود صرف‌نظر از اینکه متغیر اضافه شده از نظر

Table 2 Statistical analysis results of fitted model on the response data.

Source	$R^2$	Adjusted- $R^2$	p-Value for lack of fit
Viscosity			
Linear	0.35	0.22	0.001
Quadratic	0.92	0.85	0.065 <sup>ns</sup>
Turbidity			
Linear	0.28	0.15	0.000
Quadratic	0.96	0.93	0.11 <sup>ns</sup>
Color			
Linear	0.25	0.11	0.03
Quadratic	0.88	0.78	0.46 <sup>ns</sup>
Purity			
Linear	0.08	-0.08	0.000
Quadratic	0.96	0.92	0.19 <sup>ns</sup>

ns = not significant.

همانطور که در جدول 3 مشاهده می‌شود اثرات خطی دمای گرمخانه‌گذاری ( $P<0/001$ )، زمان واکنش ( $P<0/05$ ) و غلظت آنزیم ( $P<0/05$ ) معنی‌دار بود. اثرات کوادراتیک (درجه دوم) و متقابل هم نشان داد که تنها دمای گرمخانه‌گذاری دارای اثر کوادراتیک مثبت معنی‌دار ( $P<0/001$ ) می‌باشد و اثرات متقابل متغیرها معنی‌دار نبودند.

### 3-2- ویسکوزیته

ویسکوزیته معیاری از مقاومت داخلی به جریان می‌باشد که در طراحی واحدهای مختلف صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کارخانه قند نیز از این امر مستثنی نیست و تغییر در ویسکوزیته شربت تأثیر قابل توجهی روی مصرف انرژی کارخانه می‌گذارد [15].

**Table 3** Regression coefficients of the second-order polynomial model for the response variables in actual values.

Regression coefficient	Viscosity	Turbidity	Color	Purity
b <sub>0</sub>	17.50	2365.22	54690.54	63.14
b <sub>1</sub>	-9.39×10 <sup>-3</sup> *	-2.95	-28.87	0.096
b <sub>2</sub>	-0.57***	-90.21***	-2037.29**	0.92**
b <sub>3</sub>	-18.86*	-4266.54*	-1.55×10 <sup>+5</sup>	132.94
bb <sub>12</sub>	9.46×10 <sup>-5</sup>	0.04	-0.033	-9.31×10 <sup>-4</sup> **
bb <sub>13</sub>	0.03	26.60	168.36	-0.35
bb <sub>23</sub>	0.17958	-25.14	2083.16	-0.85
b <sub>11</sub>	2.63×10 <sup>-5</sup>	7.34×10 <sup>-3</sup> *	0.23*	-3.9×10 <sup>-4</sup> ***
b <sub>22</sub>	5.73×10 <sup>-3</sup> ***	0.90***	20.68***	-8.77×10 <sup>-3</sup> ***
b <sub>33</sub>	155.50	1.62×10 <sup>+5</sup> ***	1.41×10 <sup>+6</sup>	-3611.18***

Subscripts: 1= reaction time, 2 = incubation temperature, 3 = enzyme concentration.

\* Significant at 0.05 level.

\*\* Significant at 0.01 level.

\*\*\* Significant at 0.001 level.

(خصوصاً ترکیبات پکتیکی) وارد شربت می‌شوند و یک حالت کدر ایجاد می‌کنند [17]. بنابراین، شاخص کدورت می‌تواند معیار مناسبی برای تخمین مقدار ذرات معلق و کلوئیدها باشد. نتایج حاصل از ضرایب مدل چند جمله‌ای درجه دوم نشان داد که متغیرهای وابسته (زمان واکنش، دمای گرمخانه‌گذاری و غلظت آنزیم) به طور خطی و کوادراتیک بر کدورت اثر معنی‌دار داشتند. اما اثرات متقابل متغیرها معنی‌دار نبودند (جدول 3).

