



بهینه سازی و بررسی سینتیک فرآیند شفاف سازی آب هویج سیاه با استفاده از آنزیم پکتیناز

نوراله مخدوم^۱، محمود رضازاد باری^۲، محمد علیزاده خالدآباد^۳، صابر امیری^{۴*}

۱- دانش آموخته کارشناس ارشد زیست فناوری مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

کلمات کلیدی:

آنزیم پکتیناز،

آب هویج سیاه،

سینتیک،

طرح باکس بنکن،

شفاف سازی

DOI: 10.22034/FSCT.22.165.44.

* مسئول مکاتبات:

sa.amiri@urmia.ac.ir

هدف از این مطالعه، بهینه سازی فعالیت و بررسی سینتیک آنزیم پکتیناز (EC 3.2.1.15) در شفاف سازی آب هویج سیاه می باشد. بدین منظور تاثیر فاکتورهای مستقل، شامل غلظت های مختلف آنزیم پکتیناز (۶.۷، ۵، ۷.۷ gr/hl)، بریکس (۷.۷/۷۵، ۶/۲۵، ۵/۵، ۴/۷۵، ۴ درجه بریکس)، زمان (۵/۵، ۳، ۰/۵ ساعت) و دما (۵۵، ۵۰، ۴۵ درجه سانتیگراد) بر شفاف سازی و ویژگی های آب هویج سیاه بررسی شد. بدین منظور براساس بیشینه مقدار رنگ، کمینه مقدار کدورت و بیشینه مقدار آنتوسیانین و با طرح آماری باکس-بنکن^۱ شرایط بهینه تعیین گردید. بیشترین تاثیر آنزیم پکتیناز در پانزده دقیقه ابتدایی صورت گرفت. در این بازه نمودار تغییرات بصورت خطی بود و بعد از آن تقریباً روند ثابتی را طی کرد و میزان کاهش کدورت بعد از این مدت روند نزولی را طی کرد و بسیار ناچیز کاهش پیدا کرد ولی متوقف نشد. نیز بیشترین تاثیر آنزیم پکتیناز در افزایش رنگ در دوازده دقیقه ابتدایی صورت گرفت. در این مدت نمودار بصورت خطی بود و بعد از آن روند تغییرات بسیار کند بود. براساس نتایج، تاثیر دما، زمان و غلظت آنزیم بر کاهش کدورت معنی دار بوده ($p \leq 0.05$) و همچنین اثر دما و زمان بر کاهش کدورت بصورت نمایی بود. اثر زمان فرآیند بر تغییرات رنگ معنی دار نبود ولی اثر زمان و غلظت آنزیم بر افزایش رنگ معنی دار و بصورت درجه دو بود و با افزایش دما از ۴۵ به ۵۰ درجه سانتیگراد، شدت رنگ افزایش داشت و با افزایش دما تا ۵۵ درجه سانتیگراد، شدت رنگ کاهش یافت. تاثیر هرسه فاکتور مورد مطالعه بر میزان آنتوسیانین معنی دار بود و با افزایش دما، زمان و غلظت آنزیم، مقدار آنتوسیانین افزایش داشت. نقطه بهینه شفاف سازی در مقدار غلظت ۷.۷ g/hl، زمان ۵/۵ ساعت و دمای ۵۵ درجه سانتیگراد بدست آمد. نتیجه گیری کلی نشان داد شرایط بهینه بدست آمده، تاثیر مثبت بر ویژگی های کیفی محصول را نشان داد.

۱-مقدمه

آب میوه اساساً مایع تخمیر نشده اما قابل تخمیر است که از قسمت‌های خوراکی میوه‌های بالغ استخراج می‌شود [۱]. طبق تعریف کدکس آب میوه‌های خوش طعم تخمیر نشده که برای مصرف مستقیم در نظر گرفته می‌شود، «مایع حاصل از پردازش مکانیکی میوه‌های رسیده تازه یا سالم، که منحصر با وسایل فیزیکی نگهداری می‌شوند، به دست می‌آید» [۲].

آب میوه‌ها منبع غنی از ترکیبات پلی فنلی و همچنین کاروتنوئیدها هستند، بسیاری از مردم از اهمیت مصرف آنها در رژیم غذایی روزانه خود آگاه هستند [۳]. گردش مالی بالا، صنعت آب میوه را به سمت تولید محصولات با کیفیت بالا سوق داده است که مغذی هستند و بصورت حداقلی فرآوری شده‌اند تا فواید سلامتی خود را حفظ کنند [۴]. از آنجاییکه ظاهر شفاف آب میوه یک عامل تعیین کننده برای مصرف کنندگان است، صنعت آب میوه روی روش‌هایی سرمایه گذاری می‌کند که این ویژگی را بهینه می‌کند [۵]. به طور معمول، آب میوه شفاف به عنوان یک نوشیدنی، آماده مصرف می‌شود. در مقابل، آب غلیظ برای مصرف نوشیدنی بازسازی می‌شود یا می‌تواند به عنوان طعم دهنده در بسیاری از محصولات مانند بستنی و مربا استفاده شود. آب میوه ابری حاصل از فشردن میوه، یک سوسپانسیون کلوئیدی است که محلولی از پکتین، قندها و تانن‌ها است [۴]. برای به دست آوردن آب میوه‌ای شفاف، این ذرات معلق باید حذف شوند. این فرآیند به عنوان شفاف سازی، یکی از مهمترین عملیات واحد در فرآوری آب میوه‌ها شناخته می‌شود [۶]. تیمار آنزیمی همچنین امکان استفاده موثر از عوامل شفاف کننده را برای کمک به حذف کدورت فراهم می‌کند. افزودن مواد صاف کننده یا شفاف کننده برای اصلاح شفافیت، رنگ، طعم و یا ثبات آب میوه‌ها در نظر گرفته شده است. آنها بر اساس ماهیت کلی خود در (i) مواد زمینی (بتونیت، کائولن) (ii) پروتئین‌ها (ژلاتین، کازئین، آلبومین)، (iii) پلی

ساکاریدها (آگارها)، (iv) کربن، (v) پلیمرهای مصنوعی (PVPP، نایلون)، (vi) دی اکسیدسیلیکون (کیزل سل)؛ و (vii) سایرین، از جمله شلاتورهای فلزی، آنزیم‌ها و غیره گروه بندی می‌شوند [۷].

پکتینازها مجموعه‌ای از آنزیم‌های متعدد هستند که دارای یک بستر مشترک، یعنی پکتین هستند. به دلیل ناهمگونی ساختاری پکتین می‌توانند روی قسمت‌های مختلف پکتین اثر بگذارند. بنابراین در گروه‌های مختلفی مانند پروتوپکتینازها، پلی گالاکتورو نازها، پلی متیل استرازها، پکتین لیازها و پکتات لیازها قرار گرفته‌اند [۸]. پکتین‌ها یک نام عمومی برای مخلوطی از ترکیبات بسویار متفاوت حاوی پکتینیک اسید به عنوان جزء اصلی است [۹]. پکتینازها با آبکافت ترکیبات پکتیکی موجب ناپایداری کمپلکس‌های پروتئین-پکتین می‌شوند. این کمپلکس‌ها دارای یک هسته پروتئینی با بار مثبت هستند که با مولکول‌های پکتین با بار منفی احاطه شده‌اند. آبکافت جزئی مولکولهای پکتین موجب در معرض قرار گرفتن سطوح بابر مثبت و ناپایداری کمپلکس‌ها می‌شود. در ادامه، دافعه الکترواستاتیکی بین ذرات کاهش یافته و کمپلکس‌ها به همدیگر می‌پیوندند و تشکیل ذراتی سنگین تر را می‌دهند. همزمان با این اتفاقات ته نشینی صورت می‌گیرد که از قانون استوک پیروی می‌کند. [۱۰] شفاف سازی آب میوه با ژلاتین و بتونیت یک روش صنعتی رایج است [۷]. این ها ترکیباتی جاذب هستند که به عنوان شفاف ساز استفاده می‌شوند و هنگامی که به آب میوه اضافه می‌شوند رسوب لخته‌ای تشکیل می‌شود [۱۱]. بتونیت یک ماده معدنی طبیعی برپایه خاک رس است که متعلق به گروه مونت موریلونیت‌ها (سیلیکات‌های هیدرات آلومینیوم) است که در آب متورم می‌شود و سپس ژله‌ای می‌شود [۱۲]. بتونیت علاوه بر ویژگی جذب سطحی با دادن بار منفی به آب میوه سبب شفاف شدن آن می‌شود [۱۱] اثرات ژلاتین و بتونیت به ترتیب در جهت جذب ترکیبات فنلی و پروتئینی است [۱۴]. ژلاتین یک ترکیب جاذب

پروتئینی است که موجب ته‌نشینی ذرات با بار منفی مانند پلی‌فنل‌ها و ترکیبات پکتیکی (عوامل کدورت ثانویه) می‌شوند [۱۱]. کدورت کم و احتباس آنتوسیانین بالا به عنوان شاخص‌های اصلی برای شفاف‌سازی آب‌میوه‌های غنی از آنتوسیانین مانند آب‌توت‌فرنگی و آب‌انار در نظر گرفته می‌شود [۱۵].

