

بررسی تأثیر هم زمان امواج فراصوت و حرارت بر غیرفعال سازی آنزیم پکتین متیل استراز آب پرتقال

ندا مهماندوست^۱، رسول کدخدایی^{۲*}، محمدتقی حامد موسویان^۳

۱- مدرس گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان

۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه کشاورزی و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی

۳- دانشیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲)

چکیده

در این تحقیق تأثیر هم زمان امواج فراصوت و حرارت بر غیرفعال ساختن آنزیم پکتین متیل استراز در آب پرتقال مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور آب پرتقال تازه در چهار دمای ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت با سطوح انرژی متفاوت و فرکانس ثابت ۳۰kHz قرار داده شد و سپس فعالیت باقیمانده‌ی آنزیم پکتین متیل استراز اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصله نشان داد که امواج فراصوت و دما با یکدیگر اثر هم افزایی داشته؛ به طوری که استفاده هم زمان فراصوت و حرارت منجر به غیر فعال شدن بیشتر آنزیم گردید. با این وجود محاسبات سینتیکی و ثابت سرعت واکنش مشخص ساخت که افزایش دما از شدت کاویتاسیون کاسته و سهم امواج فراصوت در تخریب آنزیم را کم می‌کند. از سوی دیگر نتایج بررسی تأثیر سطح انرژی امواج بر روی غیر فعال شدن آنزیم نشان داد که با افزایش شدت موج میزان از بین رفتن آن افزایش و سپس کاهش می‌یابد. در این مقاله این تغییرات با استفاده از پارامترهای فعال سازی $\Delta H^\#$ و $\Delta S^\#$ بررسی شده و مکانسیم اثر تخریبی امواج فراصوت بر روی آنزیم پکتین متیل استراز توضیح داده می‌شود.

کلید واژگان: امواج فراصوت، پکتین متیل استراز، کاویتاسیون، فعالیت باقیمانده.

۱- مقدمه

این هدف بکار می‌رود؛ حرارت است که علاوه بر غیر فعال کردن آنزیم، ارزش تغذیه‌ای و ویژگی‌های کیفی آب پرتقال را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱]. بنابراین؛ جستجوی روش‌های دیگری که ضمن از بین بردن آنزیم حداقل تأثیر را بر خواص کیفی و تغذیه‌ای ماده‌ی غذایی داشته باشد، موضوعی است که توجه محققین و متخصصین صنعت غذا را به خود جلب کرده است. در بین روش‌های پیشنهادی، امواج فراصوت پتانسیل بالقوه‌ای برای این منظور دارند [۲]. مکانسیم تخریبی این امواج بر روی آنزیم‌ها از طریق ایجاد کاویتاسیون و انفجار حباب‌ها و تشکیل نقاط داغ میکروسکوپی با حرارت حدود

کدورت آب پرتقال یکی از ویژگی‌های حسی حائز اهمیت در کیفیت و بازار پسنندی این محصول به شمار می‌آید. این ویژگی به علت حضور ترکیبات پکتیکی مختلف می‌باشد که با ایجاد سامانه کلوئیدی و پراکنش نور موجب کدر شدن ظاهر آب پرتقال می‌شوند. با این حال این ترکیبات به تدریج توسط آنزیم‌های پکتیناز تجزیه شده و به این ترتیب کدورت آب پرتقال از گالاتوروناز تجزیه شده و به این ترتیب کدورت آب پرتقال یکی دست می‌رود. از این رو حفظ کدورت طبیعی آب پرتقال یکی از اهداف اصلی است که در تولید و فرآوری این محصول دنبال می‌شود. رایج‌ترین روشی که در حال حاضر برای تحقق

*مسئول مکاتبات: rkadkhodaee@yahoo.com

بیشتری در این زمینه انجام شود و مکانیسم تأثیر امواج فراصوت و عوامل مؤثر بر آن قبل از بکارگیری آنها در مقیاس تجاری و صنعتی شناسایی شوند. از این رو در این پژوهش، امکان استفاده هم زمان از امواج فراصوت و حرارت در غیرفعال سازی آنزیم پکتین متیل استراز آب پرتقال بررسی گردید و تأثیر شدت امواج فراصوت، دما و زمان فرآیند مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی

پکتین سیب (درجه متیلاسیون ۷۰-۷۵٪ و ۱۰٪ رطوبت) از شرکت سیگما آلدریج (کشور آلمان) و هیدروکسید سدیم (درجه خلوص حداقل ۹۷٪) از شرکت مرک (کشور آلمان) خریداری شدند. برای تهیه محلول‌ها از آب مقطر دیونیزه استفاده شد.

