



## بررسی کینتیک غیر فعال کردن آنزیم پلی فنول اکسیداز آب هویج در اثر حرارت دهی اهمیک

فایزه براتی<sup>۱</sup>، نفیسه زمین‌دار\*<sup>۲</sup>، سیدرامین رفیعی<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<b>تاریخ های مقاله :</b> تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۲۶	هویج بلافاصله پس از آب‌گیری تغییر رنگ داده و از نارنجی به قهوه‌ای تغییر رنگ می‌دهد. آنزیم‌بری راهی مناسب برای حفظ و تجاری‌سازی این محصول است. در این مطالعه از دستگاه اهمیک به عنوان منبع گرمایش استفاده شد و آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز به عنوان شاخص کفایت غیرفعال سازی آنزیم برای تغییر رنگ آب‌هویج انتخاب شد. آب‌هویج تازه تحت ۳ سطح دمای ۷۰ و ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد و ۴ سطح زمان ۰-۲۰-۴۰ و ۶۰ ثانیه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت تحت فرآیند حرارتی قرار گرفت و میزان غیرفعال‌سازی آنزیم، مواد جامد محلول، pH و متغیرهای رنگی *L، *a و *b بررسی شدند. مقادیر ثابت سرعت، انرژی فعال‌سازی، D-value و Q <sub>10</sub> مورد بررسی قرار گرفت. کینتیک غیرفعال سازی پلی‌فنول‌اکسیداز نمونه‌های آب‌هویج در دمای ۷۰ و ۸۰ و ۹۰ محاسبه شد. تغییرات غیرفعال‌سازی آنزیم، مواد جامد محلول، pH و پارامتر *a با افزایش دما و زمان به وسیله‌ی طرح کاملاً تصادفی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شدند. میزان غیرفعال‌سازی آنزیم به روش متعارف حمام آب نیز اندازه‌گیری شد و با روش اهمیک مقایسه شد که نتیجه‌ی آن کارایی بیشتر روش اهمیک را نشانگر شد. با افزایش دما میزان مواد جامد محلول افزایش پیدا کرد و رنگ آب هویج از نارنجی مایل به زرد به سمت نارنجی مایل به قرمزی پیش رفت (p < ۰.۰۵).
<b>کلمات کلیدی:</b> آب هویج، اهمیک، پلی فنول اکسیداز.	
<b>DOI:10.22034/FSCT.21.153.63.</b>  * مسئول مکاتبات: <a href="mailto:n.zamindar@khuisf.ac.ir">n.zamindar@khuisf.ac.ir</a>	

## ۱- مقدمه

نامطلوب می‌شود [۸] محققین به دنبال روش‌های جدیدی برای آنزیم‌بری می‌باشند که این روش‌ها شامل اولتراسونیک، مایکروویو، مادون قرمز، فشار هیدروستاتیک بالا، هیدرولیز آنزیمی و هیدروکلئیدها، فشار بالای کربن دی اکسید و جدیدترین آن به نام اهمیک می‌باشد [۹]. فناوری گرمایش اهمیک مبتنی بر عبور جریان الکتریکی متناوب از طریق یک ماده غذایی با هدف اصلی گرم کردن آن است [۱۰]. مهم‌ترین مزیت مرتبط با این فرایند، امکان گرم کردن مواد سریع و یکنواخت از جمله محصولات دارای ذره است. به همین دلیل، محصولاتی که با گرمایش اهمیک تیمار می‌شوند، کیفیت بالاتری نسبت به محصولات فرایند شده معمولی دارند [۱۱]. گرمایش اهمیک در طیف گسترده‌ای از کاربردها از قبیل گرم کردن، آنزیم‌بری، پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون محصولات غذایی استفاده می‌شود [۱۲]. از مزایای آن در مقایسه با گرمایش معمولی می‌توان به حفظ رنگ و ارزش مواد غذایی، سرعت گرمایش بالا، ایجاد گرمایش حجمی، عدم ایجاد شیب دمایی، دوستاند محیط زیست و کارایی و بازدهی بسیار بالا اشاره کرد [۱۳].

این مطالعه به بررسی استفاده از روش حرارت دهی اهمیک و اثرات این روش بر غیر فعال کردن آنزیم پلی فنول اکسیداز در آب هویج پرداخته است.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد

نمونه هویج، متعلق به خانواده *Umbelliferae* و از جنس *Daucus* و *Carota* است و از یک باغ در اصفهان خریداری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد. مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

## ۲-۲- روش‌ها

هویج، یکی از مهمترین گیاهان ریشه‌ای می‌باشد. به دلیل ریشه‌های خوراکی آن در سراسر جهان کشت می‌شود [۱]. به دلیل داشتن خواص دلپذیر و شیرین، مواد مغذی و مزایای عالی سلامتی در ارتباط با خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد عفونی کننده، درمانی و آرام بخش به عنوان یکی از مهم‌ترین سبزیجات در نظر گرفته می‌شود. هویج تقریباً ۹۰٪ آب و ۵٪ کربوهیدرات تشکیل می‌دهد [۲]. به دلیل ماهیت قابل خراب شدن، هویج در معرض فرآیندهای مختلفی از جمله انجماد، کنسرو یا تبخیر برای افزایش عمر مفید قرار می‌گیرد. قبل از این فرآیندها، هویج معمولاً در آب گرم یا بخار برای از بین بردن هوا، تثبیت رنگ، هیدرولیز و حل محلول پروتوپکتین و غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها، آنزیم‌بری می‌شوند [۳]. آنزیم نوع خاصی از پروتئین است. آنزیم‌هایی که در مواد غذایی وجود دارند تغییراتی را در آنها ایجاد می‌کنند که گاهی مطلوب ولی اغلب نامطلوب هستند به همین دلیل باید آنها را غیرفعال کرد [۴]. عامل اصلی قهوه‌ای شدن، تغییر رنگ و تیره شدن میوه‌ها و سبزیجات فعالیت دو آنزیم پلی فنول اکسیداز و پروکسیداز است. پلی فنول اکسیداز (EC 1.14.18.1) یک آنزیم اکسیدوردوکتاز<sup>۱</sup> حاوی مس است و در همه گیاهان وجود دارد که باعث ایجاد تغییر رنگ‌های نامطلوب در محصولات تازه مانند میوه، سبزیجات و آب میوه‌ها می‌شود [۵]. در صورت وجود اکسیژن، اکسیداسیون، فنول‌آرا به کینون<sup>۳</sup> کاتالیز می‌کند که باعث ایجاد رنگدانه‌های سیاه، قهوه‌ای یا قرمز می‌شود [۶]. که معمولاً ملانین نامیده می‌شوند و می‌تواند منجر به از بین رفتن کیفیت مواد مغذی، عملکردی و ارگانولپتیک مانند تیره شدن، نرم شدن و از بین رفتن طعم شود [۷].