شکل 2 (الف) وابستگی کدورت به غلظت آنزیم و زمان واکنش در دمای ثابت (47/5 درجه سانتی‌گراد) را نشان می‌دهد. همانطور که در منحنی مشاهده می‌کنیم با افزایش غلظت آنزیم، در ابتدا کدورت نمونه‌ها کاهش و سپس افزایش پیدا کرد. کاهش کدورت در غلظت‌های پایین آنزیم و زمان‌های کم مربوط به حذف ذرات معلق و ترکیبات کلوئیدی می‌باشد. اما با افزایش زمان واکنش یا غلظت آنزیم ممکن است برخی از توده‌های تجمع‌یافته در اثر فعالیت بیش از حد آنزیم دوباره به حالت محلول درآیند و کدورت دوباره افزایش پیدا نماید.

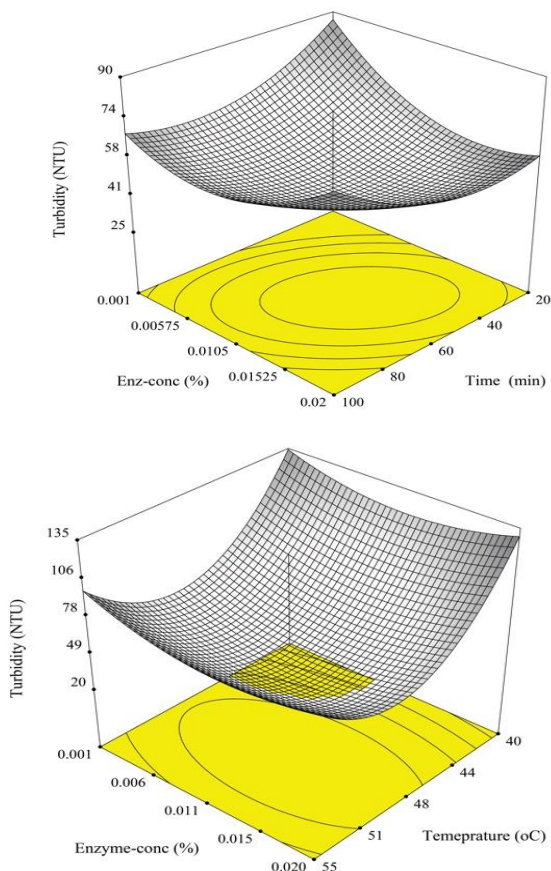
تغییرات ویسکوزیته در مقابل تغییرات غلظت آنزیم و زمان واکنش در دمای ثابت (47/5 درجه سانتی‌گراد) در شکل 1 (الف) نشان داده شده است. در دمای ثابت، ویسکوزیته نمونه‌های شربت با افزایش غلظت آنزیم و زمان واکنش کاهش پیدا کرد. کاهش ویسکوزیته ممکن است ناشی از حذف ترکیبات پکتیکی باشد که منجر به کاهش ظرفیت نگهداری آب و در نتیجه آزاد شدن آب آزاد به محیط می‌گردد [16].

شکل 1 (ب) کاهش ویسکوزیته شربت با افزایش دمای گرمخانه‌گذاری را نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار نیز مشخص است آنزیم‌های پکتیناز در یک بازه دمایی مشخص فعال هستند و اثر کوادراتیک بر اثر خطی غالب می‌باشد. بنابراین، اگر آنزیم‌های پکتیناز در یک شرایط مطلوب دمایی قرار گیرند، می‌توانند ویسکوزیته را به شکل مؤثری کاهش دهند. کاهش ویسکوزیته نیز می‌تواند کارایی مراحل بعدی (فیلتراسیون، اواپراسیون و تغلیظ) را به شکل قابل توجهی افزایش دهد [17, 1].