۲-۲- استخراج و آماده سازی آب پرتقال

پرتقال رقم مصری از بازار محلی تهیه و پس از شستشو و خشک کردن به چهار قسمت بریده شد و عصاره آن توسط آب میوه گیر پرسی استخراج گردید. به منظور جداسازی ذرات معلق پالپ و اجزای بافت میوه عصاره استخراج شده به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. برای جداسازی کامل ذرات معلق باقیمانده بخش شفاف عصاره به کمک پمپ خلاء از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد.

۲-۳- اعمال فراصوت به آب پرتقال

۵ میلی لیتر آب پرتقال صاف شده به یک لوله‌ی آزمایش شیشه‌ای به قطر داخلی ۱ سانتی متر و عمق ۱۰ سانتی متر منتقل و به مدت ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه به صورت پیوسته در معرض امواج فراصوت با شدت ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد قرار داده شد. در طول مدت اعمال فراصوت دمای نمونه با قرار دادن آن در حمام آب در دمای ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. برای اعمال فراصوت از یک دستگاه سونیکاتور آزمایشگاهی (مدل UP50H، ساخت شرکت دکتر هیلشر در کشور آلمان) با فرکانس ثابت ۳۰kHz و حداکثر توان اسمی ۵۰ وات استفاده شد. انتقال امواج فراصوت از کریستال پیزوالکتریک به نمونه توسط یک سونوترود مخروطی ناقص از جنس تیتانیوم به قطر ۳ میلی‌متر و طول ۱۰ سانتی متر انجام گردید. برای اطمینان از تکرار پذیری نتایج و به حداقل رساندن خطای آزمایشات محل قرار

درجه کلویین و فشار ۵۰۰ بار است. در این شرایط مولکول‌های آب سونولیز شده و رادیکال‌های آزاد تولید می‌گردند که خاصیت اکسیدکنندگی و واکنش‌دهندگی بسیار زیادی با ترکیبات مختلف از جمله پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را دارند [۴۳]. علاوه بر این، ارتعاش دیواره حبیب‌ها و انفجار آنها در میدان کاویتاسیون نیز تنش برشی زیادی در محیط اطراف ایجاد می‌کند که می‌تواند حتی پیوند‌های کووالانسی را بشکند و مولکول‌های پلیمری از جمله پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را تخریب کند [۷، ۵، ۶]. بررسی‌های زیادی در زمینه استفاده از امواج فراصوت در غیرفعال سازی آنزیم‌ها توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف از جمله لویز و بورگوس، لویز و همکاران، ورس و همکاران، ماناس و همکاران، کو و همکاران، و پوتاپویچ و همکاران انجام گرفته است [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳]. لویز و همکاران در زمره اولین گروه‌های پژوهشی هستند که غیرفعال شدن آنزیم‌های پکتیکی را با استفاده از فشار، حرارت و امواج فراصوت مورد مطالعه قرار دادند [۱۴]. آنها گزارش کردند که استفاده هم زمان از فشار، حرارت و امواج فراصوت موجب غیرفعال شدن آنزیم‌های پکتیکی گوجه‌فرنگی می‌شود، هر چند حساسیت آنزیم پکتین متیل استراز به این شرایط بسیار بیشتر از پکتین گالاکتوروناز می‌باشد. در تحقیقی مشابه؛ ورس و همکاران مقاومت آنزیم پکتین متیل استراز آب پرتقال را در شرایط واقعی و در سامانه بافر فسفات نسبت به استفاده هم زمان از فشار، حرارت و امواج فراصوت بررسی کردند [۱۵]. آنها دریافتند که مقاومت این آنزیم به عوامل مذکور در سامانه بافر فسفات به مراتب کمتر از محیط آب پرتقال است و افزایش دما در محدوده‌ی ۳۸ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش اثر امواج فراصوت گردید. این گروه پژوهشی در مطالعه‌ی دیگر بر روی آنزیم‌های پکتیکی گوجه‌فرنگی به نتایجی مشابه لویز و همکاران در سال ۱۹۹۸ دست یافتند و گزارش کردند که فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز در پایان عملیات اعمال فراصوت، فشار و حرارت به کلی از بین رفت اما فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز فقط ۶۲٪ کاهش یافت [۱۶].