رنگ یک شاخص مهم در ارزیابی کیفیت غذاها است. تفاوت رنگ در میوه‌ها و سبزیجات در طول فصول و اثرات منفی فرآوری و ذخیره‌سازی، اغلب استفاده از رنگ‌ها را از نظر تجاری برای حفظ رنگ مورد علاقه مصرف‌کننده ضروری می‌کند. با این حال، در دهه‌های اخیر، ایمنی رنگ‌های خوراکی موضوعی بسیار متناقض بوده است و تقریباً تمام نظرات علیه رنگ‌های مصنوعی بوده است. به دلیل اقدامات قانونی و نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد استفاده از افزودنی‌های مصنوعی، علاقه قابل توجهی به رنگ‌های غذایی به دست آمده از منابع طبیعی وجود دارد [۱۶]. در سالهای اخیر هویج سیاه بخاطر رنگ فوق العاده و وجود ترکیبات فنلی ارتقا دهنده سلامت بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۱۷]. پیکربندی ساختاری ترکیبات فنلی هویج سیاه نشان دهنده وجود یک حلقه معطر منفرد است که اسیدهای فنولیک را تشکیل می‌دهد. به همین ترتیب، اسیدهای کلروژنیک که مشتقات اسید هیدروکسی سینامیک هستند که ناشی از استریفیکاسیون اسیدهای سینامیک (اسیدهای کافئیک، فرولیک و پی‌کوماریک) هستند نیز در هویج یافت می‌شوند [۱۸]. علاوه بر این، هویج سیاه حاوی محتوای نسبتاً بالاتری از فلاونوئیدها در مقایسه با هویج نارنجی یا قرمز است. این فلاونوئیدها از نظر نقش بیوشیمیایی و دارویی آنها به عنوان ضد اکسیدان، ضد التهابی، ضد آترواسکلروز، تجمع ضد پلاکت، ضد تومور، ضد میکروبی مهم هستند [۱۹]. به طور مشابه،

وجود یک ترکیبات فعال زیستی بی‌شمار مانند کاروتنوئیدها، پلی‌استیلن‌ها، فاکاریندیول، فاکاریندیول-۳-استات و آنتوسیانین‌ها (سیانیدین، دلفینیدین، پتونیدین، پونیدین، مالویدین و پلارگونیدین) حائز اهمیت است. [۲۰]. آنتوسیانین‌ها برخلاف دیگر ترکیبات فنلی در حین رسیدن میوه افزایش می‌یابند و بعد از رسیدن به یک مقدار معین ثابت باقی می‌مانند. [۲۱]. آنتوسیانین‌های موجود در هویج سیاه در محدوده pH گسترده‌تر و در دماهای بالا به دلیل شکل‌های آسیده بالاتر در مقایسه با سایر آنتوسیانین‌های میوه یا سبزیجات، پایدارتر هستند [۲۲]. این ویژگی‌ها، صنایع غذایی را قادر می‌سازد تا از آنتوسیانین‌های هویج سیاه به عنوان رنگ طبیعی به جای کارمین و دیگر رنگ‌های سنتزی استفاده کنند [۲۳].

هدف از این مطالعه بررسی، تاثیر فاکتورهای مختلف بر فعالیت آنزیم پکتیناز در شفاف‌سازی آب‌هویج سیاه، بهبود فرایند تولید با شناسایی سینتیک آنزیمی، نیز بررسی تاثیر فرایندهای بکار گرفته شده در کیفیت محصول می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد مورد استفاده

مواد اولیه شامل هویج سیاه از مزارع دزفول، آنزیم پکتیناز XXL شرکت نو^۲ دانمارک، اسید سیتریک شرکت جوین-ایران، ژلاتین شرکت اربی ژل^۳-آلمان، بتونیت از شرکت باریت فلات-ایران، اتانول طبی از شرکت پاکدیس ارومیه-ایران، کاغذ صافی از برند اشنایدر شول^۴-آلمان و اسید کلریدریک ۳۷ درصد از شرکت مرک^۵-آلمان مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲ آماده‌سازی نمونه‌ها

4- Schleicher & Schull

5-Merck

2 -Novozyme

3-Erbigel

ابتدا برای تهیه مش، هویج سیاه توسط رنده معمولی ویا رنده ریز به قطعات کوچک تبدیل شده وبا کمی آب اسید دار(اسید سیتریک با خلوص ۹۹.۳ درصد) مخلوط شد. مقدار آب اسیددار طوری تنظیم شد که اسیدیته آب هویج سیاه پس از فشردن در محدوده $2/8-3/2$ g/l قرار بگیرد. مش اسید دار به مدت ۱-۲ دقیقه در دمای ۵۵-۶۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. مش حرارت دیده با فشردن آب گیری شد (دستگاه آب گیری دستی). برای اندازه گیری مقادیر کدورت و رنگ در طول شفاف سازی، مقدار مناسبی آب مقطر در بن ماری ریخته شد و دمای آن روی چهل و پنج الی پنجاه و پنج درجه سانتیگراد تنظیم شد.

۳-۲ طرح آزمایشی

بر اساس طرح باکس بنکن^۶، تاثیر ۳ فاکتور غلظت آنزیم پکتیناز، زمان ودما بر ۳ فاکتور کیفی بررسی شد. بدین صورت که تاثیر غلظت های مختلف آنزیم پکتیناز ($5, 6.7, 10$ gr/hl) در زمان های مختلف ($5/5, 3, 5/5$ ساعت) و دماهای مختلف ($55, 50, 45$ درجه سانتیگراد) بر ۳ فاکتور کدورت، رنگ و آنتوسیانین بررسی شد. غلظت ژلاتین (5 g/hl) و بتونیت (150 g/hl) در تمام موارد یکسان بود. در این طرح از ۳ بن ماری مختلف استفاده شد تا تاثیر شرایط مختلف بر روند کار نیز بررسی شده و خطا به حداقل کاهش یابد. به این صورت که غلظت های مختلف آنزیم در دماها و زمان های یکسان و متفاوت در بن ماری های مختلف تکرار شد.

۳-۲-۱ اندازه گیری کدورت

ابتدا دمای بن ماری روی دمای مورد نظر تنظیم شد. پس از افزودن مقادیر مختلف آنزیم به آب میوه و منفی بودن تست پکتیناز

با استفاده از اسید الکل (۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷ درصد و ۹۹ میلی لیتر اتانول طبی ۹۶ درصد)، ژلاتین (5 g/hl) و بتونیت (150 g/hl) افزوده شد (مطابق جدول ۱). بعد از گذشت مدت زمان تعیین شده، آب هویج سیاه با کاغذ صافی فیلتر شده و کدورت آن اندازه گیری شد. برای اندازه گیری کدورت از توریدیمتر (کدورت سنج)-HACH مدل Loveland-2100 ساخت آمریکا استفاده شد.

۳-۲-۲ اندازه گیری رنگ

ابتدا دمای بن ماری روی دمای مورد نظر تنظیم شد. پس از افزودن مقادیر مختلف آنزیم به آب میوه و منفی بودن تست پکتیناز با استفاده از اسید الکل (۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷ درصد و ۹۹ میلی لیتر اتانول طبی ۹۶ درصد)، ژلاتین (5 g/hl) و بتونیت (150 g/hl) افزوده شد (مطابق جدول ۱). و بعد از گذشت مدت زمان تعیین شده، آب هویج سیاه با کاغذ صافی فیلتر شد و بریکس آن به $25/10$ کاهش داده شد و رنگ آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج $520/430$ بررسی شد. برای اندازه گیری رنگ از UV/Vis اسپکتروفتومتر- مدل ۷۳۱۰-uk Staffs، ساخت انگلیس استفاده شد. بریکس آب میوه با رفاکتومتر Atago Rx-7000a, Tokyo, Japan اندازه گیری شد.

