

بهینه‌سازی فرایند شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی به وسیله پکتیناز تجاری تثبیت‌شده با روش سطح‌پاسخ

عاطفه عبدالله‌زاده¹، زهرا بیگ‌محمدی^{2*}، مهدیه قمری³

1- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، ایران

2- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

3- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی بصیر آبیگ، قزوین، ایران

(تاریخ دریافت: 97/11/11 تاریخ پذیرش: 99/02/07)

چکیده

آنزیم پکتیناز اهمیت زیادی در صنایع غذایی دارد. توانایی تجزیه پکتین، عامل اصلی کدورت آب میوه‌ها را دارد. به همین دلیل در شفاف‌سازی و توانایی حفظ خواص حسی و کیفیت مواد مغذی نقش مهمی را ایفا می‌کند. استفاده از آنزیم‌ها در صنعت هزینه بر است و باید تدابیری اندیشیده شود تا بتوان از مقدار کمی آنزیم بدون تغییر در میزان کارایی آن، برای چندین بار متوالی استفاده شود. در این پژوهش آنزیم پکتیناز تجاری درون دانه‌های آلژینات تثبیت، و فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده تحت شرایط دما و pH مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بهترین دما و بهترین pH برای آنزیم آزاد و تثبیت‌شده به ترتیب 45 °C و 3 و تعیین گردید. روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی با استفاده از 3 متغیر غلظت آنزیم تثبیت‌شده در محدوده (2-6%)، دما (30-45 °C) و زمان (15-45 دقیقه) در 3 سطح مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آماری و بهینه‌سازی در جهت دستیابی به کمترین کدورت آب گوجه‌فرنگی در کمترین میزان آنزیم مصرفی انجام شد. نتایج نشان داد شرایط بهینه غلظت آنزیم تثبیت‌شده، دما و زمان جهت رسیدن به 27/09 برابر بازده شفاف‌سازی به ترتیب 2%، 45 °C و 45 دقیقه با تعیین گردید.

کلید واژگان: پکتیناز، شفاف‌سازی، آب گوجه‌فرنگی، سطح پاسخ، بهینه‌سازی

*مسئول مکاتبات: Beigmohammadi.zahra@gmail.com

1- مقدمه

پکتین‌ها دارای دسته‌بندی‌های مختلفی هستند و به طور عمده شامل پلی‌گالاکتوروناز (PG)، پلی‌متیل‌گالاکتوروناز (PMG)، پکتین‌متیل‌استراز (PME)، پکتین‌لیاز (PL)، پلی‌گالاکتورونات‌لیاز (PGL) می‌باشند [1]. این آنزیم‌ها در صنایع مختلف مانند شفاف‌سازی آبمیوه، سبزیجات و نوشیدنی‌های الکلی [2]، استخراج قند میوه و روغن‌های گیاهی، صنعت پارچه و سفید کردن کاغذ مورد استفاده قرار می‌گیرند [3, 4].

جهت استفاده از آنزیم‌ها در صنعت، بررسی پایداری آن‌ها مقابل تغییرات شرایط محیطی ضروری است [5]. آنزیم‌هایی که به شکل آزاد به کار می‌روند پایداری ضعیفی در برابر pH، حرارت و سایر عوامل محیطی دارند و بازیابی آن‌ها برای استفاده مجدد نیز دشوار است [6]. روش‌های مختلفی جهت تثبیت آنزیم‌ها به منظور استفاده مجدد آن‌ها وجود دارد از جمله: جذب سطحی، میکروانکپسولاسیون، اتصالات عرضی یا مقاطع، پیوند کوالانسی و به دام‌اندازی¹، که در این روش مولکول‌های آنزیمی به حالت محلول و آزاد هستند اما حرکتشان توسط ساختمان شبکه ژل محدود می‌گردد. جهت این کار از پلیمرهای مختلفی استفاده می‌شود که در این میان آلزینات کلسیم با توجه به زیست سازگاری، هزینه کم، در دسترس بودن و مقاومت در برابر آلودگی میکروبی در مقایسه با دیگر پلیمرهای مشابه طبیعی و مصنوعی برای تثبیت آنزیم مؤثرتر است [7].

حذف پوست و دانه از گوجه‌فرنگی می‌تواند به افزایش بازدهی در شفاف‌سازی کمک کند. در روش‌های سنتی با شوک حرارتی سرد یا گرم اقدام به غیر فعال کردن پکتین متیل‌استراز و پلی‌گالاکتوروناز مینمودند. به این ترتیب از فساد حاصل از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌گردید [8]. فرایندهای غشایی شامل میکروفیلتراسیون² و اولترافیلتراسیون³ روش‌های سنتی دیگر هستند که نیاز به انرژی و هزینه کمتری دارند این فرایندها روش‌های جداسازی غیر حرارتی هستند که باعث تغییر فاز نمی‌شوند و حداقل افت پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، شکرها و نمک‌ها را به همراه دارد [8]. تحقیقات متعددی حذف پکتین و ایجاد

شفافیت آبمیوه‌ها و سبزیجات توسط آنزیم‌ها را تحت تأثیر عوامل مختلف مانند غلظت آنزیم، دما و زمان بررسی نمودند [8, 9, 10].

امروزه با صنعتی شدن شهرها و افزایش آلودگی‌ها، پزشکان به مصرف انواع سبزیجات در وعده‌های غذایی توصیه بیشتری می‌کنند مطالعات نشان داده است که مصرف گوجه‌فرنگی به اشکال مختلف خواص بسیاری دارد از جمله مصرف گوجه‌فرنگی با جلوگیری از وقوع مشکلات حاد قلبی و عروقی، جلوگیری از افزایش آترواسکلروزیس⁴ اولیه و مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی ارتباط دارد علاوه بر این نشان داده شده است که آب گوجه‌فرنگی شفاف شده تجمع پلاکت‌های انسانی را در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2 یا اختلال تحمل گلوکز مهار می‌کند [11]. مصرف آب گوجه‌فرنگی باعث کاهش التهاب سیستمیک در زنان دارای اضافه وزن و چاقی می‌شود [12]. آب گوجه‌فرنگی سطح کلسترول LDL را کاهش و مقاومت آن را در برابر اکسایش افزایش می‌دهد [13].