جستجوی نویسندگان در منابع علمی تخصصی نشان می‌دهد که تحقیقات چندانی در مورد تأثیر امواج فراصوت بر روی آنزیم پکتین متیل استراز آب پرتقال انجام نشده و با توجه به این که اکثر مطالعات نیز در سامانه‌های مدل انجام شده و کمتر در محیط‌های غذایی واقعی بوده است؛ لازم است تحقیقات

گردیدند. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell نسخه ۲۰۰۷ (شرکت مایکروسافت، کشور آمریکا) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر دما بر فعالیت آنزیم پکتین متیل

استراز

بررسی تأثیر عملیات حرارتی بر فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز نشان داد که تغییرات فعالیت آن نسبت به زمان در دماهای مورد آزمایش به صورت خطی و با ضریب تعیین بسیار بالایی ($R^2 > 0.9$) از سینتیک واکنش درجه‌ی اول پیروی کرد (شکل ۱). شیب این خطوط که مبین ثابت سرعت یا ضریب غیرفعال شدن آنزیم پکتین متیل استراز می‌باشد، در محاسبه‌ی زمان کاهش اعشاری (D) استفاده شد. این نتایج در جدول ۱ آورده شده‌اند. چنان که ملاحظه می‌شود با افزایش دما؛ سرعت غیرفعال شدن آنزیم زیاد می‌شود، به طوری که در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان لازم برای ۹۰٪ کاهش در فعالیت آنزیم به ۱۰ درصد مقدار آن در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تنزل می‌یابد. از داده‌های جدول ۱ می‌توان میزان مقاومت حرارتی (Z) این آنزیم را محاسبه نمود. بر این اساس مقاومت آنزیم پکتین متیل استراز به حرارت ۳۲/۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین می‌شود که نشانگر پایداری نسبتاً بالای این آنزیم به حرارت می‌باشد. در پژوهشی مشابه که توسط ورست و همکاران انجام شد؛ مقاومت حرارتی این آنزیم را $35/7^\circ\text{C}$ گزارش کردند که بسیار نزدیک به عدد بدست آمده در این مطالعه می‌باشد [۱۵]. در شکل ۲ تغییرات ثابت سرعت غیرفعال شدن آنزیم پکتین متیل استراز نسبت به معکوس دمای مطلق در مقیاس نیمه‌لگاریتمی ترسیم شده است. مطابق رابطه‌ی آرنیوس، شیب این خط نسبت انرژی اکتیواسیون لازم برای غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم به ثابت عمومی گازها و عرض از مبدأ آن ثابت آرنیوس یا ضریب تصادم می‌باشد. با جایگذاری مقدار عددی ثابت عمومی گازها در معادله شیب خط؛ انرژی اکتیواسیون موردنیاز برای غیرفعال کردن آنزیم پکتین متیل استراز با استفاده از حرارت معادل $61/12 \text{ kJ/mol}$ بدست می‌آید که بسیار کمتر از مقدار گزارش شده توسط ورست و همکاران می‌باشد [۱۵]. این اختلاف احتمالاً مربوط به تفاوت نوع و نسبت ایزوآنزیم‌های پکتین متیل استراز در ارقام مورد بررسی در این دو مطالعه می‌باشد. به طور کلی رقم پرتقال و درجه رسیدگی آن نسبت ایزوآنزیم‌های حساس و مقاوم به حرارت پکتین

گیری سونوتروود مرکز لوله و عمق غوطه وری آن ۱ سانتی متر زیر سطح نمونه انتخاب شد.