آنزیم‌بری یک پیش تیمار است ولی به دلیل این که آنزیم‌بری به روش متعارف مانند حمام آب و آب داغ باعث ایجاد اثرات

## ۱-۲-۲- آماده‌سازی نمونه

شد و ترموکوپل نوع K در نمونه قرار گرفت به نحوی که ترموکوپل در مرکز سل قرار گرفت سپس ولتاژ ۱۰۰ ولت اعمال گردید. آنزیم‌بری در دماهای ۷۰-۸۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد و در زمان‌های صفر-۲۰-۴۰ و ۶۰ ثانیه طی سه تکرار انجام شد. مدت زمانی که طول می‌کشد تا نمونه از دمای محیط به دمای هدف برای آنزیم‌بری برسد در شرایط مختلف متفاوت می‌باشد و در تحقیقات مختلف تحت عنوان زمان افزایش دما<sup>۵</sup> شناخته می‌شود [۱۷، ۱۸].

برای آنزیم‌بری به روش متعارف آب داغ، نمونه‌ها در حمام آب در دماهای ۷۰-۸۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد در زمان ۱ و ۲ دقیقه در سه تکرار آنزیم‌بری شد [۱۹].

## ۵-۲-۲- اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز

میزان آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز را در نمونه شاهد (قبل از آنزیم‌بری) اندازه‌گیری و بعد از آنزیم‌بری در هر دو روش (اهمیک و حمام آب) بررسی شد. برای اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز بعد از فرآیند آنزیم‌بری در زمان‌های مختلف آب هویج تیمار شده با روش‌های گفته شده به مدت ۱-۲ دقیقه تا دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد خنک گردید. پس از آن به دلیل این که زمان در این پژوهش اهمیت بالایی دارد با استفاده از دستگاه پمپ خلأ و کیف بوختر نمونه سریع صاف گردید، نمونه صاف شده به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با دور ۱۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بدست آمده را با ۲/۹ میلی‌لیتر سوبسترا (شامل محلول کاتکول ۰/۱ مولار و محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار) مخلوط کرده و جذب نمونه با طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری این آنزیم قبل از فرآیند آنزیم‌بری، تمام مراحل گفته شده به جز مرحله حرارتی انجام داده شد [۲۰].

## ۶-۲-۲- اندازه‌گیری مواد جامد محلول

مقدار مواد جامد محلول در نمونه شاهد (قبل از آنزیم‌بری) اندازه‌گیری شد و بعد از آنزیم‌بری به روش اهمیک در

نمونه‌ی هویج تازه پس از جدا کردن بخش‌های اضافی، برای حذف مواد زائد احتمالی (خاک، گل و غیره) قبل از انجام تیمارها با آب مقطر شسته شد، با چاقوی آشپزخانه پوست‌گیری شد و قسمت انتهایی آن جدا شد و سپس با دستگاه آب میوه‌گیری آب نمونه گرفته شد [۱۴].

## ۲-۲-۲- تعیین هدایت الکتریکی

قبل از شروع کار، هدایت الکتریکی (میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر) نمونه آب هویج بلافاصله پس از آماده‌سازی با استفاده از هدایت‌سنج (متروهم، ۷۱۲، سوئیس) اندازه‌گیری شد [۱۵].

## ۳-۲-۲- دستگاه اهمیک

دستگاه اهمیک در مقیاس آزمایشگاهی شامل منبع تغذیه، ترانسفورماتور متغیر، پاور آنالایزر (آردینو-مگا-۲۵۶۰) یک صفحه پردازشگر و همچنین یک عدد سلول آزمایشگاهی که از PTFE<sup>۴</sup> یا تفلون ساخته شده است. این سلول، استوانه‌ای با قطر داخلی ۰/۰۷ متر، قطر خارجی ۰/۰۹ متر و طول ۰/۲۶ متر و دو عدد الکترود از جنس استیل ضدزنگ با ضخامت ۰/۲ سانتی‌متر است. در طول فرآیند دما به دقت با استفاده از یک ترموکوپل نوع K اندازه‌گیری شد. ترموکوپل به صورت کامل با نوار تفلون پوشش‌دهی شده بود تا از ایجاد تداخل در میدان الکتریکی جلوگیری گردد [۱۶].

## ۴-۲-۲- آنزیم‌بری

در این پژوهش از دستگاه حمام آب و دستگاه حرارت دهی اهمیک برای از بین بردن فعالیت آنزیمی استفاده شد.

برای گرمایش اهمیک، پس از تعیین هدایت الکتریکی نمونه آب هویج با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت آنزیم‌بری شد. برای انجام آنزیم‌بری سلول اهمیک با نمونه آب هویج به میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر پر شد. میدان الکتریکی بین دو الکترود اعمال

5 Come up time

4-Poly Tetra Fluoro Ethylene

$$K_2 = K_1 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (4)$$

T دما (برحسب درجه کلوین)،  $E_a$  انرژی فعال سازی واکنش ( $\text{J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ )، R ثابت گاز ( $8.314 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) و  $K_1$  ثابت سرعت واکنش در دمای اول و  $K_2$  ثابت سرعت واکنش در دمای دوم است.

زمان لازم برای غیرفعال کردن ۹۰٪ فعالیت آنزیم پلی فنول-اکسیداز در مقایسه با مقدار اولیه آن، زمان کاهش اعشار (D-value) نامیده می شود و به شرح زیر محاسبه می شود:

$$D = \frac{\ln 10}{K} \quad (5)$$

K ثابت سرعت واکنش غیرفعال سازی آنزیم پلی فنول اکسیداز است.