Table 1: The experimental design matrix

Run	A: Temperatur (°C)	B: Time (h)	C:			
			Enzyme concentration (g.h)	NTU	Colour	Anthocyanins (mg/100 gr)
1	45	5.5	6	5.80	1.019	25.52
2	45	3	5	8/88	1.001	12.20
3	50	0.5	5	12.20	1.008	10.88
4	50	3	6	4.40	1.025	29.75

6- Box-Behnken

5	45	0.5	6	11.80	1.01	10.25
6	45	3	7	7.20	1.005	22.54
7	55	3	7	4.95	1.002	54.27
8	50	0.5	7	7.70	1.018	14.56
9	50	3	6	4.90	1.022	28.90
10	50	3	6	5.20	1.017	26.20
11	55	5.5	6	2.40	0.994	50.20
12	50	5.5	7	2.90	1.022	35.60
13	50	5.5	5	4.22	1.014	28.25
14	55	3	5	5.80	0.985	42.50
15	55	0.5	6	10.80	0.997	17.70

یخچال قرار داده شد. از نمونه‌های شفاف‌شده آب‌هویج سیاه، در هر مرحله رقت تهیه شد و دمای آنها تا ۴ درجه کاهش داده شد و سپس با دستگاه سانتریفیوژ Hettich Rotina/s با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برداشته شد و جذب در ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر خوانده شد [۱۶].

برای محاسبه از فرمول زیر استفاده شد.

$$TA = \frac{A \times V}{M}$$

$$A = B - C$$

$B =$ اختلاف جذب نمونه در pH برابر ۱ در طول موج (A520 nm - A700 nm)

$C =$ اختلاف جذب نمونه در pH برابر ۴/۵ در طول موج (A520 nm - A700 nm)

$V =$ حجم نمونه (میلی لیتر)

$M =$ وزن نمونه (گرم)

$TA =$ آنتوسیانین کل

۲-۴ بررسی سیتیک فعالیت آنزیم

۳-۲-۳ اندازه‌گیری آنتوسیانین

ابتدا دمای بن‌ماری تنظیم شد. پس از افزودن مقادیر مختلف آنزیم به آب‌میوه و منفی بودن تست پکتیناز، ژلاتین (vg/hl) و بنتونیت (۱۵۰ g/hl) افزوده شد (مطابق جدول ۱). بعد از گذشت مدت زمان تعیین شده، آب‌هویج سیاه با کاغذ صافی فیلتر شده و آب‌میوه شفاف برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد. سپس برای اندازه‌گیری آنتوسیانین ابتدا بافر تهیه شد. بافر pH ۱/۰ (کلرید پتاسیم، ۰/۰۲۵ مولار). - ۱/۸۶ گرم KCl در یک بشر وزن شد و آب مقطر تا حدود ۹۸۰ میلی‌لیتر اضافه شد. pH با HCl (حدود ۶/۳ میلی‌لیتر) روی ۱/۰ (۰/۰۵) تنظیم شد. نمونه به یک بالن حجمی یک لیتری منتقل شد و با آب مقطر به حجم رقیق شد. بافر pH ۴/۵ (استات سدیم، ۰/۴ مولار). - ۵۴/۴۳ گرم $CH_3CO_2Na_3H_2O$ در یک بشر وزن شد و آب مقطر تا حدود ۹۶۰ میلی‌لیتر اضافه شد. pH با HCl (حدود ۲۰ میلی‌لیتر) روی (۴/۵ ۰/۰۵) تنظیم شد. به یک بالن حجمی یک لیتری منتقل شد و با آب مقطر به حجم رقیق شد. سپس رقت تهیه شد. ضریب رقت مناسب با رقیق کردن نمونه آزمایش با بافر pH ۱/۰، تا زمانی که جذب در ۵۲۰ نانومتر در محدوده خطی اسپکتروفتومتر قرار گرفت، تعیین شد. با استفاده از این ضریب رقت، دو رقت نمونه آزمایش، یکی با بافر pH ۱/۰ و دیگری با بافر pH ۴/۵ تهیه شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و بعد نمونه‌ها تا رسیدن به دمای ۴ درجه سانتیگراد در

تغییرات NTU و رنگ، با ۳ غلظت آنزیم پکتینازودر ۶ بریکس مختلف مطابق جداول ۳، ۴ و ۵ بررسی شد. سپس از طرح لاین ویور-برک^۷ برای بررسی سینتیک فعالیت آنزیم استفاده شد.

۲-۴-۱ اندازه گیری کدورت

آب هویج سیاه درشش بشرصد میلی لیتر با بریکس های مختلف ریخته شد ودمای بن ماری روی پنجاه درجه سانتیگراد تنظیم شد سپس طبق جداول ۳، ۴ و ۵ غلظت های مختلف آنزیم افزوده شد. سپس از منفی شدن تست آنزیم پکتیناز با استفاده از اسید الکل (۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷ درصد و ۹۹ میلی لیتر اتانول طبی ۹۶ درصد)، مقادیر ثابت ژلاتین (Vg/hl) و بتونیت (۱۵۰g/hl) افزوده شد. سپس آب-هویج سیاه به فواصل ۳ دقیقه ای با کاغذ صافی فیلتر شده و کدورت آن با دستگاه توربیدومتر سنجیده شد و نتایج ثبت شد. این کار تا دقیقه ۳۶ ادامه داده شد. برای اندازه گیری کدورت از توربیدومتر (کدورت سنج) HACH مدل Loveland-2100 ساخت آمریکا استفاده شد. بریکس آب-

میوه با رفاکومتر Atago Rx-7000a, Tokyo, Japan اندازه گیری شد.

۲-۴-۲ اندازه گیری رنگ

آب هویج سیاه درشش بشر صد میلی لیتر با بریکس های مختلف ریخته شد ودمای بن ماری روی پنجاه درجه سانتیگراد تنظیم شد سپس طبق جداول ۳، ۴ و ۵ غلظت های مختلف آنزیم افزوده شد و پس از منفی بودن تست آنزیم پکتیناز، با استفاده از اسید الکل (۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷ درصد و ۹۹ میلی لیتر اتانول طبی ۹۶ درصد)، مقادیر ثابت ژلاتین (Vg/hl) و بتونیت (۱۵۰g/hl) افزوده شد. سپس آب-هویج سیاه به فواصل ۳ دقیقه ای با کاغذ صافی فیلتر شده و بریکس آن به ۰/۲۵ کاهش داده شد و رنگ آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰/۴۳۰ بررسی شد. این کار تا دقیقه ۳۶ ادامه داده شد. برای اندازه گیری رنگ از UV/Vis اسپکتروفتومتر- مدل ۷۳۱۰-uk Staffs، Stone- ساخت انگلیس استفاده شد. بریکس آب میوه با رفاکومتر Atago Rx-7000a, Tokyo, Japan اندازه گیری شد.