پس از اعمال فراصوت با فرو بردن لوله در آب سرد دمای نمونه به سرعت تا دمای محیط کاهش داده شد و سنجش فعالیت باقیمانده‌ی آنزیم پکتین متیل استراز به روش پیشنهادی کیمبال به عمل آمد [۱۷]. بر اساس این روش ۵ میلی لیتر آب پرتقال با ۲۰ میلی لیتر محلول ۱٪ پکتین در آب نمک ۰/۱ درصد مخلوط گردید و pH آن با محلول سود ۲ نرمال در نقطه ۷ تنظیم شد. سپس pH مخلوط با کمک محلول سود ۰/۰۵ نرمال به ۷/۷ رسانده شد و مجدداً ۰/۱ میلی لیتر سود ۰/۰۵ به آن اضافه شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. زمان لازم برای کاهش pH مخلوط به ۷/۷ ثبت شد و فعالیت آنزیم بر حسب واحد پکتین متیل استراز از معادله زیر محاسبه گردید:

$$PEU = \frac{[NaOH] \cdot V_{NaOH}}{V_{juice} \cdot t'}$$

در معادله فوق $[NaOH]$ نرمالیتته محلول سود، V_{NaOH} حجم محلول سود ۰/۰۵ نرمال مصرفی، V_{juice} حجم نمونه آب پرتقال و t' زمان لازم برای بازگشت pH به نقطه ۷/۷ می‌باشد.

۲-۴- آنزیم بری آب پرتقال با حرارت

۵ میلی لیتر آب پرتقال صاف شده به یک لوله‌ی آزمایش شیشه‌ای به قطر داخلی ۱ سانتی متر و عمق ۱۰ سانتی متر منتقل گردید و سپس در حمام آب در دمای ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از عملیات حرارتی، با قرار دادن لوله در آب سرد دمای نمونه به سرعت تا دمای محیط کاهش داده شد و فعالیت باقیمانده‌ی آنزیم پکتین متیل استراز مطابق روش موصوف در بخش ۲-۳ اندازه گیری گردید.

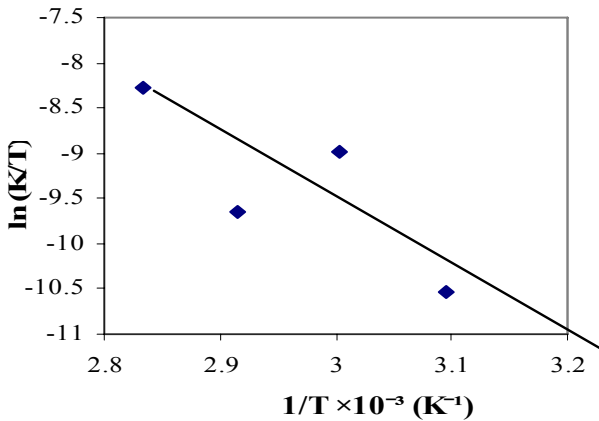
۲-۵- تحلیل آماری

در این مطالعه تغییرات فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز در پاسخ به دما در چهار سطح ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، شدت امواج فراصوت در سه سطح ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد توان اسمی دستگاه و زمان فرآیند در پنج سطح ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه در قالب طرح آزمایشی فاکتوریل کاملاً تصادفی بررسی گردید. کلیه‌ی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شدند و تحلیل واریانس با نسخه ۸/۲ نرم افزار SAS (مؤسسه SAS، کشور آمریکا) صورت گرفت. میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح معنی‌دار $p < 0.05$ مقایسه

پارامترهای انرژی آزاد گیبس، آنتالپی و آنتروپی به صورت زیر نمایش داده می‌شود:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)$$