مقدار  $Q_{10}$  یک واکنش اغلب برای گزارش وابستگی به دما در واکنش های بیولوژیکی استفاده می شود. این شاخص نشان دهنده تعداد دفعات تغییر سرعت واکنش با ۱۰ درجه سانتی-گراد تغییر در دما است.  $Q_{10}$  نشان دهنده این است که با افزایش ۱۰ درجه سانتی-گراد دمای واکنش سرعت چند برابر می شود. برای واکنش هایی مانند تغییر رنگ آنزیمی یا تغییر طعم در غذاها، تخریب رنگدانه های طبیعی، رنگ قهوه ای غیر آنزیمی و سرعت رشد میکروبی،  $Q_{10}$  معمولاً در حدود ۲ است.  $Q_{10}$  به شرح زیر محاسبه می شود [۲۳]:

$$K_2 = K_1 [Q_{10}]^{\frac{(T_2 - T_1)}{10}} \quad (6)$$

T دما (برحسب درجه کلوین)،  $K_1$  ثابت سرعت واکنش در دمای اول و  $K_2$  ثابت سرعت واکنش در دمای دوم است.

#### ۲-۲-۸-۲- معبرسازی مدل

معبرسازی مدل با توجه به داده های حاصل از تکرارهای آزمایشگاهی (سه تکرار) از طریق ثبت اطلاعات در طول

دماهای ۷۰-۸۰ و ۹۰ درجه سانتی-گراد در زمان های ۰-۲۰-۴۰ و ۶۰ ثانیه در سه تکرار، با استفاده از دستگاه رفرکتومتر اندازه گیری شد [۲۱].

#### ۷-۲-۲- اندازه گیری رنگ

رنگ نمونه مورد آزمون با استفاده از محفظه نوری و به صورت ارزش های CILAB شامل  $L^*$  (روشنایی-تاریکی)،  $a^*$  (قرمزی-سبزی)،  $b^*$  (زردی-آبی)، با روش پردازش تصویر اندازه گیری شد. نمونه ها در زمان ۰-۲۰-۴۰ و ۶۰ ثانیه پس از آنزیم بری درون محفظه نوری با شرایط مشابه برای هر نمونه (موقعیت نور لامپ و فاصله میان دوربین و نمونه) قرار گرفته و سپس با استفاده از یک دوربین عکس برداری انجام شد [۲۲].

#### ۱-۸-۲-۲- مدلسازی

مدلسازی با معادلات واکنش درجه صفر، درجه یک و درجه دو صورت گرفت:

$$A = A_0 + K_1 t \quad (1)$$

$$A = A_0 \exp(-K_1 t) \quad (2)$$

$$\frac{1}{A} = K_1 t \frac{1}{A_0} \quad (3)$$

A مقدار متغیر اندازه گیری شده در زمان t،  $A_0$  مقدار اولیه متغیر اندازه گیری شده در زمان  $t_0$  و t زمان نگهداری (ثانیه) می باشد.  $K_0$  ثابت سرعت واکنش درجه صفر،  $K_1$  ثابت سرعت واکنش درجه یک و  $K_2$  ثابت سرعت واکنش درجه دو است.

وابستگی دمایی ثابت سرعت غیرفعال شدن توسط معادله آرنیوس محاسبه شد:

فعالیت آنزیمی با مدل‌های کینتیکی مناسب با بالاترین ضریب رگرسیون توصیف شدند. مدل‌های کینتیکی با  $R^2$  و RMSE اعتبار سنجی و در جدول ۲ گزارش شدند. انرژی اکتیواسیون، ثابت سرعت واکنش، D-value و  $Q_{10}$  در هر سه دمای ۷۰-۸۰ و ۹۰ اندازه‌گیری و در جدول ۳ ارائه شده است. D-value مدت زمانی است که طول می‌کشد تا پارامتر مورد نظر ۰.۱ مقدار اولیه خود برسد. به طور کلی با افزایش دما میزان D-value کاهش می‌یابد یعنی مدت زمان کوتاه‌تری طول می‌کشد تا مقدار پارامتر مورد نظر به ۰.۱ مقدار اولیه خود برسد. در این پژوهش با توجه به اینکه آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز که عامل ایجاد رنگ است غیرفعال می‌شود در نتیجه رنگ کمتری از واکنش آنزیمی تشکیل خواهد شد و چون میزان رنگ باقی‌مانده از فرآیند اندازه‌گیری می‌شد با افزایش دما مدت زمان بیشتری طول می‌کشید تا میزان رنگ تشکیل شده را بتوان اندازه‌گیری کرد لذا در این پژوهش با افزایش دما روند افزایشی برای D-value مشاهده شده است.  $Q_{10}$  نشان می‌دهد که در اثر افزایش  $10^\circ\text{C}$  دما سرعت واکنش چند برابر می‌شود چون واکنش تشکیل رنگ بررسی شده است و این رنگ در اثر نوعی فعالیت آنزیمی تشکیل شده با افزایش دما آنزیم غیرفعال شده است بنابراین با اولین افزایش  $10^\circ\text{C}$  درجه ای دما سرعت تشکیل رنگ به  $0/5$  رسیده و با دومین افزایش  $10^\circ\text{C}$  درجه‌ای سرعت تشکیل رنگ به  $0/288$  مقدار اولیه خود رسیده است. K ثابت سرعت واکنش و در این پژوهش ثابت سرعت تشکیل رنگ است. با افزایش دما ثابت سرعت تشکیل رنگ واکنش کاهش یافت که دلیل آن غیرفعال شدن آنزیم در اثر دما بود.  $E_a$  انرژی فعال‌سازی واکنش است که با افزایش دما میزان انرژی فعال‌سازی افزایش می‌یابد که نتایج این پژوهش با نتایج ایسر<sup>۶</sup> هماهنگی دارد [۲۴].

فرآیند آنزیم‌بری به دست آمد و میانگین آن‌ها با داده‌های پیش‌بینی شده توسط مدل مورد مقایسه قرار گرفت.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (EA_{experimental} - EA_{simulation})^2} \quad (7)$$

که در آن  $EA_{experimental}$  فعالیت آنزیمی داده‌های آزمایشگاهی،  $EA_{simulation}$  فعالیت آنزیمی داده‌های بدست آمده از مدل و N تعداد داده‌ها است [۱۱].