Table 2: Changes in colour and NTU at the concentration of 7 g/hl

Time min	BX=7.75		BX=7.00		BX=6.25		BX=5.5		BX=4.75		BX=4.00	
	Colour1	NTU	Colour2	NTU	Colour3	NTU	Colour4	NTU	Colour5	NTU	Colour6	NTU
0	0.956	33	0.956	30	0.956	26	0.956	23	0.956	20	0.956	18
3	0.981	30	0.985	28	0.988	22	0.992	20	0.996	17	1	14
6	0.994	22	0.997	19	0.999	16	1.003	14	1.007	12	1.012	10.2
9	1.009	14.8	1.011	13.7	1.014	11	1.017	9.2	1.02	8.5	1.024	7.9
12	1.017	8.8	1.018	6.2	1.022	5.7	1.025	5.2	1.028	4.7	1.03	3.9
15	1.022	3.01	1.024	2.97	1.026	2.92	1.029	2.88	1.031	2.81	1.033	2.7
18	1.023	2.97	1.025	2.95	1.027	2.9	1.03	2.86	1.033	2.79	1.034	2.68
21	1.025	2.94	1.027	2.91	1.029	2.87	1.032	2.83	1.034	2.77	1.036	2.66
24	1.027	2.9	1.029	2.88	1.03	2.84	1.034	2.8	1.036	2.75	1.038	2.65
27	1.028	2.88	1.031	2.85	1.032	2.8	1.036	2.77	1.038	2.73	1.039	2.63
30	1.03	2.85	1.033	2.83	1.034	2.77	1.038	2.73	1.04	2.71	1.041	2.61

7-Lineweaver-burk

33	1.031	2.81	1.034	2.77	1.035	2.68	1.039	2.62	1.041	2.58	1.043	2.52
36	1.033	2.75	1.035	2.7	1.037	2.57	1.041	2.51	1.43	2.45	1.044	2.38

Table 3: Changes in colour and NTU in the concentration of 6 g/hl pectinase enzyme

Time min	BX=7.75		BX=7.00		BX=6.25		BX=5.5		BX=4.75		BX=4.00	
	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU
0	0.956	33	0.956	30	0.956	26	0.956	23	0.956	22	0.956	21
3	0.966	30	0.967	27	0.97	23	0.973	19	0.974	17	0.976	17
6	0.975	25	0.976	22	0.981	17	0.986	14	0.987	13	0.989	13
9	0.984	20	0.985	16	0.991	11	0.996	9	0.998	9	1	8.8
12	0.992	16	0.993	11	1.001	8	1.006	7	1.008	6	1.011	8.1
15	1	13	1	8	1.008	6	1.014	6	1.016	5.5	1.019	5.1
18	1.007	11	1.007	6	1.016	5.5	1.022	5.5	1.024	5	1.026	4.6
21	1.013	9	1.014	5.5	1.024	5	1.024	5	1.026	4.5	1.028	4.4
24	1.016	7.3	1.017	5	1.028	4.7	1.025	4.5	1.028	4.2	1.03	4.1
27	1.019	6.1	1.02	4.7	1.024	4.4	1.026	4.2	1.03	3.9	1.031	3.8
30	1.021	5.1	1.023	4.4	1.027	4.1	1.028	3.9	1.032	3.6	1.032	3.5
33	1.023	4.3	1.025	4.1	1.03	3.8	1.03	3.6	1.034	3.3	1.035	3.2
36	1.025	4	1.027	3.8	1.031	3.6	1.032	3.3	1.036	3.2	1.038	3.1

Table 4: Changes in colour and NTU at a concentration of 5 g/hl of pectinase enzyme

Time min	BX=7.75		BX=7.00		BX=6.25		BX=5.5		BX=4.75		BX=4.00	
	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU	Colour	NTU
0	0.956	30	0.956	27	0.956	24	0.956	23	0.956	22	0.956	21
3	0.963	27	0.965	24	0.966	20	0.968	19	0.969	17	0.969	16
6	0.97	23	0.973	20	0.974	16	0.976	15	0.977	13	0.977	12
9	0.975	19	0.979	16	0.982	12	0.984	11	0.985	9	0.985	8
12	0.98	16	0.984	12	0.989	8	0.99	7	0.992	8	0.993	7

15	0.985	14	0.989	10.2	0.994	6.9	0.996	6.5	0.998	7	1	6
18	0.989	12	0.994	8.7	0.999	6	1.001	6	1.004	6.5	1.006	5.4
21	0.993	10.2	0.999	7.8	1.004	5.2	1.006	5.5	1.008	5	1.011	5
24	0.997	8.7	1.004	7	1.008	5	1.011	5.1	1.012	4.7	1.015	4.6
27	1	7.2	1.008	6.2	1.012	4.8	1.014	4.7	1.016	4.5	1.019	4.2
30	1.003	6.3	1.011	5.6	1.016	4.6	1.017	4.5	1.02	4.3	1.023	4.1
33	1.006	5.5	1.014	5	1.019	4.4	1.02	4.3	1.023	4.1	1.026	4
36	1.008	4.9	1.016	4.7	1.022	4.3	1.023	4.1	1.026	4	1.029	3.9

۲-۵ تجزیه و تحلیل آماری

درمورد ویژگی‌های کمی از آمار توصیفی به کمک میانگین و انحراف معیار استفاده شد و برای مقایسه میانگین نتایج آزمون‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. آنالیز داده‌ها با نرم افزار اکسل انجام شد.

۳-۳ نتایج و بحث

۳-۱ بررسی تغییرات کدورت

مطابق شکل (A) ۱ تاثیر فاکتورهای زمان و غلظت آنزیم بعلت داشتن $P < 0.05$ در کاهش کدورت معنی‌دار می‌باشند بدین صورت که با افزایش زمان و غلظت آنزیم، کدورت کاهش می‌یابد نیز بعلت F-value بسیار بیشتر زمان نسبت به غلظت آنزیم، افزایش زمان تاثیر معنی‌دار بسیار بیشتری نسبت به غلظت آنزیم در کاهش کدورت نشان می‌دهد. مطابق شکل (B) ۲ دما بصورت درجه دو بعلت $P < 0.05$ در کاهش کدورت معنی‌دار می‌باشد. همانطور که در نمودار مشخص است تاثیر دما در ارتباط با غلظت آنزیم بصورت نمایی است. کمترین کدورت در غلظت 6 g/hl آنزیم پکتینازو در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و بعد از ۵/۵ ساعت بدست آمد. بعد از آنالیز داده‌ها معادله پیشگویی کننده برای تخمین کدورت به صورت زیر تعیین گردید:

$$\text{Turbidity} = 172.77 - 5.37 \text{ Te} - 4.63 \text{ time} - 1.99 \text{ dose} + 0.318 \text{ time} * \text{dose} + 0.54 \text{ Te}^2 + 0.227 \text{ time}^2$$

به طور کلی مدل مورد استفاده برای پیش بینی داده‌ها بر روی کدورت آب‌میوه‌ها معنی‌دار بود با:

$$R^2 = 0.966$$

$$\text{Adjusted } R^2 = 0.940$$

به طور کلی، کدورت نشان‌دهنده وجود ذرات کلوئیدی معلق جامد در نمونه‌های آب‌میوه است و افزودن پکتینازها باعث تجزیه پکتین و در نتیجه کاهش کدورت می‌شود [۲۴]. وانگ و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که با افزایش افزودن آنزیم پکتیناز، سرعت واکنش آنزیمی افزایش و کدورت کاهش یافت. با این حال، زمانی که مقدار افزودن آنزیم پکتیناز به افزایش ادامه داد، اثر بهبود در کدورت شراب چای برنج چسبناک، بعلت کاهش سوبسترا (پکتین) دیگر قابل توجه نبود [۲۴]. گل از یلماز و اسنور گونای (۲۰۲۳) نشان دادند که با افزایش میزان آنزیم مورد استفاده، کدورت به دلیل تجزیه آنزیمی پلی‌ساکاریدها کاهش یافت. [۲۵]. دیمان و همکاران (۲۰۱۱) آنزیم زایلاناز منشا گرفته از باسیلوس-*استئاروترموفیلوس* را در شفاف‌سازی آب‌اناناس با RSM بهینه کردند. در پایان فرآیند آنزیمی، مشخص شد که کدورت ۳۵/۳۴ درصد کاهش یافت [۲۶].. ادریس آرژو، میرخلیل پیروزی فرد و سجاد پیرسا (۲۰۱۸) کاهش کدورت در شربت چغندر قند بر اثر تیمار آنزیم پکتیناز را گزارش کردند [۱۰].