انواع پلیمرهای طبیعی و سنتزی مانند آلزینات، آگار و پلی‌آکریلامید برای به دام‌اندازی آنزیم‌ها و سلول‌ها استفاده شده‌اند. توپینگ و همکاران در سال 2008 تثبیت پکتیناز را با به دام‌اندازی و اتصال چند نقطه‌ای در بستر ژل آگار بررسی کردند [14]. رحمان و همکاران در سال 2013 تثبیت پکتیناز را در کلسیم آلزینات مورد بررسی قرار دادند [7]. همین محققان در سال 2014 تثبیت آنزیم پکتیناز را در بستر کیتوزان مورد بررسی قرار دادند [15]. کریمی در سال 1394 آنزیم سلولاز و پکتیناز را با به دام‌اندازی در کلسیم آلزینات مورد بررسی قرار داد [16]. بوگرا و همکاران در سال 2013 تثبیت پکتین متیل‌استراز را در بستر آلزینات کلسیم مورد بررسی قرار دادند [17].

هدف از انجام این تحقیق بهینه‌سازی شفاف‌کردن آب گوجه‌فرنگی (همراه با پوست و دانه) جهت کاربرد آن در فرمولاسیون نوشیدنی‌های مختلف است. به این منظور شرایط تثبیت آنزیم پکتیناز تجاری در دانه‌های⁵ آلزینات، در مقادیر مختلف آنزیم تثبیت شده، شرایط مختلف دما و زمان بررسی گردید.

1. Entrapment
2. Microfiltration
3. Ultrafiltration

4. Atherosclerosis
5. Beads

2- مواد و روش ها

2-1- مواد

آنزیم تجاری 1002 (مخلوط آنزیمی پکتیناز، بتا گلوکوناز، زایلاناز؛ آرتین شیمی، ایران) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. سدیم آلزینات و پکتین سیب (سیگما آلدریج، آمریکا) و بقیه موارد شامل کلسیم کلرید، 3 و 5 دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)¹، اسید گالاکتورونیک، آلبومین سرم گاوی، نمک تارتارات سدیم پتاسیم، بافر فسفات، معرف فولین، کربنات سدیم و هیدروکسید سدیم و سولفات مس 5 آبه، استات سدیم، اسید استیک، اتانول با خلوص 96% از نمایندگی شرکت مرک، آلمان تهیه گردیدند.

2-2- روش ها

2-2-1- تثبیت آنزیم

جهت تثبیت آنزیم درون دانه های آلزینات، توسط سرنگ 5 ml محلول سدیم آلزینات و آنزیم باهم به حجم 10cc، داخل بشر محتوی 20cc کلرید کلسیم 0/2 مولار که بر روی همزن مغناطیسی (Sci finetech- کره جنوبی) با دور کم حدود 50 دور در دقیقه و بدون حرارت تا زمان تشکیل شدن دانه ها قرار گرفته، به صورت قطره ای اضافه گردید. پس از تشکیل شدن دانه های آلزینات کلسیم جهت تکمیل فرایند نفوذ و کامل شدن غشای ژله ای پس از طی مدت 30 دقیقه دانه ها از محلول باقی مانده، به کمک کاغذ صافی جداسازی شدند [18].

2-2-2- تعیین میزان فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیم پکتیناز مطابق روش آلاگز و همکاران (2016) بر اساس میزان گالاکتورونیک باقی مانده [19] به صورت زیر تعیین گردید: 50 میکرولیتر محلول آنزیمی به 250 مایکرولیتر محلول پکتین با غلظت 1 میلی گرم بر میلی لیتر در بافر استات با pH=5 اضافه شد. پس از همزدن با سرعت کم به کمک دست یا همزن مغناطیسی به مدت 30 دقیقه در دمای 30 درجه سانتی گراد 300 میکرولیتر معرف DNS (شامل 20 میلی لیتر سود 2 نرمال، 1 گرم دی نیترو سالیسیلیک اسید، 30 گرم نمک راشل) به هریک از محلول ها اضافه گردید و لوله های حاوی نمونه (آنزیم، سوپسترا،

معرف) به مدت 10 دقیقه درون حمام آب گرم یا بن ماری (Rad lab- ایران) با دمای جوش قرار گرفتند. بعد از اتمام این مدت زمان نمونه ها درون ظرف حاوی یخ تا زمانی که مقداری خنک شوند قرار داده شد و سپس با آب مقطر تا حجم نهایی 5 میلی لیتر رقیق شدند. جذب هر یک از نمونه ها در طول موج 540 نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Philler scientific- آمریکا) تعیین گردید و اعداد در منحنی استاندارد گالاکتورونیک اسید قرار گرفتند. جهت تعیین فعالیت آنزیم تثبیت شده، نیز میزان 0/05 گرم دانه حاوی آنزیم توسط ترازو با حساسیت 0/001 گرم (Sartorius مدل 12u-15-practum-آلمان) وزن شد و به پکتین اضافه شد و مطابق روش ذکر شده برای آنزیم آزاد، فعالیت آنزیم تثبیت شده تعیین گردید.