### ۳-۲-۸-۳- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

متغیرهای وابسته شامل اندازه‌گیری تغییرات آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز، مواد جامد محلول و پارامترهای رنگ شامل  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  قبل از آنزیم‌بری (نمونه شاهد) و بعد از آنزیم‌بری با روش اهمیک با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تغییرات آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در دو روش اهمیک و حمام آب با یکدیگر با طرح کاملاً تصادفی مورد مقایسه قرار گرفتند. انرژی اکتیواسیون، ثابت سرعت واکنش D-value و  $Q_{10}$  اندازه‌گیری شد. پارامتر تخریب آنزیمی با مدل کینتیکی مناسب توصیف شد. مقایسات میانگین با روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد و جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS استفاده شده است.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تغییرات آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز

غیرفعال‌سازی آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز در سه دمای مختلف بررسی و با مدل‌های کینتیکی توصیف شد. مدل‌های کینتیکی مناسب در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد (درجه دو  $R^2 = 0/970$ )، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد (درجه دو  $R^2 = 0/943$ ) و دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد (درجه یک  $R^2 = 0/934$ ) در جدول ۱ نشان داده شد.

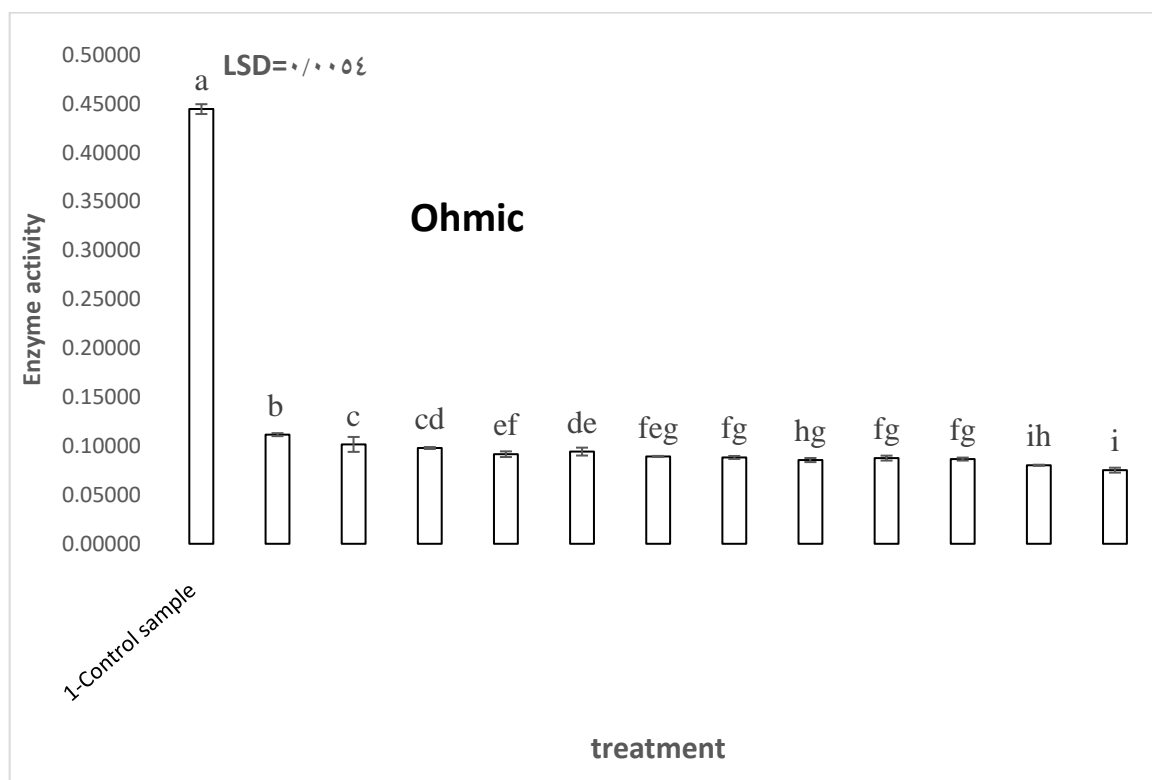


Figure 1. Mean comparisons of enzyme activity in ohmic method

با افزایش دما و افزایش زمان میزان آنزیم‌بری افزایش یافته است. بیشترین میزان آنزیم‌بری در دمای ۹۰ درجه و زمان ۶۰ ثانیه رخ داده است ولی تیمار ۲ با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و زمان صفر ثانیه (لحظه برداشت نمونه) هم توانسته است ۸۰٪ فعالیت آنزیمی را کاهش دهد چون مدت زمانی که طول کشیده است تا نمونه به درجه حرارت مورد نظر برسد (زمان افزایش دما) بر غیر فعال کردن آنزیم اثر داشته است. زمان افزایش دما در روش اهمیک برای رسیدن به دمای هدف ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۶۵، ۷۵ و ۸۵ ثانیه بوده است که خود این زمان‌ها اثر کشندگی دارند.

با توجه به شکل ۱ مقایسات میانگین فعالیت آنزیمی در تیمارهای اهمیک، تیمار ۱ نمونه شاهد است که اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با بقیه تیمارهای آنزیم‌بری شده داشته است. با افزایش دما تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد میزان آنزیم به گونه‌ای کاهش یافته است که در تیمار ۳ و ۴ این مقدار، معنی‌دار نبوده ولی کاهش آنزیم نسبت به تیمار ۲ و ۵ در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده است. در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد میزان کاهش آنزیم در تیمارهای ۶ و ۷ معنی‌دار نبوده و نسبت به تیمارهای ۷ و ۸ و ۹ نیز اختلاف خاصی نداشته است. با افزایش دما تا حد ۹۰ درجه میزان کاهش آنزیمی در تیمارهای ۱۰ و ۱۱ معنی‌دار نبوده و در تیمارهای ۱۲ و ۱۳ نیز اختلاف آماری خاصی وجود نداشته است.