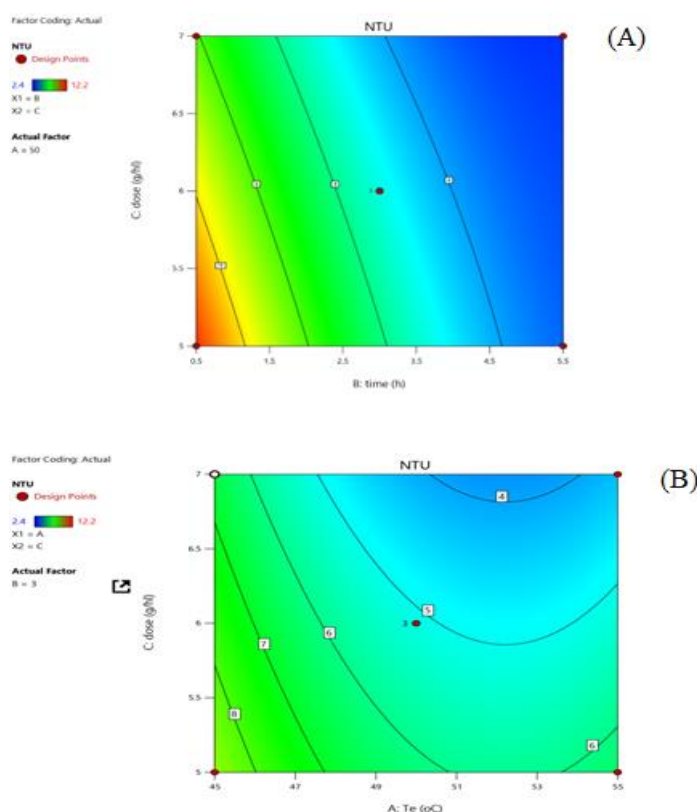


Figure 1: (A) Changes of NTU with enzyme concentration and time, (B) NTU changes with enzyme concentration and temperature

Colour: $-0.84 + 0.06 \text{ Te} + 0.08 \text{ dose} - 0.00067 \text{ Te}^2 - 0.006 \text{ dose}^2$

۲-۳ بررسی تغییرات رنگ

به طور کلی مدل مورد استفاده برای پیش بینی داده‌ها بر روی رنگ آب‌میوه‌ها معنی دار بود:

$$R^2=0.9$$

$$\text{Adjusted } R^2=0.860$$

نورجانا آی ونورآزیا (۲۰۱۱) تاثیر غلظت‌های مختلف آنزیم پکتیناز را بر فاکتورهای مختلف در آب دوریان بررسی کردند. نشان داده شد که با افزایش غلظت آنزیم، رنگ به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد [۲۷]. حرارت دادن فرصتی برای واکنش‌های اکسیداتیو ایجاد می‌کند که باعث تخریب رنگدانه‌ها می‌شود. افزایش و کاهش رنگ با مطالعات فوق مطابقت دارد بطوریکه رنگ از دمای ۴۵ تا ۵۵ درجه سانتیگراد افزایش یافت و در ادامه با افزایش دما، رنگ کاهش یافت.

مطابق شکل ۳ زمان انکوباسیون در افزایش یا کاهش رنگ بی‌تاثیر است. دما و غلظت آنزیم بعلاوه این که دارای $P < 0.05$ هستند در افزایش رنگ معنی‌دار بوده و دارای اثر درجه دو می‌باشند بطوریکه با افزایش دما از ۴۵ به ۵۰ درجه سانتیگراد رنگ افزایش می‌یابد و با افزایش بیشتر تا ۵۵ درجه سانتیگراد رنگ کاهش می‌یابد. دما بعلاوه دارا بودن F-value بیشتر و P-value کمتر نسبت به غلظت آنزیم تاثیر بیشتری در افزایش رنگ دارد.

بیشترین رنگ در غلظت ۶ g/hl و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و بعد از ۳ ساعت بدست آمد.

بعد از آنالیز داده‌ها معادله پیشگویی کننده برای تخمین رنگ به صورت زیر تعیین گردید:

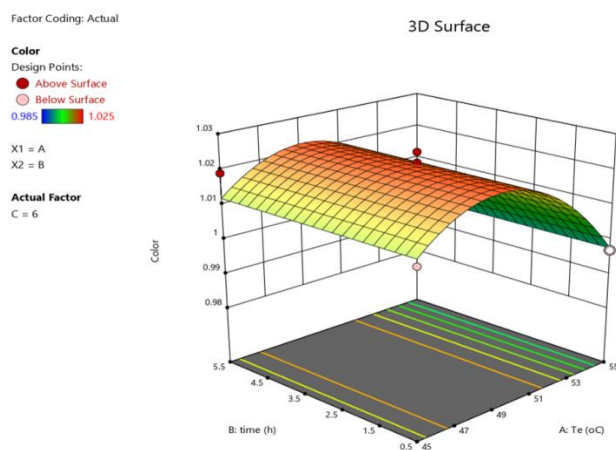


Figure 2: Color relationship with time and temperature

۳-۳- بررسی تغییرات آنتوسیانین

مطابق شکل ۳(A,B,C) تاثیر هر سه فاکتور دما، زمان و غلظت آنزیم بعلا درآب بودن $p \leq 0.05$ در تغییرات آنتوسیانین معنی دار می باشد. رابطه هر ۳ فاکتور با آنتوسیانین بصورت خطی است با افزایش هر کدام از این فاکتورها آنتوسیانین افزایش می یابد. باتوجه به F-value، غلظت آنزیم کمترین و دما بیشترین تاثیر را در تغییر آنتوسیانین دارند. بیشترین مقدار آنتوسیانین در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و زمان سه ساعت و با غلظت ۷g/hl آنزیم پکتیناز بدست آمد. بعد از آنالیز داده ها معادله پیشگویی کننده برای تخمین آنتوسیانین به صورت زیر تعیین گردید:

$$\text{Anthocyanin(mg/100gr)} = -128.194 + 2.35Te + 4.30\text{time} + 4.14\text{dose}$$

به طور کلی مدل مورد استفاده برای پیش بینی داده ها بر روی آنتوسیانین آب میوه ها معنی دار بود با:

$$R^2 = 0.826$$

$$\text{Adjusted } R^2 = 0.778$$

بوکت اورهان درلی و همکاران (۲۰۲۳) کاهش ۱۲ درصدی آنتوسیانین های مونومر پس از پکتین زدایی در آب توت فرنگی را مشاهده کردند [۱۵]. ولی برخلاف مطالعه آنها تورکیلماز و همکاران (۲۰۱۲) افزایش محتوای آنتوسیانین های

آب هویج سیاه را پس از پکتین زدایی مشاهده کردند [۱۶]. این ممکن است به دلیل تفاوت بین نسبت های پکتین و پروتئین در آب هویج سیاه و آب توت فرنگی و همچنین پایداری های متفاوت آنتوسیانین در هر دو آب میوه باشد. نسبت پکتین (۳/۱۴ گرم بر کیلوگرم) [۲۶]. به پروتئین (۴/۱۱ گرم بر کیلوگرم) [۲۹]. در آب هویج سیاه ۲/۱ است، در حالی که این نسبت برای آب توت فرنگی ۲۰۹ است. بنابراین، تنها بخش پایینی از پکتین آزاد در مقدار زیاد پس از پکتین زدایی آب توت فرنگی می تواند به پروتئین در آن متصل شود، زیرا محتوای پروتئین آب توت فرنگی بسیار کمتر از آن است. محتوای پکتین بقیه پکتین آزاد با بار منفی می توانند با آنتوسیانین های مونومر با بار مثبت در آب توت فرنگی تعامل داشته باشند که به نوبه خود ممکن است منجر به ایجاد رنگدانه باعث افزایش تراکم و ثبات رنگ شود. از آنجاییکه هویج سیاه دارای پکتین است ابتدا پکتین زدایی برای تجزیه ماده پکتین و تشکیل فلوک های پکتین پروتئینی انجام شد که به راحتی از آب میوه جدا می شوند. به دلیل محتوای کم پکتین در آب هویج سیاه، پکتین می تواند در محتوای پایین تر به آنتوسیانین های مونومر وصل شود [۳۰]. بنابراین، تغییرات در محتوای آنتوسیانین در آب هویج سیاه پس از پکتین زدایی، ممکن است عمدتاً ناشی از آزاد سازی آنتوسیانین های مونومر به دلیل تخریب دیواره سلولی باشد، نه کوپیگمانتاسیون با پکتین. برآیند افزایش محتوای آنتوسیانین با تیمار آنزیمی و

کاهش نسبی آن در طول شفاف‌سازی با ژلاتین و بتونیت باعث کاهش شیب افزایش محتوی آنتوسیانین در مقایسه با تاثیر افزایش دما و زمان شده است [۱۶].