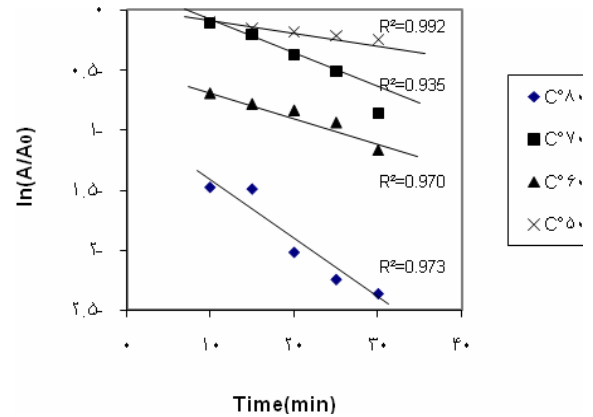
در این معادله، k_B ثابت بولتزمن، h ثابت پلانک، T دمای مطلق، R ثابت عمومی گازها، ΔG^\ddagger تغییرات انرژی آزاد گیبس، ΔH^\ddagger تغییرات آنتالپی و ΔS^\ddagger تغییرات آنتروپی می‌باشد. برای تعیین مقدار ΔH^\ddagger و ΔS^\ddagger می‌توان طبق شکل ۳ تغییرات نسبت $\frac{k}{T}$ را در مقیاس لگاریتمی در مقابل معکوس دمای مطلق رسم نمود. در این صورت ΔH^\ddagger و ΔS^\ddagger به ترتیب از روی شیب خط و عرض از مبدأ آن بدست خواهند آمد. چنان که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود ΔH^\ddagger غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز در حدود 60 kJ/mol می‌باشد که بسیار کمتر از انرژی لازم برای باز شدن ساختمان سه بعدی پروتئین‌های محلول می‌باشد [۲۱]؛ اما با توجه به منفی بودن ΔS^\ddagger فرضیه‌ی انجام واکنش‌های شیمیایی تراکمی از جمله ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی بین اسیدهای آمینه سیستمین و یا دامیداسیون اسیدهای آمینه تقویت می‌شود.



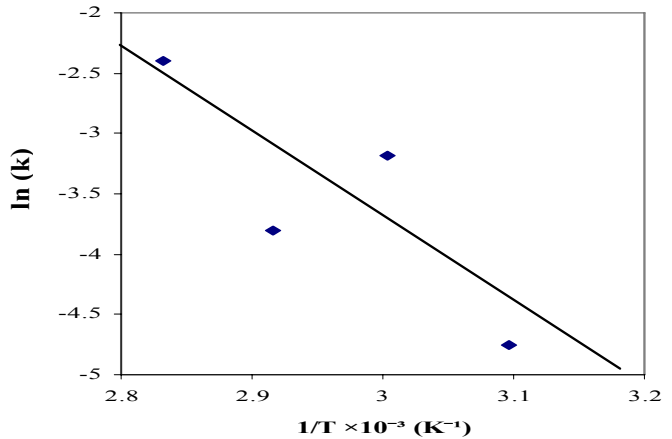
شکل ۳ رابطه‌ی بین مقدار $\ln(k_{\text{heat}}/T)$ نسبت به معکوس دمای مطلق برای غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز

با این وجود، شناسایی دقیق مکانیسم غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. لازم به ذکر است که برای کلیه‌ی دماها، مقدار ΔG^\ddagger تقریباً یکسان

متیل استراز و در نتیجه شاخص‌های ترمودینامیکی کلی این آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۸].