2-2-3- بهینه سازی شفاف سازی آب گوجه فرنگی

با استفاد از روش سطح پاسخ و طرح مکعب مرکزی (CCD)² با 3 فاکتور (میزان آنزیم تثبیت شده، دما و زمان) و سه سطح (جدول 1) شامل 6 تکرار در نقطه مرکزی با $\alpha=1$ و متغیر وابسته یا پاسخ (میزان کدورت آب گوجه فرنگی)، 20 آزمایش توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت (DX7) طراحی گردید. گروه تیمارهای مرکزی شامل 6 نمونه بوده که همگی متغیرها در سطح صفر تعریف شده اند. گروه تیمارهای محوری شامل 6 نمونه و ترکیبی از سطوح -1، +1 و صفر، و گروه تیمارهای مکعبی شامل 8 نمونه که ترکیبی از سطوح -1 و +1 بودند. یک مدل چند جمله ای درجه دوم (معادله 1) به داده های تجربی برازیده شد:

معادله (1)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^5 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^5 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon_{ij}$$

که Y پاسخ (میانگین خطای مطلق) و β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای عرض از مبدا، خطی، درجه دوم و برهمکنش ها بوده و X_i و X_j متغیرهای مستقل می باشند. تحلیل سطح پاسخ و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه 7 صورت پذیرفت.

Table 1 Range of variables at different levels for the Optimization of immobilization

Name	Units	Type	Low	Center	High
Enzyme	%	Independent variable	-1(2)	0(4)	+1(6)
Time	Min	Independent variable	-1(15)	0(30)	+1(45)
Temperature	°C	Independent variable	-1(30)	0(37.5)	+1(45)
Turbidity	OD	Response	-	-	-

25، 35، 45، 55، 65 درجه سانتی‌گراد در مناسب‌ترین pH و فعالیت آنزیم برای استفاده در این دماها مورد بررسی قرار گرفت [7]. مطابق با بررسی اثر pH مناسب‌ترین pH با بالاترین میزان فعالیت آنزیم برابر با 3 بود و روش تعیین میزان فعالیت آنزیمی با این pH در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

2-2-4-3- اندازه‌گیری درصد تثبیت آنزیم

اندازه‌گیری مقدار آنزیم تثبیت شده عبارت است از تفاوت میزان پروتئین اولیه قبل از تثبیت (پروتئین آنزیم) و میزان پروتئین تثبیت نشده (محلول زیر صافی پس از شستشو) تقسیم بر میزان پروتئین اولیه قبل از تثبیت

معادله 2

$$\text{درصد تثبیت} = \frac{\text{مقدار کل پروتئین تثبیت شده} - \text{مقدار کل پروتئین اولیه قبل از تثبیت}}{\text{مقدار پروتئین اولیه قبل از تثبیت}} \times 100$$

2-2-4-4- اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیمی

فعالیت ویژه آنزیمی از تقسیم میزان فعالیت آنزیم به میزان پروتئین اندازه‌گیری شده در حالت آزاد و تثبیت شده (با روش لوری) تعیین گردید [22].

2-2-5- کاربرد آنزیم 1002 تجاری تثبیت شده در شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی

مقادیر مختلفی از آنزیم تثبیت شده جهت شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی انتخاب شد (مطابق جدول 1). بعد از اینکه دانه‌های حاوی آنزیم به فالكون محتوی آب گوجه‌فرنگی اضافه و در دماها و زمان‌های تعیین شده (جدول 1) گرمخانه‌گذاری و در 3000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس میزان جذب محلول شفاف رویی (سوپرناتانت) در طول موج 660 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد [23، 24، 25].

بعد از تشخیص اعتبار مدل به لحاظ آماری، می‌توان آن را به منظور آنالیز و برآورد اثر سطوح مختلف متغیرها بر میزان کدورت آب گوجه‌فرنگی به کار برد. روش‌های گرافیکی (دو و سه‌بعدی) به منظور تعیین اثرات متغیرها و اثرات متقابل احتمالی آن‌ها در پاسخ مورد نظر (میزان کدورت) به کار می‌روند. این نمودارها و نقشه‌ها رابطه میان متغیرها و میزان کدورت هدف را مجسم می‌کنند و به تشخیص آسان روابط میان فاکتورها و پاسخ‌ها کمک می‌نمایند. بنابراین رسم سطح پاسخ ارتباط بین متغیرهای مستقل و متغیر وابسته را نشان می‌دهد، در حالی که متغیر دیگر در مقدار بهینه ثابت نگه داشته می‌شود [20].

در نتیجه با مطالعه این نمودارها و سطوح پاسخ، نواحی مطلوب نمودار براساس شرایط ایجاد کمترین کدورت شناسایی می‌شود و در عین حال می‌توان بهینه‌سازی تکمیلی را انجام داد. بررسی سایر پارامترها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن، در سطح احتمال 5 درصد، به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه 21.0 استفاده شد.

2-2-4- بررسی ویژگی‌های آنزیم آزاد و تثبیت شده

2-2-4-1- بررسی اثر pH

اثر pH بر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده با استفاده از بافر استات 0/1 مولار در pH های مختلف 3، 3/6، 4/2، 4/6، 5/8 و 6 در دما و غلظت ثابت سوبسترا (30°C، 1 میلی گرم بر میلی لیتر) با 3 تکرار مورد بررسی قرار گرفتند [21]. pH متر (سانا-ایران)، روش تعیین میزان فعالیت آنزیمی برای هر یک از pHها تکرار و میزان گالاکتورونیک اسید باقی مانده در هر حالت مشخص شد

2-2-4-2- بررسی اثر دما

اثر دما بر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در محدوده

3- نتایج و بحث

3-1- درصد تثبیت آنزیم

بر اساس محاسبات میزان درصد تثبیت آنزیم پکتیناز تجاری بر روی دانه‌های آلژینات $32 \pm 0/1$ درصد محاسبه شد. درصد تثبیت در بسیاری از موارد محدوده 30 تا 56% گزارش شده است [26].