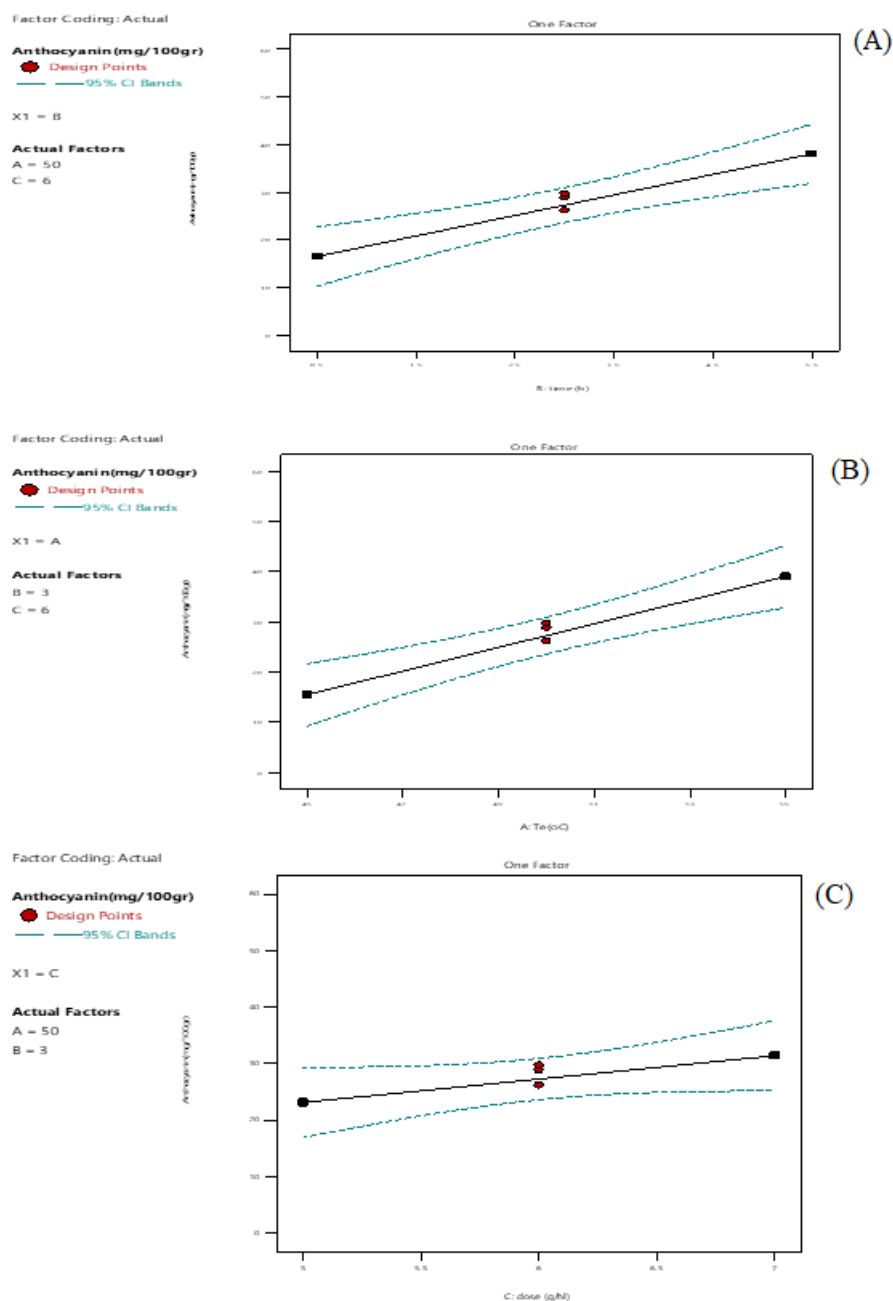


Figure 3(A):Anthocyanin changes with time (B) Anthocyanin changes with temperature (C) Anthocyanin changes with enzyme concentration

۳-۴ بررسی سینتیک فعالیت آنزیم

طبق مدل لاین ویور-برک^۸ با محاسبه حداکثر سرعت واکنش آنزیمی (V_{max}) برابر ۱۶۷۶۶ و ثابت K_m برابر ۶۹/۵۸۱ از داده‌های بدست آمده، مطابق اعداد جدول زیر می‌توان نمودار تغییرات کدورت را در غلظت ۷g/hl آنزیم رسم نمود.

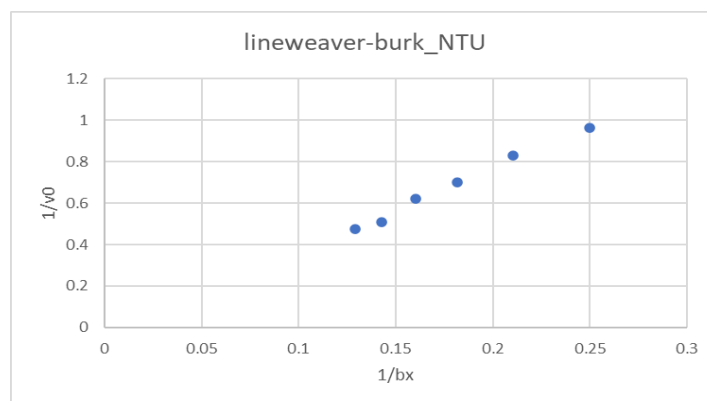


Figure 4: The NTU changes according to the concentration of 7 g/hl of pectinase enzyme

طبق مدل لاین ویور-برک با محاسبه V_{max} برابر ۰/۰۰۴۳۶ و ثابت K_m برابر ۱/۰۰۲۲- از داده‌های بدست آمده، مطابق اعداد جدول زیر می‌توان نمودار تغییرات رنگ را در غلظت ۷g/hl آنزیم رسم کرد.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بیشترین تاثیر آنزیم پکتیناز بر مقدار کدورت در ۱۵ دقیقه ابتدایی صورت می‌گیرد در این بازه نمودار تغییرات بصورت خطی است و بعد از آن تقریباً روند ثابتی را طی می‌کند. و میزان کاهش کدورت بعد از ۱۵ دقیقه ابتدایی کند شده و بسیار کم کاهش پیدا می‌کند ولی متوقف نمی‌شود.

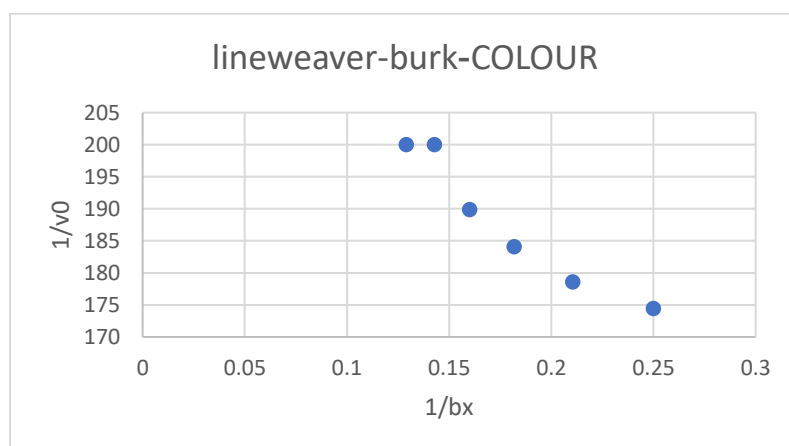


Figure 5: The colour changes according to the concentration of 7 g/hl of pectinase enzyme

بررسی شکل ۵ نشان می‌دهد که بیشترین تاثیر آنزیم پکتیناز در افزایش رنگ در دوازده دقیقه ابتدایی می‌باشد. در این بازه

نمودار افزایش رنگ تقریباً بصورت خطی است و بعد از آن، رنگ با روند ثابت و بسیار کند افزایش می‌یابد ولی متوقف نمی‌شود.

طبق مدل لاین‌ویور-برک با محاسبه V_{max} برابر $2/9339$ و ثابت K_m برابر $7/2865$ از داده‌های بدست آمده، مطابق اعداد جدول زیر می‌توان نمودار تغییرات کدورت را در غلظت 6 g/hl آنزیم رسم نمود.