### 3-3- کدورت

در مرحله دیفوزیون، برخی از ماکرومولکول‌های نامطلوب چغندر

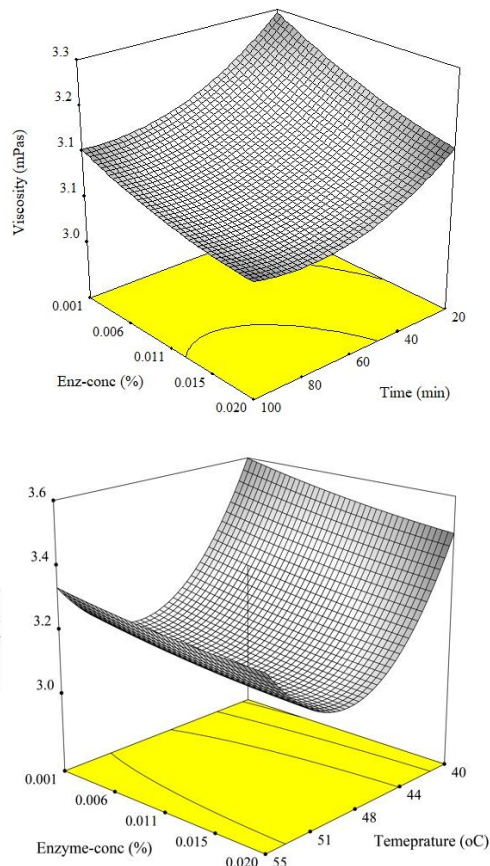
می‌باشد. اما، ملانوئیدین‌ها در اثر انجام واکنش میلارد بین اسیدهای آمینه و قندهای احیاءکننده تشکیل می‌گردند [18].



**Fig 2** The effect of (a) pectinase concentrations and time (at  $T = 47.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), and (b) pectinase concentrations and temperature (at  $t = 60\text{ min}$ ) on the turbidity.

این رنگدانه‌ها اغلب در فاصله بین کردن چغندرها و حرارت دادن شربت در دیفیوزر پدید می‌آیند [1]. آنالیز واریانس داده‌های رنگ (جدول 3) شربت نشان داد که برخلاف زمان واکنش و غلظت آنزیم، اثر خطی دمای گرمخانه‌گذاری در سطح 0/01 معنی‌دار بود. همچنین مشخص شد که رنگ نمونه‌ها با یک روند کوادراتیکی تحت تاثیر زمان واکنش ( $P < 0/05$ ) و دما انکوباسیون ( $P < 0/001$ ) می‌باشد. اما، اثر متقابل بین متغیرها معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ).

شکل 3 اثر متغیرهای زمان واکنش، دمای گرمخانه‌گذاری و غلظت آنزیم بر رنگ نمونه‌های شربت را نشان می‌دهد. رنگ



**Fig 1** The effect of (a) pectinase concentrations and reaction (at  $T = 47.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), and (b) pectinase concentrations and temperature (at  $t = 60\text{ min}$ ) on the viscosity.

نتایج همچنین نشان داد که دمای گرمخانه‌گذاری هنگام تیمار آنزیمی تأثیر قابل‌توجهی بر کدورت نمونه‌ها داشت (شکل 2 (ب)). می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که کدورت نمونه‌های شربت حساسیت بالایی به دمای گرمخانه‌گذاری دارند. به طوری‌که در دماهای پایین ( $> 44$  درجه سانتی‌گراد)، کدورت بسیار زیاد بود و با افزایش دما به شکل قابل‌توجهی کاهش پیدا می‌کند. بعد از این مرحله، افزایش بیشتر درجه حرارت ( $< 49$  درجه سانتی‌گراد) موجب می‌شود تا کدورت دوباره افزایش پیدا کند.

### 3-4- رنگ

ملانین و ملانوئیدین رنگدانه‌هایی هستند که در شربت خام چغندر وجود دارند. ملانین نتیجه واکنش اکسیداسیون آنزیمی ترکیبات فنولی یا واکنش بین ترکیبات فنولی با آمینو اسیدها

درجهٔ سانتی‌گراد به کمترین مقدار ممکن رسید. اما بعد از آن و با افزایش بیشتر دما، رنگ نمونه‌ها دوباره افزایش پیدا کرد. به طور کلی آنزیم‌ها تابعی از دمای گرمخانه‌گذاری می‌باشند و زمانی که دما افزایش (پایین‌تر از دمای دناتوراسیون) می‌یابد نرخ فعالیت آنزیم‌ها نیز افزایش می‌یابد [19].