3-2- بررسی فعالیت آنزیم تثبیت شده در

درصدهای مختلف آلژینات

بهترین میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده در درصدهای مختلف آلژینات 1/5، 2، 2/5، 3 و 3/5% تحت شرایط ثابت میزان آنزیم 1 میلی‌لیتر و کلرید کلسیم 0/2 M مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت آنزیم در آلژینات 3% وجود داشت (شکل 1). رحمان و همکاران (2013) نیز نتایج مشابهی را گزارش نمودند [7].

فعالیت پایین آنزیم‌های تثبیت شده با غلظت‌های 1% و 2% سدیم آلژینات نشان می‌دهد که آنزیم ممکن است از ذرات نرم، ناپایدار و شکننده در غلظت‌های پایین سدیم آلژینات خارج شود در غلظت‌های بالاتر سدیم آلژینات (بالاتر از 3%) اندازه منافذ کلسیم آلژینات کاهش یافته و این ممکن است موجب محدودیت نفوذ سوبسترا به داخل ذرات کلسیم آلژینات و رسیدن به موقعیت فعال آنزیم‌های به دام انداخته شود [27].

3-3- بررسی اثر pH بر آنزیم آزاد و تثبیت شده

ارزیابی فعالیت آنزیم پکتیناز آزاد و تثبیت شده (آلژینات 3% کلرید کلسیم 0/2 M و میزان آنزیم 1ml) در محدوده pH 3 تا 6 انجام گرفت. همانطور که در نتایج مشخص است بیشترین میزان فعالیت در pH معادل 3 مشاهده گردید (شکل 2). با توجه به ارزیابی‌های صورت گرفته در محدوده pH مشخص گردید که آنزیم مورد استفاده در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارا می‌باشد. محدوده‌ی pH بهینه برای آنزیم تجاری 1002 مورد استفاده بر اساس اطلاعات موجود توسط شرکت سازنده نیز در محدوده 2/5-4/5 ذکر شده است که با شرایط بدست آمده در این پژوهش همخوانی دارد.

همانطور که مشاهده می‌گردد روند کاهش فعالیت آنزیم آزاد نیز مشابه آنزیم تثبیت شده است (شکل 2). تثبیت تحمل آنزیم به شرایط اسیدی را نسبت به حالت آزاد افزایش داد. آلکورتا و همکاران نیز در بررسی تثبیت آنزیم پکتیناز حاصل از پنسیلیوم ایتالیکوم را بر روی بستر نایلون بررسی pH بهینه را 3 گزارش کردند که جهت شفاف سازی در آرمیوه مناسب است [28].

در بررسی‌های رحمان و همکاران در سال 2014 و 2013 در بستر کیتوزان و آلژینات کلسیم فعالیت آنزیم پس از تثبیت افزایش داشته و تغییرات کمتری نسبت به افزایش pH نشان داده است [7، 15].

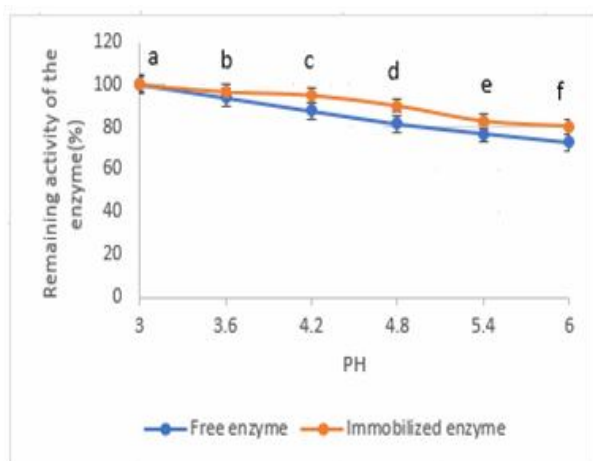


Fig 2 Investigating the effect of pH range on the amount of residual enzyme activity; Different lowercase letters stand for significant differences between treatments ($p < 0.05$)

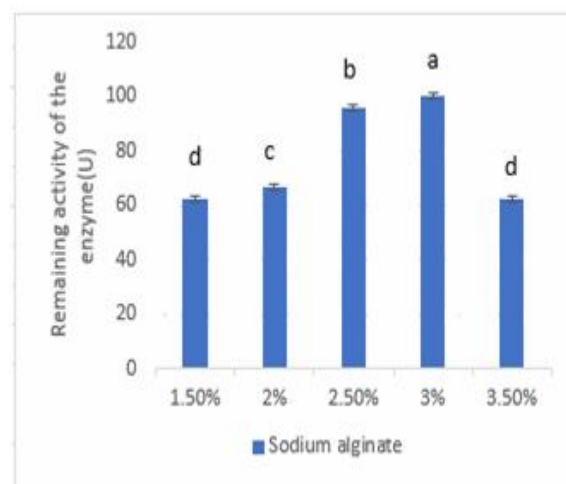


Fig 1 Investigation of different concentrations of alginate and its effect on enzyme activity; Different lowercase letters stand for significant differences between treatments ($p < 0.05$)

گزارش نمودند [7] همین محققان در سال 2015 تثبیت پلی گالاکتوروناز را در بسترهای مختلف بررسی کردند و نتیجه مشابهی را گزارش نمودند [29].

3-5-5- شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی

3-5-1- بهینه‌سازی متغیرها جهت به دست آوردن

کمترین کدورت (بیشترین شفافیت) در آب گوجه‌فرنگی

نتایج بررسی اثر 20 تیمار مختلف انجام شده بر میزان کدورت آب گوجه‌فرنگی در مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده برای تیمارهای مختلف در جدول (2) مشاهده می‌گردد.