Table 1. Kinetic model of inactivation of polyphenol oxidase enzyme by ohmic method

R <sup>2</sup>	First order reaction equation		R <sup>2</sup>	Zero order reaction equation		Temperature
	R <sup>2</sup>	Second order reaction equation		R <sup>2</sup>	Second order reaction equation	
0.0312	-0.0799	0.966	y=- 0.0031 x -0.0104	0.959	y=- 0.0003 x -0.0013	70
						0.970 y=- x
0.0175	-0.0861	0.938	y=- 0.001 x -0.0081	0.933	y=- 0.0001 x -0.0008	80
						0.934 y=- x

0.032 x -0.214	0.934	$y = -0.0026x - 0.0167$	0.926	$y = -0.0002x - 0.0014$	90
				0.930	$y = -$

Table 2. Validation of kinetic models

R <sup>2</sup>	Reaction equation	Kinetic model	temperature	RMSE
0.970	$y = -0.0312x - 0.0799$	second order	70	0.0011
0.943	$y = -0.0175x - 0.0861$	second order	80	0.001
0.934	$y = -0.032x - 0.214$	First order	90	0.0022

Table 3. Effects of temperature on reaction rate constant, activation energy, D-value and Q10

Q <sub>10</sub>	E <sub>a</sub> (KJ/mol <sup>-1</sup> )	D-value(s)	K (s <sup>-1</sup> )	T (°C)
-	-	73.814	0.0312	70
0.560	60.068	131.6	0.0175	80
0.288	129.126	885.76	0.0026	90

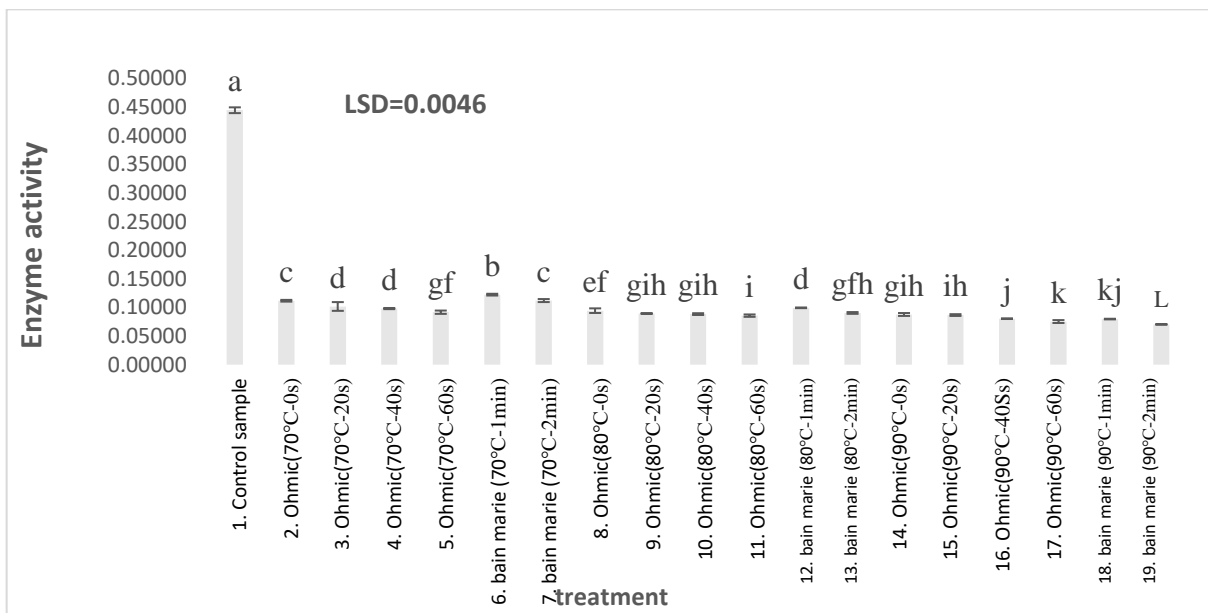


Figure 2. Mean comparisons of enzyme activity by ohmic and water bath methods

اهمیک و حمام آب انجام شده‌اند. در دمای ۷۰ درجه بین تیمارهای ۲ و ۷ و همچنین بین تیمار ۳ و ۴ اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد ولی در تیمار ۵ و ۶ با بقیه تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. کلیه زمان‌های اهمیک در ۷۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیمی پایین‌تری از حمام آب با همان

با توجه به نتایج مقایسات میانگین شکل ۲، تیمار ۱ نمونه‌ی شاهد است و اختلاف آماری معنی‌داری بین نمونه‌ی شاهد و بقیه تیمارها وجود دارد که نشان‌دهنده‌ی کاهش شدید میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز پس از تیمار حرارتی است. تیمارها در سه دما و در دو روش

زمان ۲ دقیقه در حمام آب با بقیه تیمارها اختلاف آماری معنی داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شده است. همانطور که ملاحظه می شود در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد تیمار اهمیک در همان لحظه برداشت نمونه (زمان صفر) عملیات آنزیمبری تکمیل شده است. در آزمون آنزیمبری به روش اهمیک با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت در دمای ۷۰ درجه و زمان صفر ثانیه به میزان ۸۰٪ غیرفعال شدن آنزیمی و در دمای ۸۰ درجه و زمان صفر ثانیه و در دمای ۹۰ درجه و زمان صفر بیش از ۹۰٪ غیر فعال شدن آنزیم پلی فنول اکسیداز مشاهده شد کارایی بیشتر این روش در انتقال حرارت سریعتر با نتایج کشانی و فتاحی مطابقت دارد [۱۶ و ۱۵].

### ۲-۳- تغییرات مواد جامد محلول

درجه حرارت در زمان های یک و دو دقیقه نشان دادند که نشانگر کارایی بیشتر این روش بود [۲۵]. با افزایش دما تا ۸۰ درجه بین تیمار ۸ و ۱۳ اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد همچنین در تیمارهای ۹ و ۱۰ و ۱۳ نیز اختلافی مشاهده نشد. در ضمن تیمارهای ۹ و ۱۰ و ۱۱ اختلاف آماری خاصی دیده نمی شود ولی بین تیمار ۱۲ با بقیه تیمارها اختلاف آماری معنی داری وجود دارد. کلیه زمان های اهمیک در ۸۰ درجه سانتی گراد فعالیت آنزیمی پایین تری از حمام آب با همان درجه حرارت در زمان یک دقیقه نشان دادند که نشانگر کارایی بیشتر این روش بود. در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد تیمارهای ۱۴ و ۱۵ اختلاف آماری وجود ندارد همچنین بین تیمار ۱۶ و ۱۸ اختلافی دیده نشد و بین تیمار ۱۷ و ۱۸ اختلاف آماری مشاهده نشد در صورتی که در تیمار ۱۹ یعنی