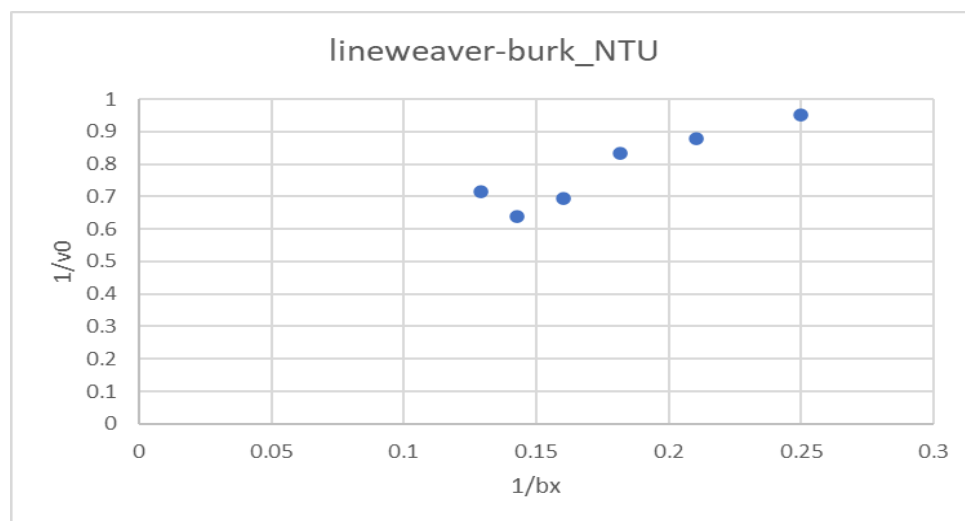


Figure 6: Kinetics of changes in NTU concentration of 6 g/hl of pectinase enzyme

بررسی شکل ۶ مشخص می‌کند که در غلظت 6 g/hl آنزیم پکتیناز، تغییرات کدورت بصورت منظم و خطی نبوده و روند یکسانی را طی نمی‌کند.

طبق مدل لاین‌ویور-برک با محاسبه V_{max} برابر $0/00232$ و ثابت K_m برابر $2/0875$ از داده‌های بدست آمده، مطابق اعداد جدول زیر می‌توان نمودار تغییرات رنگ را در غلظت 6 g/hl آنزیم رسم کرد.

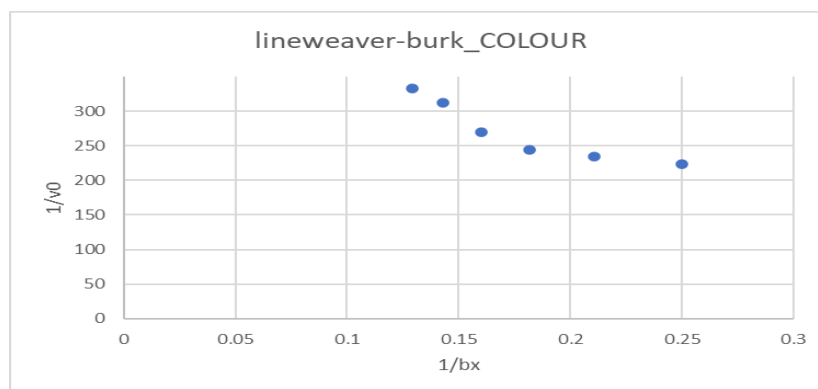


Figure 7: Kinetics of colour changes with a concentration of 6 g/hl of pectinase enzyme

مطابق شکل ۷ بیشترین تغییرات رنگ در ۱۲ دقیقه ابتدایی می‌باشد و روند افزایش آن در ابتدا کم سپس با گذشت زمان بیشتر می‌شود.

طبق مدل لاین‌ویور-برک با محاسبه V_{max} برابر $1/4591$ و ثابت K_m برابر $1/775$ از داده‌های بدست آمده، مطابق اعداد جدول زیر می‌توان نمودار تغییرات کدورت را در غلظت 5 g/hl آنزیم رسم نمود.

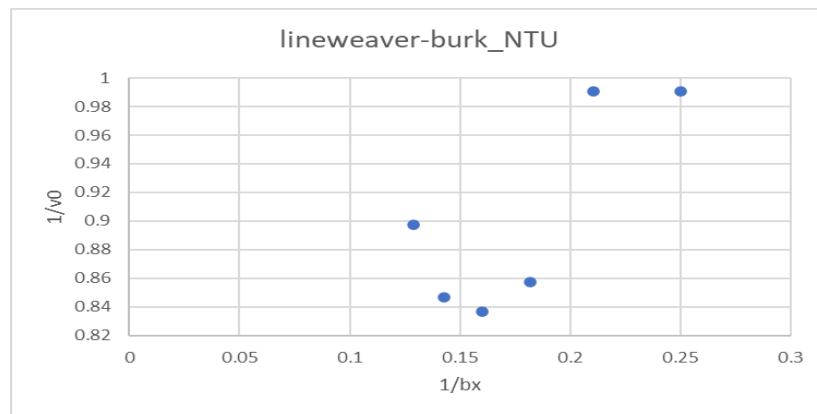


Figure 8: Kinetics of NTU changes with a concentration of 5 g/hl of pectinase enzyme

بررسی شکل ۸ نشان می‌دهد که در این غلظت آنزیم روند کاهش کدورت بسیار نامنظم بوده و از فرمول خاصی پیروی نمی‌کند. ۵-۳ بهینه‌سازی فرآیند شفاف‌سازی مطابق نمودارها نقطه بهینه فرآیند تقریباً در غلظت ۷g/hl آنزیم پکتینازو در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و در زمان ۵/۵ می‌باشد.

Table 5: The optimal values obtained

Temperature	time	dose	NTU	Color	Anthocyanin (mg/100gr)	Desirability
54.99	5.49	6.99	3.051	0.99	53.97	0.96

Factor Coding: Actual

Overlay Plot

NTU
Anthocyanin(mg/100gr)
X1 = A
X2 = B

Actual Factor

C = 6.99999

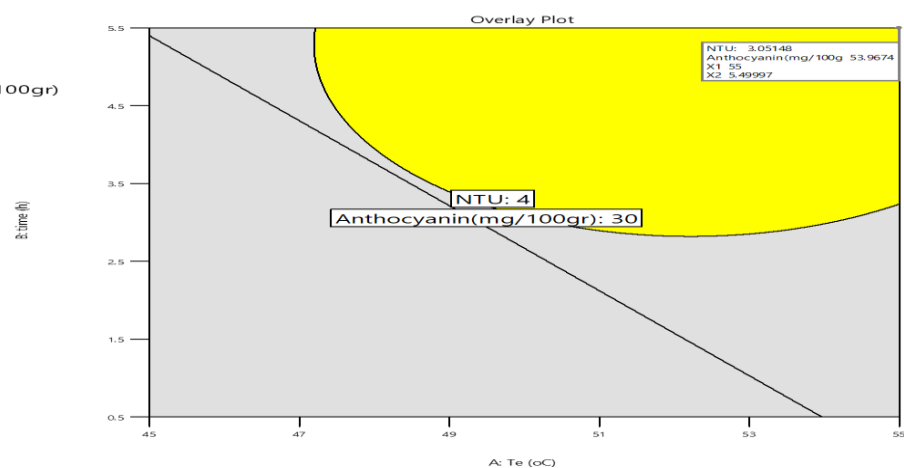


Figure 9: The optimal range obtained

۴- نتیجه‌گیری

تعیین کردند. در این پژوهش مقادیر مختلف آنزیم پکتیناز در دماها و زمان‌های مختلف برای تعیین نقطه بهینه مصرف بررسی شدند. نهایتاً نقطه بهینه شفاف‌سازی در مقدار غلظت ۷g/l، زمان ۵/۵ ساعت و دمای ۵۵ درجه سانتیگراد بدست آمد. نتیجه‌گیری کلی نشان داد شرایط بهینه بدست آمده، تاثیر مثبت بر ویژگی‌های کیفی محصول را نشان داد.