به منظور مطالعه دقیق اثر هر فاکتور و کمی کردن آن و همچنین سنجیدن ارزش پاسخ‌ها، آنالیز و بررسی پاسخ‌ها، مطالعه جدول آنالیز واریانس آن‌ها ضروری است. با توجه به آنالیز واریانس، چنانچه ارزش P مدل کوچک تر از 0/05 باشد، نشان دهنده آن است که طرح CCD برای بررسی پارامتر مورد نظر، مدل مناسبی بوده است (جدول 3). همچنین با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس مدل پیشنهادی در این حالت معادله درجه دو می‌باشد، که میزان R^2 آن برابر 0/9519 است و نشان دهنده آن است که داده‌ها با معادله درجه دو سازگار شده است.

مدل پیشنهادی که در آن $Y =$ میزان کدورت، $X_1 =$ میزان آنزیم و $X_2 =$ زمان می‌باشد. معادله نهایی به صورت زیر است:

معادله 3

$$Y = 0.034427 - 0.0051X_1 - 0.0037X_2 + 0.0015X_1X_2 - 0.00282AX_1^2$$

3-5-2- بررسی نمودارهای سطح پاسخ و اثر فاکتورها

در کل تأثیر دما در شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی با توجه به نتایج جدول آنالیز واریانس (ارزش P)، و شکل‌های شماره (5) و (6) معنی دار نمی‌باشد.

3-4- بررسی اثر دما بر آنزیم آزاد و تثبیت شده

نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم پکتیناز آزاد و تثبیت شده (آلژینات 3% کلرید کلسیم 0/2 M و میزان آنزیم 1 میلی‌لیتر) در شرایط مختلف دمایی 25 تا 65 درجه سانتیگراد در شکل 3 مشاهده می‌شود. بیشترین فعالیت در حالت آزاد و در حالت تثبیت شده در دمای 45 درجه سانتیگراد مشاهده شد و بعد از آن با افزایش دما فعالیت آنزیم کاهش یافت. همانطور که مشاهده می‌گردد تثبیت سبب افزایش نسبی میزان مقاومت آنزیم به دامنه حرارتی شده است.

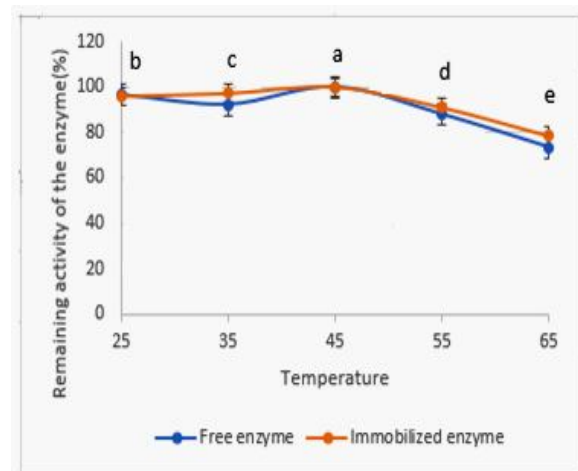


Fig 3 Investigating the effect of different temperatures on the amount of residual enzyme activity; Different lowercase letters stand for significant differences between treatments ($p < 0.05$)

دمای بهینه برای آنزیم تجاری 1002 مورد استفاده بر اساس اطلاعات موجود توسط شرکت سازنده در محدوده 20-50 درجه سانتیگراد ذکر شده است که با نتایج پژوهش صورت گرفته همسو می‌باشد. رحمان و همکاران در سال 2013 در بررسی تثبیت پکتیناز حاصل از باسیلوس لیشنی فورمیس *KIBGE-IB21* در کلسیم آلژینات دمای بهینه را برای حالت آزاد 45 درجه سانتی‌گراد و برای حالت تثبیت شده 55 درجه سانتی‌گراد

Table 2 Results of treatments used to optimize the clarification of tomato juice

Run	Enzyme (%)	Time (min)	T (°C)	Turbidity(660nm)	
				Reality	Prediction
1	4	30	45	0.034	0.037
2	2	45	30	0.034	0.034
3	2	45	45	0.03	0.029
4	4	30	37.5	0.034	0.034
5	4	30	37.5	0.034	0.033
6	4	30	37.5	0.034	0.033
7	6	15	30	0.028	0.029
8	4	30	37.5	0.034	0.033
9	2	15	45	0.042	0.041
10	6	30	37.5	0.027	0.027
11	6	45	45	0.024	0.024
12	4	15	37.5	0.038	0.039
13	2	30	37.5	0.037	0.038
14	4	30	37.5	0.034	0.035
15	6	45	30	0.025	0.025
16	4	30	30	0.035	0.034
17	6	15	45	0.03	0.029
18	2	15	30	0.043	0.043
19	4	45	37.5	0.031	0.032
20	4	30	37.5	0.034	0.035

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) in determining the effective and ineffective parameters for the least turbidity of tomato juice

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	p-value	
				Value	Prob > F	
Model	0.0004	9	5.09E-05	22.0255	< 0.0001	***
A	0.0002	1	0.0002	112.5531	< 0.0001	***
B	0.0001	1	0.0001	59.2407	< 0.0001	***
C	2.5E-06	1	2.5E-06	1.0818	0.3228	
AB	0.00001	1	0.00001	7.7891	0.0091	**
AC	4.5E-06	1	4.5E-06	1.9472	0.1931	
BC	2E-06	1	2E-06	0.8654	0.3741	
A^2	2.18E-05	1	2.18E-05	9.4512	0.0118	*
B^2	9.09E-08	1	9.09E-08	0.0393	0.8468	
C^2	9.09E-08	1	9.09E-08	0.0393	0.8468	
Residual	2.31E-05	10	2.31E-06			
Lack of Fit	1.83E-05	5	3.66E-06	3.7811	0.0853	n
Pure Error	4.83E-06	5	9.67E-07			
Cor Total	0.000481	19				
R ² =0.9519 ,		R ² adj=0.9087,		R ² predict=0.7302		
		Press: 3.46		C.V.= 4.58		

*Significant at 5% (p< 0.05), **Significant at 1% (p< 0.01), ***Significant at 0.1% (p < 0.001); n: not significant.