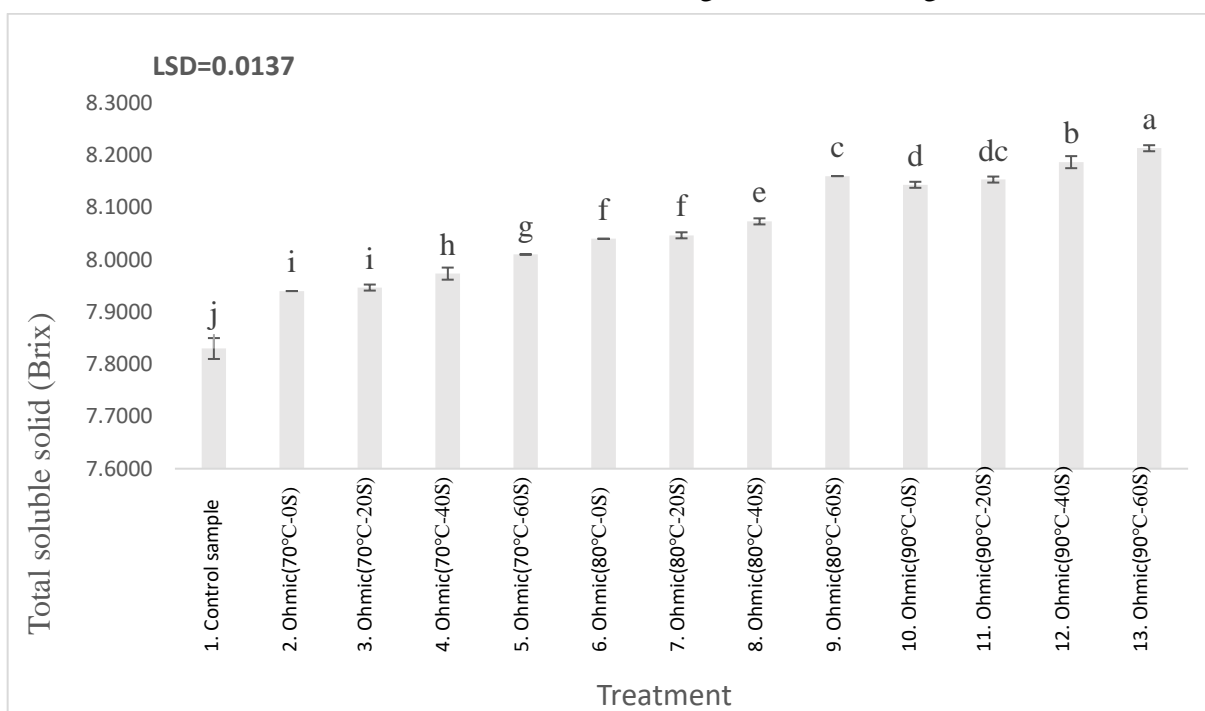


Figure 3. The results of mean comparisons of Brix value

در شکل ۳ نمودار مقایسات میانگین مواد جامد محلول تیمار ۱ نمونه شاهد بدون فرآیند حرارتی است و اختلاف آماری معنی داری با بقیه تیمارها دارد میزان مواد جامد محلول با افزایش دما و زمان افزایش می یابد. تیمار ۱۳ بیشترین میزان مواد جامد محلول را داشته است. در دمای ۷۰ درجه تیمار ۲ و ۳ اختلاف آماری وجود ندارد ولی در تیمار ۴ و ۵ اختلاف

آماری معنی داری وجود دارد. با افزایش دما تا حد ۸۰ درجه سانتی گراد بین تیمار ۶ و ۷ اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشده در صورتی که در تیمار ۸ و ۹ اختلاف آماری معنی داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. در دمای ۹۰ درجه سانتی - گراد بین تیمار ۱۰ و ۱۱ اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد در صورتی که در تیمار ۱۲ و ۱۳ اختلاف آماری معنی -



## ۳-۳- تغییرات رنگ

از بین سه مشخصه متغیرهای رنگی ( $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$ ) مقایسات میانگین پارامتر  $a^*$  که نشان‌دهنده قرمزی نمونه است در این مطالعه حائز اهمیت است.

داری با یکدیگر دارند. به طور کلی با افزایش دما و زمان حرارت دهی اهمیت میزان مواد جامد محلول به شکل معنی داری افزایش یافته است که یکی از دلایل می‌تواند باز بودن سل اهمیت و تبخیر از سطح نمونه تحت تاثیر حرارت باشد [۲۶ و ۲۷].