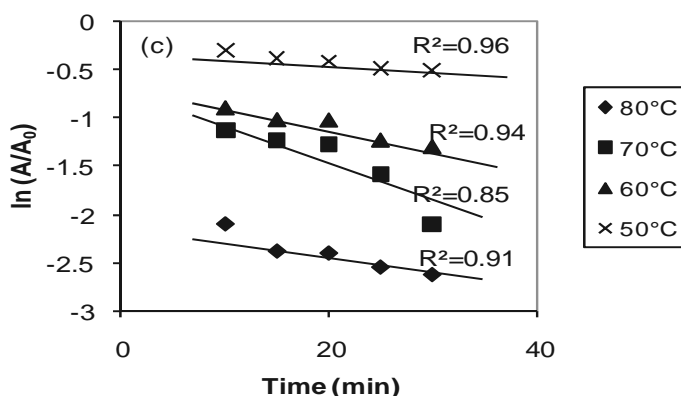
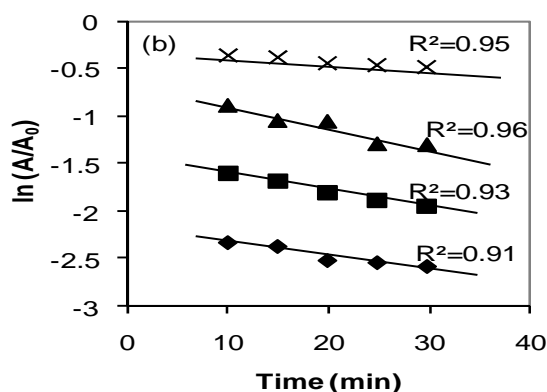
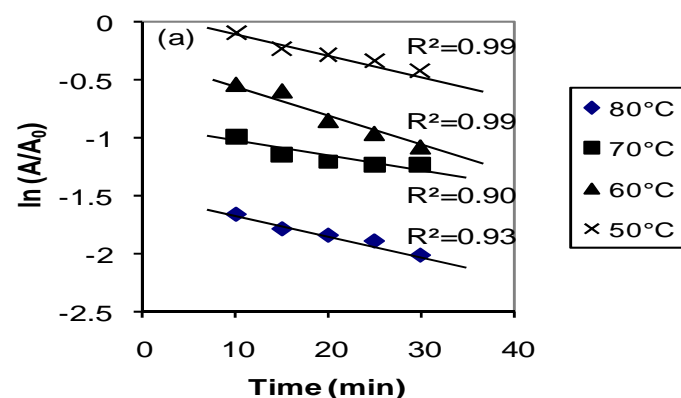


شکل ۱ تأثیر ترکیب‌های مختلف دمایی-زمانی بر روی فعالیت باقیمانده آنزیم پکتین متیل استراز



شکل ۲ تغییرات ثابت سرعت غیر فعال شدن حرارتی (k_{heat}) آنزیم پکتین متیل استراز نسبت به معکوس دمای مطلق در مقیاس نیمه‌لگاریتمی

مهم‌ترین تغییراتی که در اثر حرارت در ساختمان آنزیم اتفاق می‌افتد، شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی و باز شدن ساختار سه‌بعدی آن می‌باشد که در نتیجه، آنزیم فعالیت کاتالیتیک خود را از دست می‌دهد. در کنار شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی ممکن است دامیداسیون حرارتی اسیدهای آمینه نظیر اسپاراژین و گلاسیسین نیز انجام شود که طبیعتاً موجب از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود [۱۹]. برای بررسی دقیق‌تر مکانیسم غیرفعال شدن حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز می‌توان از تئوری حالت گذار که توسط آیرینگ پیشنهاد شده، استفاده نمود [۲۰]. براساس این تئوری، رابطه‌ی ثابت سرعت واکنش (k) با



شکل ۴ تغییرات فعالیت باقیمانده (A/A_0) آنزیم پکتین متیل استراز

نسبت به زمان در شدت های مختلف امواج فراصوت در روش

ترموسونیکاسیون: (a) شدت فراصوت ۶۰٪، (b) شدت فراصوت ۸۰٪

و (c) شدت فراصوت ۱۰۰٪.

بود. از آنجایی که ΔG^\ddagger معیاری برای امکان انجام واکنش به صورت خودبخود می باشد، بالا بودن آن در این آزمایشات حاکی از ثبات قابل ملاحظه ساختمان شیمیایی و سه بعدی آنزیم و مقاومت آن نسبت به حرارت می باشد. به عبارت دیگر این پارامتر نشان می دهد که آنزیم پکتین متیل استراز در دمای محیط کاملاً پایدار بوده و فعالیت خود را برای مدت طولانی به خوبی حفظ می کند.