آب‌میوه‌ها برای اینکه برای مصرف کننده مقبولیت و جذابیت داشته باشند باید تحت عملیات شفاف‌سازی آنزیمی و همچنین مواد کمک فرایند قرار بگیرند. اما این فرایند باید به گونه‌ای باشد که علاوه بر جذابیت تجاری، جنبه‌های تغذیه‌ای و مصرف مواد هم باید مد نظر قرار گیرد. و محدود به بهینه مصرف آن که فاکتورهای مهم کیفی از جمله آنتوسیانین، مقدار کدورت و رنگ در بهترین حالت ممکن باشند، باید

۵- منابع

- [1] Amiri, S., & Rajabi, M. (2021). *An overview of the application of natural antimicrobial compounds from plant, animal and microbial origin in foods*. Journal of food science and technology (Iran), 18(119), 143-156.
- [2] Chen, M.-F., 2009. Attitude toward organic foods among Taiwanese as related to health consciousness, environmental attitudes, and the mediating effects of a healthy lifestyle. *Br. Food J.* 111 (2), 165-178.
- [3] Alizadeh, S., Pirs, S., & Amiri, S. (2023). Development of a colorimetric sensor based on nanofiber cellulose film modified with ninhydrin to measure the formalin index of fruit juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127035.
- [4] Pirs, S., Banafshechin, E., Amiri, S., Rahimirad, A., & Ghafarzadeh, J. (2021). *Detection of fraud of palm, sunflower, and corn oil in butter using HPLC profile of tocopherols and tocotrienols by response surface method*. Journal of the Iranian Chemical Society, 18, 1167-1177.
- [5] Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., & da Silveira, M. M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT-food Science and Technology*, 44(10), 2217-2222.
- [6] Tajchakavit, S., J.I. Boye and R. Couture, "Effect of processing on post-bottling haze formation in apple juice", *Food Research Internat.*, 34, 415-424 (2001).
- [7] Benitez, E. I., & Lozano, J. E. (2007). Effect of gelatin on apple juice turbidity. *Latin American applied research*, 37(4), 261-266
- [8] Nighojkar, A., Patidar, M. K., & Nighojkar, S. (2019). Pectinases: production and applications for fruit juice beverages. In *Processing and sustainability of beverages* (pp. 235-273). Woodhead Publishing.
- [9] Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.
- [10] Arjeh, E., Pirouzifard, M. K., & Pirs, S. (2018). Enzymatic pre-treatment of raw sugar beet juice using pectinase to improve the conventional purification process. *Innovative Food Technologies*, 6(1), 45-54.
- [11] Arjeh, E., Pirouzifard, M., & Pirs, S. (2019). Purification of beet molasses using bentonite and gelatin: process evaluation and optimization. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(88), 289-301
- [12] Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., & De Faveri, D. M. (2012). Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *International journal of food science & technology*, 47(1), 1-
- [13] Akshi Aziz, Summer 1999, Transparency of Juice, Mirkhalil Victory Fard, Urmia, University Jihad Publications, 178
- [14] Gökmen, V., & Çetinkaya, Ö. (2007). Effect of pretreatment with gelatin and bentonite on permeate flux and fouling layer resistance during apple juice ultrafiltration. *Journal of food engineering*, 80(1), 300-305.
- [15] Dereli, B. O., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2023). Clarification of pomegranate and strawberry juices: Effects of various clarification agents on turbidity, anthocyanins, colour, phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 413, 135672.
- [16] Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2012). Kinetics of anthocyanin degradation and polymeric colour formation in black carrot juice concentrates during storage. *International journal of food science & technology*, 47(11), 2273-2281.
- [17] Amiri, S., Rezazad Bari, L., Malekzadeh, S., Amiri, S., Mostashari, P., & Ahmadi Gheshlagh, P.

- (2022). Effect of Aloe vera gel-based active coating incorporated with catechin nanoemulsion and calcium chloride on postharvest quality of fresh strawberry fruit. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10), e15960.
- [18] Chatatikun, M., & Chiabchalard, A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(4), 97-102.
- [19] Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- [20] Akhtar, S., Rauf, A., Imran, M., Qamar, M., Riaz, M., & Mubarak, M. S. (2017). Black carrot (*Daucus carota* L.), dietary and health promoting perspectives of its polyphenols: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 36-47.
- [21] Rezazad Bari, L., & Amiri, S. (2022). The Application of Packaging Containing Titanium Dioxide Nanoparticles on the Physicochemical and Biochemical Characteristics of Grape Fruit During Cold Storage. *Packaging Science and Art*, 12(48), 1-10.
- [22] Witrowa-Rajchert, D., Bawół, A., Czapski, J., & Kidoń, M. (2009). Studies on drying of purple carrot roots. *Drying Technology*, 27(12), 1325-1331.
- [23] Kırca, A., Özkan, M., & Cemeroğlu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food chemistry*, 101(1), 212-218.
- [24] Wang, Q., Liu, K. Y., Zhang, Q., An, J. S., Xie, Z. Z., Chen, Z., ... & Li, R. Y. (2023). Optimisation of clarification process of glutinous rice tea wine, and its antioxidant activity. *International Food Research Journal*, 30(1), 205-215.
- [25] Ozyilmaz, G., & Gunay, E. (2023). Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulase. *Food Chemistry*, 398, 133900.
- [26] Dhiman, S. S., Garg, G., Sharma, J., & Mahajan, R. (2011). Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. *New Biotechnology*, 28(6), 746-755.
- [27] Norjana, I., & Noor Aziah, A. A. (2011). Quality attributes of durian (*Durio zibethinus* Murr) juice after pectinase enzyme treatment. *International Food Research Journal*, 18(3).
- [28] Yusuf, E., Tkacz, K., Turkiewicz, I. P., Wojdyło, A., & Nowicka, P. (2021). Analysis of chemical compounds' content in different varieties of carrots, including qualification and quantification of sugars, organic acids, minerals, and bioactive compounds by UPLC. *European Food Research and Technology*, 247, 3053-3062.
- [29] Saleem, M. Q., Akhtar, S., Imran, M., Riaz, M., Rauf, A., Mubarak, M. S., ... & Hassanien, M. F. (2018). Antibacterial and anticancer characteristics of black carrot (*Daucus Carota*) extracts. *J. Med. Spice Plants*, 22, 40-44.
- [30] Legentil, A., Guichard, I., Piffaut, B., & Haluk, J. P. (1995). Characterization of strawberry pectin extracted by chemical means. *LWT-Food Science and Technology*, 28(6), 569-576.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Optimizing and investigating the kinetics of black carrot juice clarification process using pectinase enzyme

Norollah Makhdoom¹, Mahmoudreza zad Bari², Mohammad Alizadeh Khaledabad³, Saber Amiri^{4*}

1-Master's degree in Food Biotechnology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3 -Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

4-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2024/8/22

Accepted: 2024/12/30

Keywords:

Pectinase enzyme,

Black carrot juice,

Kinetics,

Box–Behnken design,

Clarification

DOI: 10.22034/FSCT.22.165.44.

*Corresponding Author E-

sa.amiri@urmia.ac.ir

ABSTRACT

This study aims to optimize the activity and investigate the kinetics of the pectinase enzyme (EC 3.2.1.15) in clarifying black carrot juice. For this purpose, the effect of independent factors, including different concentrations of pectinase enzyme (5, 6, and 7 gr/hl), brix (4, 4.75, 5.5, 6.25, 7, and 7.75 °Brix), time (0.5, 3, and 5.5 h), and temperatures (45, 50, and 55 °C) were investigated for the clarification and characteristics of black carrot juice. For this purpose, optimal conditions were determined based on the maximum amount of color, the minimum amount of turbidity and the maximum amount of anthocyanin and the Box–Behnken statistical design. The greatest effect of the pectinase enzyme occurred in the first fifteen minutes. The change graph was linear in this period and followed an almost constant trend. The rate of turbidity decrease after this period followed a downward trend and decreased very slightly but did not stop. Also, the greatest effect of the pectinase enzyme in increasing color occurred in the first twelve minutes. In this period, the graph was linear and then the change trend was very slow. Based on the results, the effect of temperature, time and enzyme concentration on turbidity reduction was significant ($p \leq 0.05$) and also the effect of temperature and time on turbidity reduction was exponential or quadratic. The effect of process time on color changes was not significant, but the effect of time and enzyme concentration on the increase of color was significant and quadratic, and increasing the temperature from 45 to 50 °C, the color intensity increased, and increasing the temperature to 55 °C, the color intensity decreased. The effect of all three studied factors on the amount of anthocyanin was significant and the amount of anthocyanin increased with increasing temperature, time and enzyme concentration. The optimal point of clarification was obtained at a concentration of 7 g/hl, a time of 5.5 h and a temperature of 55 °C. The general conclusion showed that the optimal conditions obtained had a positive effect on the qualitative characteristics of the product.