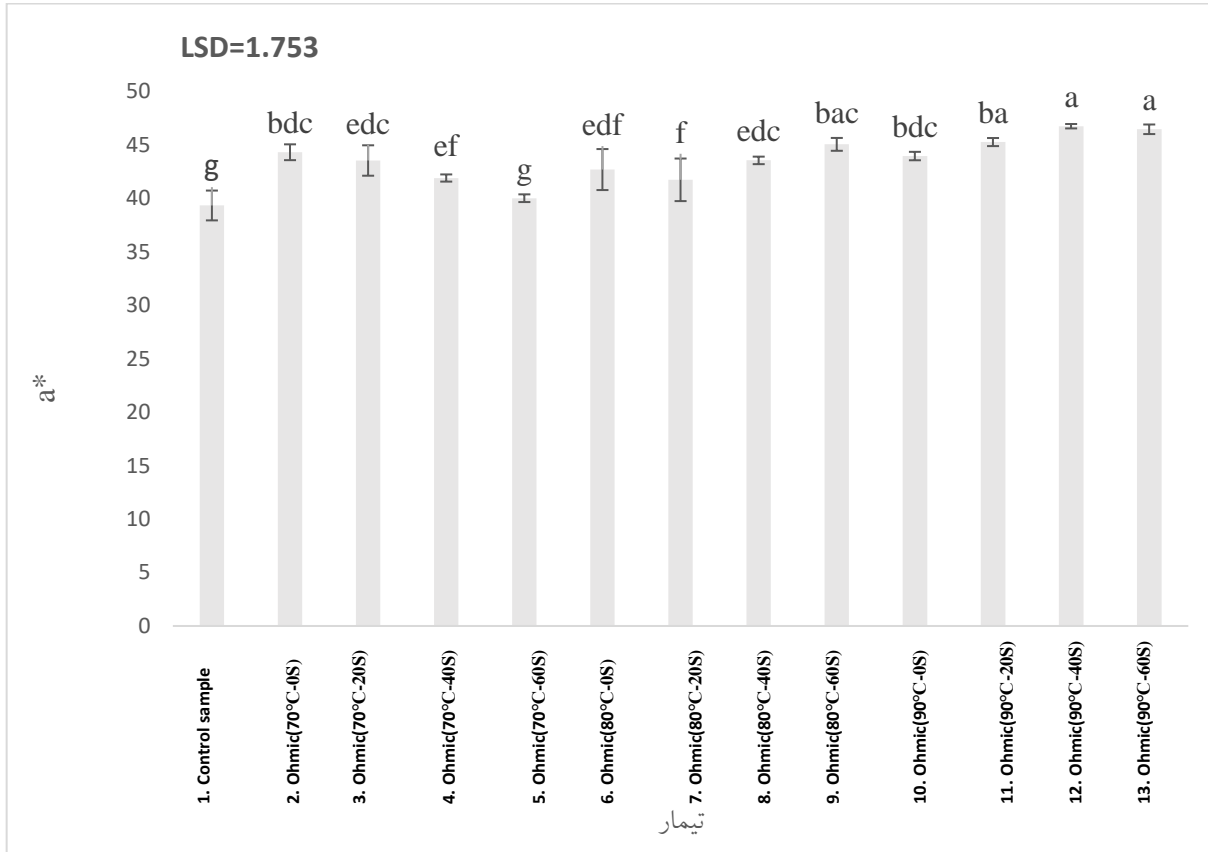


Figure 4. The results of mean comparisons of the  $a^*$  index

بین تیمار ۱۰ و ۱۱ و همچنین بین تیمار ۱۱ و ۱۲ و ۱۳ هیچ اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. همانطور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود بطور کلی در تیمار اهمیت ۸۰ درجه سانتی‌گراد زمان ۶۰ ثانیه و کلیه زمان‌های تیمار ۹۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان  $a^*$  یا قرمزی نمونه مشاهده شد که دلیل آن غیرفعال شدن سریع آنزیم و در نتیجه حفظ بهتر رنگ محصول است که حتی از نمونه کنترل هم بهتر بوده است چون در طول انجام تست رنگ سنجی در نمونه کنترل آنزیم در حال فعالیت بوده ولی در نمونه‌های مذکور آنزیم قادر به فعالیت و تخریب رنگ نبوده است.

نتایج مقایسات میانگین  $a^*$  نشان می‌دهد که، تیمار ۱ نمونه شاهد بدون فرآیند حرارتی است و فقط با تیمار ۵ اختلاف آماری معنی‌داری ندارد ولی با بقیه تیمارها اختلاف آن معنی‌دار است. میزان  $a^*$  با افزایش دما و زمان افزایش می‌یابد.

در دمای ۷۰ درجه تیمار ۲ و ۳ اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد در تیمار ۳ و ۴ نیز اختلافی دیده نشده است در صورتی که تیمار ۵ با بقیه تیمارهای دمای ۷۰ اختلاف آماری معنی‌داری دارد. با افزایش دما تا ۸۰ درجه بین تیمار ۶ و ۸ و همچنین بین تیمار ۸ و ۹ و نیز بین تیمار ۶ و ۷ اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد

## ۴- نتیجه گیری

مواد جامد محلول نسبت به آب نمونه افزایش یافت. بیشترین میزان  $a^*$  متعلق به دمای ۹۰ درجه و زمان ۴۰ و ۶۰ ثانیه بود که نشانگر افزایش رنگ قرمز نسبت به نمونه شاهد و مطلوب بود. فعالیت آنزیمی با مدل‌های کیتیکی مناسب با بالاترین ضریب رگرسیون توصیف شدند. در این پژوهش با توجه به اینکه آنزیم پلی‌فنول‌اکسیداز که عامل ایجاد رنگ است غیرفعال می‌شود در نتیجه رنگ کمتری از واکنش آنزیمی تشکیل خواهد شد و میزان رنگ باقی‌مانده از فرآیند اندازه‌گیری شد لذا با افزایش دما مدت زمان بیشتری طول کشید تا میزان رنگ تشکیل شده را اندازه گرفت و با افزایش دما میزان  $D$ -value افزایش یافت و ثابت سرعت واکنش که در اینجا ثابت سرعت تشکیل رنگ بود با افزایش دما کاهش یافت.

## ۵- فهرست منابع

- [۱] Sharma, H. K., Kaur, J., Sarkar, B. C., Singh, C., & Singh, B. (2009). Effect of pretreatment conditions on physicochemical parameters of carrot juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01462.x>
- [۲] Tola, Y. B., & Ramaswamy, H. S. (2014). Combined effects of high pressure, moderate heat and pH on the inactivation kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice. *Food Research International*, 62, 50-58. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914001057>
- [۳] Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Wu, T., Hashim, M. M., Lei, S., Zhu, X., & Zeng, X. (2014). Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 16-21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813003204>
- [۴] Hamid, M., & Khalil ur, R. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, 115(4), 1177-1186. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609002234>
- [۵] Leong, S. Y., Richter, L.-K., Knorr, D., & Oey, I. (2014). Feasibility of using pulsed electric field processing to inactivate enzymes and reduce the cutting force of carrot (*Daucus carota* var. Nantes). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 159-167. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641400071X>
- [۶] Buckow, R., Weiss, U., & Knorr, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 441-448. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856409000563>
- [۷] Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Zhao, F., Sun, Z., & Liao, X. (2016). Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 135-144. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415002040>
- [۸] Gamboa-Santos, J., Montilla, A., Soria, A. C., & Villamiel, M. (2012). Effects of conventional and ultrasound blanching on enzyme inactivation and carbohydrate content of carrots. *European Food Research and*