### 3-5- درجه خلوص

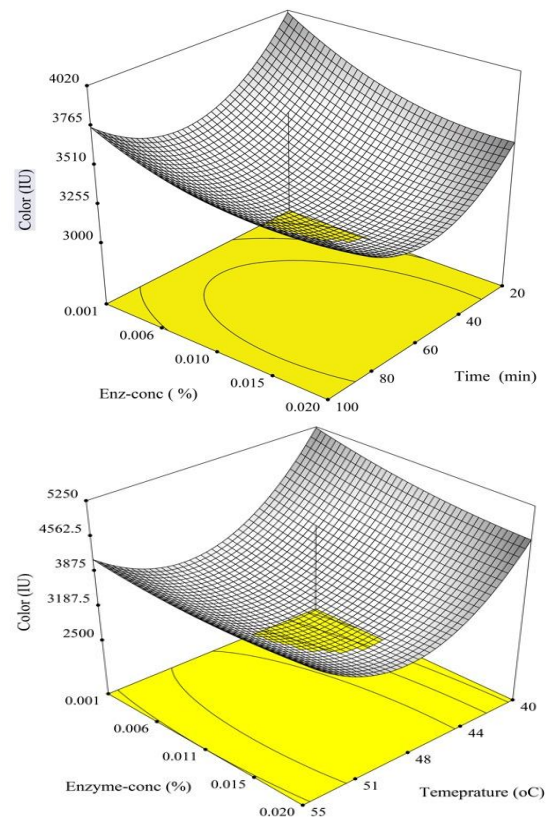
درجهٔ خلوص اصطلاحی است که تکنولوژیست‌های صنعت قند از آن برای توصیف کیفیت شربت و مقدار شکر که می‌توان از آن (شربت) استخراج کرد، استفاده می‌کنند.

جدول 3 نشان داد که درجهٔ خلوص عمدتاً تحت تأثیر دمای گرمخانه‌گذاری می‌باشد به طوری که اثرات خطی و کوادراتیک آن به ترتیب در سطوح  $P < 0/05$  و  $P < 0/001$  معنی‌دار بود. نتایج همچنین نشان داد که همه متغیرها دارای اثر کوادراتیک بودند ( $P < 0/001$ ). با این وجود، از بین اثرات متقابل نیز تنها زمان واکنش و دمای گرمخانه‌گذاری دارای اثر متقابل معنی‌دار بودند.

شکل 4 وابستگی تغییرات درجهٔ خلوص به غلظت آنزیم، زمان واکنش و دمای گرمخانه‌گذاری را نشان می‌دهد. می‌توان مشاهده کرد که در یک دما و غلظت ثابت، با افزایش زمان واکنش درجهٔ خلوص شربت افزایش می‌یابد. اما، هنگامی که زمان واکنش از حدود 55 دقیقه بیشتر می‌شود درجهٔ خلوص کم کم شروع به کاهش می‌کند و در انتهای زمان به حداقل خود می‌رسد (شکل 4 (الف)). تأثیر دما بر تغییرات درجه خلوص نیز در شکل 4 (ب) آورده شده است.

همانگونه که مشاهده می‌کنیم در یک زمان ثابت (60 دقیقه) با افزایش دما، درجهٔ خلوص شربت افزایش پیدا می‌کند و در دمای 47/5 درجهٔ سانتی‌گراد به بیشترین مقدار خود می‌رسد. البته باید توجه داشت که دماهای بسیار بالا تأثیر عکس دارند و موجب کاهش درجهٔ خلوص می‌گردند. معنی‌دار بودن اثر خطی و کوادراتیک ( $P < 0/05$ ) و نیز مؤید این مطلب می‌باشد (جدول 3). وجود نقاط بیشینه و کمینه در نمودارها نیز درستی تعیین بازه‌ی متغیرها را نشان می‌دهد.