A: enzyme; B: time; C: temperature

آن به بعد تا میزان 6% آنزیم و افزوده شدن زمان تا 45 دقیقه کاهش کدورت بیشتر می شود (شکل 4). افزایش آنزیم به نوبه خود سبب کاهش کدورت می شود اما مصرف بالای آنزیم اقتصادی نیست ضمن اینکه از حدی فراتر می تواند کدورت ثانویه ایجاد کند. افزایش مدت زمان در تماس بودن آنزیم و آب گوجه فرنگی هم به علت زمان بیشتر واکنش آنزیم و حذف پکتین ها تأثیر بسزایی در ایجاد شفافیت بیشتر دارد. در بررسی تغییرات میزان کدورت با تغییر میزان دما و میزان آنزیم در میزان ثابت زمان 30 دقیقه از مقدار 4% آنزیم تا 6% همراه با

3-5-2- بررسی نمودارهای سطح پاسخ و اثر فاکتورها

در کل تأثیر دما در شفاف سازی آب گوجه فرنگی با توجه به نتایج جدول آنالیز واریانس (ارزش P)، و شکل های شماره (5) و (6) معنی دار نمی باشد.

در بررسی شکل تغییرات میزان کدورت با تغییر میزان آنزیم و زمان در میزان ثابت دمای 37 °C افزایش آنزیم و زمان باهم در این شکل نشان می دهد که در میزان 2 و 4 درصد آنزیم و تا زمان 30 دقیقه تقریباً به مقدار یکسانی کاهش کدورت اتفاق می افتد از

در بررسی تغییرات میزان کدورت با تغییر میزان دما و میزان زمان در میزان ثابت آنزیم 4 میلی گرم با افزایش زمان و دما باهم با شیب زیادی کدورت کاهش میابد (شکل 6).

افزوده شدن میزان دما کاهش کدورت به طور محسوسی مشاهده می شود (شکل 5).

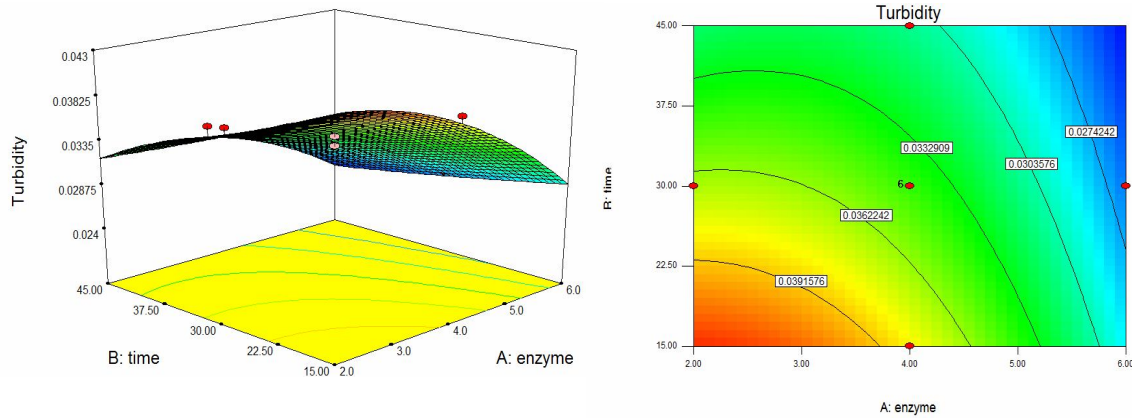


Fig 4 3D response surfaces changes in turbidity by changing the amount of enzyme and time at a constant temperature of 37 ° C

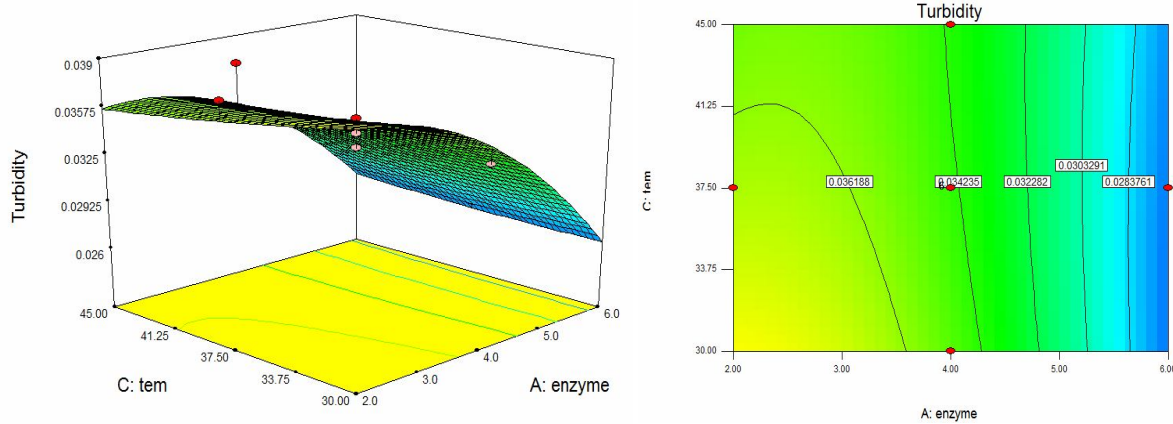


Fig 5 3D response surfaces changes the amount of turbidity by changing the temperature and enzyme level at a constant rate of 30 minutes