۳-۲- تأثیر دما و امواج فراصوت بر فعالیت

آنزیم پکتین متیل استراز

همانند آزمایشات مربوط به عملیات حرارتی، فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز تحت تأثیر دما و امواج فراصوت (ترموسونیکاسیون) با ضریب تعیین بسیار بالایی ($R^2 > 0.91$) به صورت خطی نسبت به زمان کاهش یافت (شکل ۴).

این ویژگی مؤید این است که در عملیات ترموسونیکاسیون نیز واکنش های غیرفعال شدن آنزیم از سینتیک واکنش درجه ی اول پیروی می کند. ثابت سرعت غیرفعال شدن آنزیم تحت تأثیر دما و امواج فراصوت در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه ی این داده ها با نتایج حاصل از غیرفعال سازی حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز (جدول ۱) نشان می دهد که در حضور امواج فراصوت فعالیت آن با سرعت بیشتری کاهش می یابد. به عبارت دیگر، استفاده ی هم زمان از صوت موجب تشدید اثرات تخریب کنندگی دماهای بالا می شود. از بین رفتن آنزیم در حضور امواج فراصوت را می توان به انفجار حبابچه های بسیار ریزی مربوط دانست که در میدان امواج فراصوت تشکیل شده و به سرعت منبسط می شوند و پس از مدت زمان کوتاهی نیز منفجر می گردند. در اثر انفجار این حبابچه ها، شرایط ویژه ای از دما و فشار ایجاد می شود که می تواند بسیاری از واکنش های فیزیکی یا شیمیایی را تشدید و یا حتی شروع نماید. یکی از شناخته شده ترین واکنش هایی که در این شرایط اتفاق می افتد، سونولیز ملکول های آب به رادیکال های آزاد هیدروکسی است. این رادیکال ها، اکسیدان های بسیار قوی هستند و به سهولت با اکثر ترکیبات از جمله اسیدهای آمینه واکنش می دهند. در نتیجه ی انجام این واکنش ها ساختمان شیمیایی و سه بعدی پروتئین ها و آنزیم ها دچار تغییر شده و فعالیت بیولوژیکی یا کاتالیتیکی آنها از دست می رود [۲۲].

جدول ۱ ثابت سرعت غیر فعال شدن و زمان کاهش اعشاری فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز در دماهای مختلف

زمان کاهش اعشاری (min)	ثابت سرعت غیر فعال شدن (min ⁻¹)	درجه حرارت (°C)
۲۶۷/۷۹۰۷	۰/۰۰۸۶	۵۰
۱۵۵/۳۶۰۶	۰/۰۱۴۸	۶۰
۱۰۳/۲۷۳۵	۰/۰۲۲۳	۷۰
۲۸/۳۶۳۴	۰/۰۸۱۲	۸۰

جدول ۲ تغییرات آنتالپی و آنتروپی و انرژی آزاد گیبس برای غیرفعال شدن حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز

درجه حرارت (°C)	$\Delta H^\#$ (KJ.mol ⁻¹)	$\Delta S^\#$ (KJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (KJ.mol ⁻¹)
۵۰			۹۱/۵۰۱۵
۶۰	۵۸/۳۱۴۰	-۰/۱۰۲۷	۹۲/۵۲۸۵
۷۰			۹۳/۵۵۵۵
۸۰			۹۴/۵۸۲۵

جدول ۳ ثابت سرعت غیر فعال شدن، عدد Z و زمان کاهش اعشاری فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز در درجه حرارت ها و شدت های فراصوت مختلف