نمونه‌های شربت کاملاً تحت تأثیر تغییر غلظت آنزیم بود و روند مشابهی با تغییرات کدورت در اثر تغییرات غلظت آنزیم ( $v/v$  0/001-0/02) را نشان داد. تغییرات رنگ به این صورت بود که متناسب با افزایش غلظت آنزیم رنگ نمونه‌ها کاهش پیدا کرد (شکل 3 (الف)). کاهش رنگ نمونه‌ها ممکن است ناشی از جذب سطحی رنگدانه‌ها روی توده‌های تجمع‌یافته (فلوک‌ها) باشد [17]. هنگام واکنش آنزیمی ترکیبات پکتیکی (کلوئیدهای پکتین-پروتئین) آرام آرام از حالت پایدار خارج می‌شوند و تشکیل فلوک‌ها را می‌دهند. این فلوک‌ها هنگام ته‌نشین شدن ترکیبات رنگی موجود در شربت را جذب و از شربت خارج می‌کنند.



**Fig 3** The effect of (a) pectinase concentrations and time (at  $T = 47.5^{\circ}\text{C}$ ), and (b) pectinase concentrations and temperature (at  $t = 60$  min) on the color.

همان طور که در شکل 3 (ب) مشاهده می‌کنیم، رنگ نمونه‌ها متناسب با افزایش دما کاهش پیدا کرد تا جایی که در دمای 49

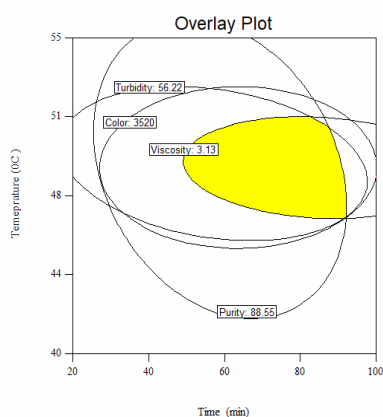


بهینه‌سازی عددی به مطالعه مسائلی اطلاق می‌شود که جستجو برای یافتن حداکثر یا حداقل یک تابع حقیقی با استفاده از گزینش سیستماتیک مقادیر متغیرهای حقیقی یا صحیح از میان یک مجموعه امکان‌پذیر انجام می‌شود. در تکنیک مذکور، فضای پاسخ با استفاده از مدل‌های ایجاد شده و به منظور یافتن بهترین شرایطی که اهداف بهینه‌سازی مورد نظر را برآورده می‌کنند، جستجو می‌شود [14, 20]. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه‌سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ‌ها و متغیرهای مستقل تنظیم خواهد شد. برای این منظور ویسکوزیته، رنگ و کدورت در حداقل و درجه خلوص در حداکثر مقدار خود در نظر گرفته شدند.

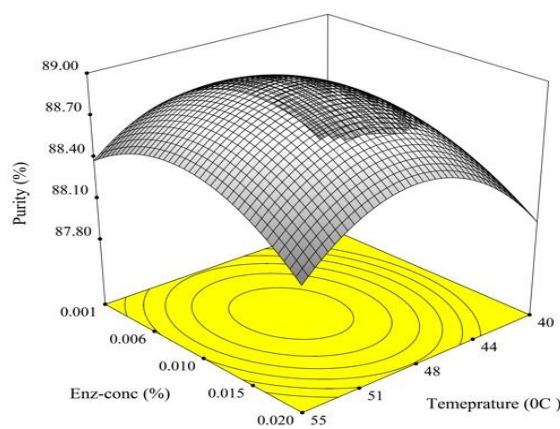
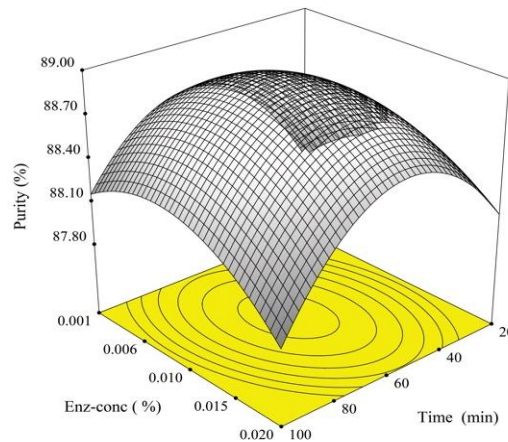
بنابراین، با منطبق کردن شرایط و نمودارهای این چهار پارامتر پاسخ (شکل 5) شرایط بهینه برای تصفیه شربت خام چغندر بدست آمد که به شرح زیر می‌باشد:

زمان واکنش: 68/58 دقیقه؛ دمای گرمخانه‌گذاری: 48/65 و غلظت آنزیم: 0/012 درصد حجمی/حجمی.