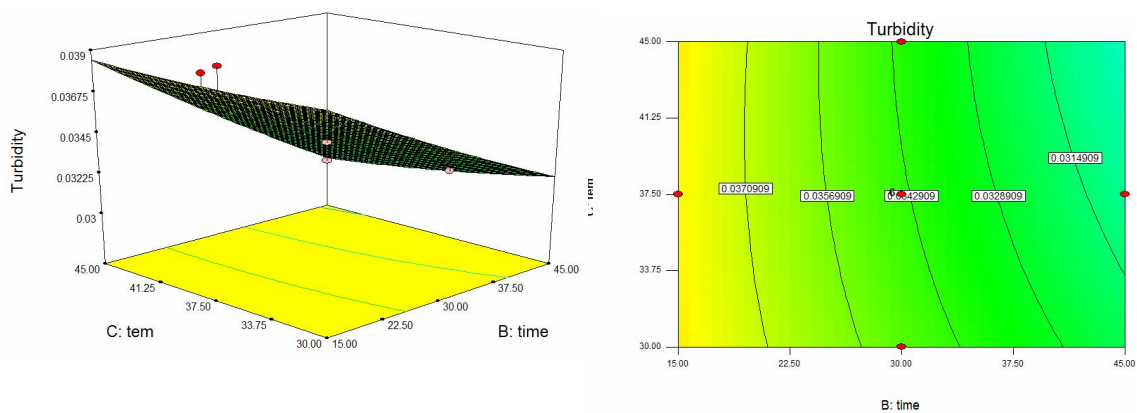


Fig 6 3D response surfaces changes the amount of turbidity by changing the temperature and time of the constant amount of enzyme 4 mg

3-6- تعیین میزان بازده شفاف‌سازی**گوجه‌فرنگی در شرایط بهینه**

بررسی میزان کدورت نمونه‌های شفاف شده نسبت به حالت اولیه (قبل از اعمال فرایند آنزیم‌زنی) نشان داد که آب گوجه‌فرنگی تا میزان 27/09 برابر شفاف شده است. در پژوهش صورت گرفته توسط ناگار و همکاران (2012) میزان شفاف‌سازی آب گوجه‌فرنگی توسط آنزیم زایلاناز معادل 20/87 % تعیین گردید در حالی که پوست و دانه‌های گوجه‌فرنگی حذف شده بود. مقایسه نتایج نشان می‌دهد آنزیم 1002 تجاری توانایی ایجاد میزان بیشتر شفافیت برای گوجه‌فرنگی بدست آمده از نمونه کامل گوجه‌فرنگی حاوی پوست و دانه را دارا می‌باشد. همچنین این محققان اظهار داشتند که استفاده از مخلوط زایلاناز و پکتیناز و سلولاز می‌تواند 15% بازدهی شفافیت را افزایش دهد. آن‌ها بیشترین بازده و شفافیت آب گوجه را در غلظت آنزیم 15IU/mL، دمای 4 درجه سانتی‌گراد و زمان انکوباسیون 90 دقیقه مشاهده کردند [24] در مقایسه با نتایج سایرین، آنزیم تجاری 1002 میزان هدر رفت آنزیم و زمان بیشتر و بازدهی کمتر داشته است.

4- نتیجه‌گیری

تثبیت به کمک کلسیم آلزینات روشی ساده و ارزان و قابل کاربرد در صنایع غذایی است. بیشترین فعالیت آنزیم 1002 تجاری تثبیت شده در دانه‌های آلزینات کلسیم با غلظت 3% سدیم آلزینات و غلظت 0/2 مولار کلسیم کلرید بدست آمد. همچنین بررسی‌ها نشان داد که پایداری حرارتی و تحمل شرایط اسیدی آنزیم‌های تثبیت شده در مقایسه با آنزیم‌های آزاد تا حدودی افزایش یافته است. بر اساس نتایج بدست آمده، مشخص گردید آنزیم تثبیت شده عملکرد خوبی در شفاف‌سازی آب میوه‌های مختلف دارد. آنزیم پکتیناز تجاری 1002 در کمترین مقدار مصرف قادر است شفافیت قابل توجهی ایجاد نماید که از لحاظ اقتصادی قابل توجه می‌باشد.

5- منابع

- [1] Hiteshi K, Chauhan S, Gupta R. 2013. Immobilization of microbial pectinases: A Review, CIBTech Journal of Biotechnology, 2: 2319-3859.
- [2] Rajdeo K, Harini T, Lavanya K, Fadnavis N. W. 2016. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. Food and Bioproducts Processing, 1-28.
- [3] Tapre A. R, Jain R. K . 2014. pectinase: Enzymes for fruit processing industry. International Food Reserch Journal, 21: 447-453.
- [4] Yanzhen M, Yuru CH, Ruying ZH, Yang L. 2013. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase form Bacillus halodurans M29. Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic, 94: 77-81.
- [5] Bahrami A, Hejazi P. 2013. Electrostatic immobilization of pectinase on negatively charged AOT Fe3O4 nanoparticles. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 93: 1-7.
- [6] Faraji M and Fadavi Gh. 2013. Applications of magnetic nanoparticles in the food science. Iranian Journal of Nutrition and Food Science, 2: 239-252.
- [7] Ur Rehman H, Aman A, Silipo A, Ul Qader SH. A, Molinaro A, Ansari A. 2013. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from Bacillus licheniformis KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. Food Chemistry, 139: 1081-1086.
- [8] Razi B, Aroujalian A, Raisi A, Fathizadeh M. 2011. Clarification of tomato juice by cross-flow microfiltration. International Journal of Food Science & Technology, 46: 138-145.
- [9] Lee W. C, Yusof S, Hamid N.S.A, & Baharin, B.S. 2006. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). Journal of Food Engineering, 73: 55-63.
- [10] Baumann J.W. Application of enzymes in