- Technology, 234(6), 1071-1079.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-012-1726-7>
- [۹] Liu, X., Gao, Y., Peng, X., Yang, B., Xu, H., & Zhao, J. (2008). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris L.*) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 24-31.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856407000653>
- [۱۰] Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2016). Influence of moderate electric field on inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase and on phenolic compounds of sugarcane juice treated by ohmic heating. *LWT*, 74, 396-403.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381630487X>
- [۱۱] Gomes, C. F., Sarkis, J. R., & Marczak, L. D. F. (2018). Ohmic blanching of Tetsukabuto pumpkin: Effects on peroxidase inactivation kinetics and color changes. *Journal of Food Engineering*, 233, 74-80.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877418301493>
- [۱۲] Leizeron, S., & Shimoni, E. (2005). Effect of Ultrahigh-Temperature Continuous Ohmic Heating Treatment on Fresh Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3519-3524.  
<https://doi.org/10.1021/jf0481204>
- [۱۳] Ma TingTing Ma, T., Tian ChengRui Tian, C., Luo JiYang Luo, J., Zhou Rui Zhou, R., Sun XiangYu Sun, X., & Ma JinJin Ma, J. Influence of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carrot L.*) juice. 141(3), 1637–1644.
- [۱۴] Zhang, Y., Wang, Y., Zhou, L., & Liao, X. (2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(11), 2297-2305.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02403.x>
- [۱۵] Fattahi, S., & Zamindar, N. (2021). Evaluation and Modelling of Physicochemical Changes of Tuna Fish Using Immersion Ohmic Thawing Method. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17(1), 43-53.  
[https://ifstrj.um.ac.ir/article\\_37747.html](https://ifstrj.um.ac.ir/article_37747.html)
- [۱۶] Fattahi, S., & Zamindar, N. (2020). Effect of immersion ohmic heating on thawing rate and properties of frozen tuna fish. *Food Science and Technology International*, 26(5), 453-461.  
<https://doi.org/10.1177/1082013219895884>
- [۱۷] Icier, F., Yildiz, H., & Baysal, T. (2006). Peroxidase inactivation and colour changes during ohmic blanching of pea puree. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 424-429.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405001822>
- [۱۸] Jakóáb, A., Bryjak, J., Wójtowicz, H., Illeová, V., Annus, J., & Polakovič, M. (2010). Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating. *Food Chemistry*, 123(2), 369-376.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610005042>
- [۱۹] Saxena, J., Makroo, H. A., & Srivastava, B. (2016). Optimization of time-electric field combination for PPO inactivation in sugarcane juice by ohmic heating and its shelf life assessment. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 329-338.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816301992>
- [۲۰] Kim, Y. S., Park, S. J., Cho, Y. H., & Park, J. (2001). Effects of Combined Treatment of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat on the Quality of Carrot Juice. *Journal of Food Science*, 66(9), 1355-1360.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15214.x>
- [۲۱] Ortuño, C., Duong, T., Balaban, M., & Benedito, J. (2013). Combined high hydrostatic pressure and carbon dioxide inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase and peroxidase in feijoa puree. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 56-62.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844613002350>
- [۲۲] Brochier, B., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. F. (2018). Effect of ohmic heating parameters on peroxidase inactivation, phenolic compounds degradation and color changes of sugarcane juice. *Food and Bioproducts Processing*, 111, 62-71.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308518305017>

- [۲۳] Jamali, S. N., Kashaninejad, M., Amirabadi, A. A., Aalami, M., & Khomeiri, M. (2018). Kinetics of peroxidase inactivation, color and temperature changes during pumpkin (*Cucurbita moschata*) blanching using infrared heating. *LWT*, 93, 456-462. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643818302986>
- [۲۴] Icier, F. (2010). OHMIC BLANCHING EFFECTS ON DRYING OF VEGETABLE BYPRODUCT. *Journal of Food Process Engineering*, 33(4), 661-683. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00295.x>
- [۲۵] Esmaili, Y., Zamindar, N., Paidari, S., Ibrahim, Salam A., & Mohammadi Nafchi, A. (2021). The synergistic effects of aloe vera gel and modified atmosphere packaging on the quality of strawberry fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16003. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16003>
- [۲۶] Gholipour Shahraki, N., Zamindar, N., & Hamidi, S. (2023). Heat Transfer Modeling of Malt Syrup in Semi-rigid Aluminum Based Packaging. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. [https://ifstrj.um.ac.ir/article\\_43613.html](https://ifstrj.um.ac.ir/article_43613.html)
- [۲۷] Mirmohammadi, R., Zamindar, N., Razavi, S. H., Mirmohammadi, M., & Paidari, S. (2021). Investigation of the possibility of fermentation of red grape juice and rice flour by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Food Science & Nutrition*, 9(10), 5370-5378. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2461>



## Scientific Research

## The Study of Kinetics of Polyphenol Oxidase Inactivation in Carrot Juice by Ohmic Heating

Faezeh Barati<sup>1</sup>, Nafiseh Zamindar\*<sup>2</sup>, Seyedramin Rafiaei<sup>1</sup>

1-Master Student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3 -Master Student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

**Article History:**

Received: 2023/5/29

Accepted: 2024/5/15

**Keywords:**

carrot juice,

ohmic,

polyphenol oxidase

**DOI: 10.22034/FSCT.21.153.63.**

\*Corresponding Author E-n.zamindar@khuisf.ac.ir

Carrot juice color changes from orange to brown immediately after production. Blanching is a suitable way to preserve and commercialize this product. In this study, an ohmic device was used as a heating source, and polyphenol oxidase enzyme was selected as an indicator of enzyme inactivation sufficiency to color change of carrot juice. Fresh carrot juice was subjected to thermal processing under 3 temperature levels of 70, 80, and 90 degrees of Celsius and 4 time levels of 0, 20, 40 and 60 seconds with a constant voltage of 100 volts and the enzyme inactivation, Brix, pH and color indexes  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  were checked. Constant values of reaction rate, activation energy, D-value and  $Q_{10}$  were investigated. The kinetics of inactivation of polyphenol oxidase of carrot juice samples were calculated at 70, 80 and 90 degrees of Celsius. The changes of enzyme inactivation, Brix, pH and  $a^*$  parameter with increasing temperature and time were significant at 1% probability level by completely random design. The level of enzyme inactivation was also measured by the conventional water bath method and compared with the ohmic method, and the results indicated the greater efficiency of the ohmic method. As the temperature increased, the Brix level increased and the color of carrot juice changed from orange-yellow to orange-red ( $p \leq 0.05$ ).