شربت تصفیه شده با این شرایط دارای حداقل مقدار ویسکوزیته (3/09 میلی پاسکال)، رنگ (3179/80IU) و کدورت (44/09NTU) و حداکثر مقدار درجه خلوص (88/93 درصد) بود. شکل 5 نمودار حاصل از منطبق سازی نمودارهای پاسخ برای بهینه‌سازی شرایط تصفیه را نشان می‌دهد. در این نمودار نواحی که دارای بهترین شرایط ترکیبی از فاکتورها می‌باشند، نشان شده است.



**Fig 5** Optimum conditions (yellow region) were color, obtained by overlaying of the viscosity, and turbidity, purity plots as functions of temperature time (at pectinase concentration = 0.012 v/v %).



**Fig 4** The effect of (a) pectinase concentrations and time (at  $T = 47.5^\circ\text{C}$ ), and (b) pectinase concentrations and temperature (at  $t = 60$  min) on the purity.

کاهش درجه خلوص شربت در سطوح بالای متغیرها ممکن است ناشی از فعالیت زیاد آنزیم و محلول کردن دوباره ترکیبات پکتیکی باشد. بنابراین، استفاده از آنزیم‌ها در تصفیه شربت خام بسیار حساس می‌باشد و بایستی شرایط واکنش به خوبی کنترل گردد.

### 3-6- بهینه‌سازی

شرایط عملیاتی بهینه برای تصفیه شربت خام چغندر قند با استفاده از آنزیم پکتیناز، زمان‌ها و دماهای مختلف روی پارامترهای ویسکوزیته، رنگ، کدورت و درجه خلوص شربت با استفاده از تکنیک‌های بهینه‌سازی عددی<sup>1</sup> و گرافیکی<sup>2</sup> نرم افزار Design Expert جستجو شد. در علم ریاضیات، واژه

1. Numerical optimization
2. Graphical optimization

- food science & technology, 2010. 45(4): p. 635-641.
- [6] Birch, G.G., N. Blakebrough, and K.J. Parker, Enzymes and food processing. 2012: Springer Science & Business Media.
- [7] Lu, X., et al., Purification and characterization of exo-polygalacturonase from *Zygoascus hellenicus* V25 and its potential application in fruit juice clarification. Food Science and Biotechnology, 2016. 25(5): p. 1379-1385.
- [8] Hakimzadeh, V., et al., The potential of microfiltration and ultrafiltration process in purification of raw sugar beet juice. Desalination, 2006. 200(1-3): p. 520-522.
- [9] Norjana, I. and A. Noor Aziah, Quality attributes of durian (*Durio zibethinus* Murr) juice after pectinase enzyme treatment. International Food Research Journal, 2011. 18 (3).
- [10] Acuña-Argüelles, M., et al., Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Applied microbiology and biotechnology, 1995. 43(5): p. 808-814.
- [11] ICUMSA, Methods Book, International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. ICUMAS publications, Operations Service, Science. c/o British Sugar plc., 2000.
- [12] Almohammed, F., H. Mhemdi, and E. Vorobiev, Purification of juices obtained with innovative pulsed electric field and alkaline pressing of sugar beet tissue. Separation and Purification Technology, 2017. 173: p. 156-164.
- [13] Montgomery, D.C. and R.H. Myers, Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Raymond H. Meyers and Douglas C. Montgomery. A Wiley-Interscience Publications, 1-995.
- [14] Jahed, E., M.H.H. Khodaparast, and A.M. Khaneghah, Bentonite, temperature and pH effects on purification indexes of raw sugar beet juice to production of inverted liquid sugar. Applied Clay Science, 2014. 102: p. 155-163.
- [15] Cantor, J.M., Progress in food engineering research and development. 2008: Nova Publishers