- Fermentation: A comparative study. *Food and Bioproducts processing*, 90: 102-110.
- [19] Alagoz D, Seyhan Tukel S, Yildirim D. 2016. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 87: 426-432.
- [20] Ghamari M, Tabatabaei Yazdi F, Alamzadeh E, Vosoughi M, Varidi M, Safari H. 2017. Optimization of the culture medium containing palm sap for the production of lipase by *Aspergillus niger* in response surface method, *Food Science*, 65(14): 85-96.
- [21] Beig mohammadi Z, Hamidi Esfahani Z, Sahari M L, Khosravi Darani K. 2016. Optimization of Phospholipase A1 Immobilization on Plasma Surface Modified Chitosan Nanofibrous Mat, *Applied Food Biotechnology*, 3(1):27-37.
- [22] Mosafa L. 2013 Immobilization of two pectinase and papain enzymes on magnetic nanoparticles and their effect on juice clarity. Ph.D. thesis, Isfahan University of Technology, Department of Food Science and Technology.
- [23] Cerreti M, Liburdi K, Benucci I, Emiliani Spinelli S, Lombardelli C, Esti M. 2017. Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice, *LWT - Food Science and Technology*, 82: 58-65.
- [24] Nagar S, Mittal A, Gupta V. K. 2012. Enzymatic Clarification of Fruit Juices (Apple, Pineapple, and Tomato) Using Purified *Bacillus pumilus* SV-85S Xylanase, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17: 1165-1175.
- [25] Barrman S, Sit N, Badwaik S. L, Deka C. S. 2014. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice, *J Food Sci Technol*, 1-11.
- [26] Ghamari M. 2015. Optimization of production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* strain using palm fruit waste fruit juice technology. 1981. In: *Enzymes and Food Processing* (edited by G.G. Birch N. Blakebrough & K.J. Parker). London: Applied Science Publishers Ltd. Pp, 129–147.
- [11] Sheryl A, Lazarus and Manohar, Garg L. 2006. Clarified Tomato Juice Inhibits Platelet Aggregation, University of Newcastle, 225-228.
- [12] Ghavipour M, Saedisomeolia A, Djalali M, Sotoudeh G, Eshraghyan M. R, Malekshahi Moghadam A, Wood G. L. 2013. Tomato juice consumption reduces systemic inflammation in overweight and obese females, *British Journal of Nutrition*, 109: 2031–2035.
- [13] Silasti M. L, Alfthan G, Aro A, Kesaniemi A, Horkko S. 2007. Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation, *British Journal of Nutrition*, 98: 1251–1258.
- [14] Tuoping L, Suhong L, Na W, and Lirui T. Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemistry*. 2008,(109): 703–708.
- [15] Ur Rehman H, Aman A, Asif Nawaz M, Baloch A. H, Ul Qader SH. A. 2014. Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3: 282-287
- [16] Karimi K. 2015. Simultaneous immobilization of cellulase and pectinase in calcium alginate and its application in food industry, Master's dissertation, Tarbiat Modarres university, Food Industry Group.
- [17] Bogra P, Kumar A, Kuhar K, Panwar S, Singh R. Immobilization of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectinmethylesterase in calcium alginate beads and its application in fruit juice clarification, *Biotechnol Lett*. 2013, 1-6.
- [18] Doreen H, Sirma, Y, Canan T, Marcelo F L. 2012. pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state

Penicillium italicum by covalent binding to nylon, *Enzyme and Microbial Technology*,18:141-146.

- [29] Ur Rehman H, Aman A, Asif Nawaz M, Karim A, Ghani M, Baloch A. H, Ghader Sh. A. 2015. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-7.

and its Immobilization for application in food industry, Ph.D. thesis, Mashhad Ferdowsi University.

- [27] Quiroga E, Illanes C. O, Ochoa N. A and Barberis S. 2011. Performance improvement araurjain, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads, *Process Biochemistry*,46: 1029–1034.
- [28] Alkorta I, Garbisu C, Liama M. J, Serra J. L. 1996. Immobilization of pectin lyase from

Optimizing of Tomato Juice Clarification Process by Immobilized Commercial Pectinase Using Response Surface Methodology

Abdollahzadeh, A. ¹, Beigmohammadi, Z. ^{2*}, Ghamari, M. ³

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Department of Food Science and Technology, Basir Abyek Institute of Higher Education, Qazvin, Iran

(Received: 2019/01/31 Accepted: 2020/04/26)

The pectinase enzyme has a great importance in the food industry. It is capable of decomposing Pectin significantly, which is the substantial element of turbidity of the juices. As a result, it plays an important role in clarification also ability to maintain organoleptic properties and quality of nutrients. The usage of enzymes in the industry is costly and some measures should be taken to allow the enzyme to be used several times without altering its efficiency. In this research the commercial pectinase enzyme was immobilized on calcium alginate beads. Free and immobilized enzymes activities in different temperatures and pH were determined. Then storage stability and reusability of enzyme were investigated. For optimized clarification of tomato juice by immobilized enzyme, the response surface methodology was used. Three factors including temperature (30-45°C), time (15-45 min) and enzyme concentration (2-6%) in 3 levels were used to evaluate the effect of parameters on turbidity of tomato juice as a model system, the importance of interacting the effects of factors also determined. Optimization has been conducted to achieve the lowest turbidity of tomato juice at the lowest used enzyme. Optimized conditions achieved by concentration of immobilized enzyme 2%, temperature 45°C and time 45min, and with yield of clarification 27/09 times for tomato juice. Results showed that the best temperature and pH for free and immobilized enzymes were 45°C and 3, respectively.

Keywords: Pectinase, Clarification, Tomato Juice, Response Surface Methodology, Optimization

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