#### 4- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، آنزیم پکتیناز به طور موفقیت آمیزی برای تصفیه و شفاف‌سازی شربت خام چغندر مورد استفاده قرار گرفت. تأثیر شرایط عملیاتی (زمان واکنش، دمای گرمخانه‌گذاری و غلظت آنزیم) روی شاخص‌های تصفیه‌ای (ویسکوزیته، کدورت، رنگ و درجه خلوص) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای انجام واکنش 0/012 درصد غلظت آنزیم، 48/65 درجه سانتی‌گراد دما و 65/58 دقیقه زمان واکنش می‌باشد. بنابراین، از آنجایی که صنعت قند و شکر یک صنعت انرژی‌بر است، استفاده از آنزیم پکتیناز به عنوان یک پیش‌تیمار می‌تواند جهت کاهش هزینه‌ها و تسهیل انجام مراحل بعدی (تصفیه شیمیایی، جداسازی غشایی، اواپراسیون و کریستالیزاسیون) مفید باشد. در یک نتیجه‌گیری کلی نیز می‌توان گفت که کاربرد آنزیم پکتیناز در تصفیه شربت خام چغندر مزایای زیر را به همراه خواهد داشت:

- کاهش مصرف آهک
- کاهش انسداد و گرفتگی فیلتر و غشاها
- بهبود خصوصیات رئولوژیکی شربت برای تسهیل مراحل بعدی
- کاهش مصرف انرژی

#### 5- منابع

- [1] Asadi, M., Beet-sugar handbook. 2006: John Wiley & Sons.
- [2] Lević, L., et al., CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> and AlCl<sub>3</sub> & NaHCO<sub>3</sub> as possible pectin precipitants in sugar juice clarification. International journal of food science & technology, 2007. 42(5): p. 609-614.
- [3] Van der Poel, P., Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture PW van der Poel, H. Schiweck, T. Schwartz. Berlin: Verlag Dr. Bartens KG, 1998: p. 479-563.
- [4] Loginova, K., et al., Better lime purification of sugar beet juice obtained by low temperature aqueous extraction assisted by pulsed electric field. LWT-Food Science and Technology, 2012. 46(1): p. 371-374.
- [5] Ribeiro, D.S., et al., Enzymes in juice processing: a review. International journal of

- [19] Kashyap, D., et al., Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 2001. 77(3): p. 215-227.
- [20] Sit, N., S.C. Deka, and S. Misra, Optimization of starch isolation from taro using combination of enzymes and comparison of properties of starches isolated by enzymatic and conventional methods. *Journal of food science and technology*, 2015. 52(7): p. 4324-4332.
- [16] Rai, P., et al., Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2004. 64(3): p. 397-403.
- [17] Downing, D.L., *Processed apple products*. 2012: Springer Science & Business Media.
- [18] Godshall, M., et al., Progress in beet sugar colorant research. *Journal of sugar beet research*, 1991. 28(3-4): p. 155-165.

## Optimization of enzymatic pretreatment of raw sugar beet juice using response surface methodology

Arjeh, E. <sup>1\*</sup>, Pirouzifard, M. K. <sup>2</sup>, Pirsā, S. <sup>3</sup>

1. PhD student in Food Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia, Iran
2. Associate Professor of Urmia University Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia, Iran
3. Assistance Professor of Urmia University Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia, Iran

(Received: 2018/08/05 Accepted:2019/04/09)

In this research, response surface based on central composite design (3-factor 5-level) was applied to estimate the efficacy of independent variables on quality indexes (dependent variables) of raw beet juice. Hence, the effect of different durations (20-100 min), temperatures (40-55 °C), and at various concentration level of pectinase (0.001-0.02 % v/v) on viscosity, color, turbidity and purity of sugar beet juice were investigated and successfully coordinated by a second-order polynomial model ( $R^2 > 0.85$ ). The experiments indicated that the temperature was the most important variable affecting the characteristics of the raw juice as it exposes a significant effect on the responses. The recommended enzymatic treatment condition from the study was at 0.012 % enzyme concentration at 49°C for 65 min.

**Keyword:** Sugar beet; Enzymatic pre-treatment; Pectinase enzyme; Response surface methodology

---

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