شدت صوت (%)	درجه حرارت (°C)	ضریب غیر فعال شدن کل (min ⁻¹)	ضریب غیر فعال شدن ناشی از امواج فراصوت (min ⁻¹)	زمان کاهش اعشاری (min)	عدد Z (°C)
۶۰	۵۰	۰/۰۱۳۷	۰/۰۰۵۱	۱۶۸/۱۰۲۲	۴۰/۹۷۸۰
	۶۰	۰/۰۳۸۸	۰/۰۲۴۰	۵۹/۳۵۵۷	
	۷۰	۰/۰۵۲۸	۰/۰۳۰۵	۴۳/۶۱۴۷	
	۸۰	۰/۰۸۳۶	۰/۰۰۲۴	۲۷/۵۴۷۸	
۸۰	۵۰	۰/۰۱۹۷	۰/۰۱۱۱	۱۱۶/۹۰۳۵	۴۰/۱۹۲۰
	۶۰	۰/۰۵۱۴	۰/۰۳۶۶	۴۴/۸۰۵۴	
	۷۰	۰/۰۸۱۳	۰/۰۵۹۰	۲۸/۳۲۷۲	
	۸۰	۰/۱۱۱۳	۰/۰۳۰۱	۲۰/۶۹۱۸	
۱۰۰	۵۰	۰/۰۱۹۸	۰/۰۱۱۲	۱۱۶/۳۱۳۱	۴۲/۱۷۹۰
	۶۰	۰/۰۵۰۶	۰/۰۳۵۸	۴۵/۵۱۳۸	
	۷۰	۰/۰۷۰۰	۰/۰۴۷۷	۳۲/۹۰۰۰	
	۸۰	۰/۱۰۹۵	۰/۰۲۸۳	۲۱/۰۳۲۰	

جدول ۴ انرژی اکتیواسیون و پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال سازی آنزیم پکتین متیل استراز به روش ترموسونیکاسیون

$\Delta G^\# (KJ.mol^{-1})$	$\Delta H^\# (KJ.mol^{-1})$	$\Delta S^\# (KJ.mol^{-1}.K^{-1})$	$Ea(KJ.mol^{-1})$	درجه حرارت (°C)	شدت صوت (%)
۹۰/۴۱۹۳				۵۰	
۹۱/۶۱۵۳	۵۱/۷۷۰۶	-۰/۱۱۹۶	۵۴/۵۷۶۵	۶۰	۶۰
۹۲/۸۱۱۳				۷۰	
۹۴/۰۰۷۳				۸۰	
۸۹/۴۶۴۹				۵۰	
۹۰/۶۵۱۹	۵۱/۱۰۷۰	-۰/۱۱۸۷	۵۳/۹۱۲۹	۶۰	۸۰
۹۱/۸۳۸۹				۷۰	
۹۳/۰۲۵۹				۸۰	
۸۹/۴۹۷۸				۵۰	
۹۰/۷۴۶۸	۴۹/۱۳۶۴	-۰/۱۲۴۹	۵۱/۹۴۲۴	۶۰	۱۰۰
۹۱/۹۹۵۸				۷۰	
۹۳/۲۴۴۸				۸۰	

آزمایشات در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد مشاهده شد، کاملاً بدیهی و شناخته شده می باشد. تأثیر منفی افزایش دما را می توان به کاهش شدت انفجار حبابچه ها ارتباط داد. در دمای بالا حلالیت گازها در مایعات کاهش می یابد و در نتیجه، به هنگام تشکیل حبابچه ها در میدان امواج فراصوت به جای گاز، فضای داخلی حباب را بخارات آب پر می کند. این بخارات بخش اعظم انرژی ناشی از انفجار حباب را جذب کرده و موجب کاهش شدت انفجار و در نتیجه تقلیل میزان سونولیز آب می شوند. تحت این شرایط، سرعت کلیه واکنش های شیمیایی و فیزیکی وابسته به انفجار حبابها از جمله غیرفعال شدن آنزیمها کاهش می یابد [۲۲ و ۲۳].

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز در شدت های مختلف امواج فراصوت نشان داد که شدت فراصوت ۸۰٪ بیشترین تأثیر را در مقایسه با شدت های ۶۰ و ۱۰۰ درصد بر روی آنزیم داشت. کمتر شدن سرعت غیرفعال شدن آنزیم در شدت فراصوت ۱۰۰٪ را می توان به پراکنش زیاد امواج فراصوت توسط توده ی متراکم حبابها نسبت داد. معمولاً با

با توجه به ماهیت لگاریتمی واکنش های غیرفعال شدن آنزیم در شرایط ترموسونیکاسیون، ثابت سرعت کل کاهش فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز (k_{total}) را می توان جمع جبری تأثیر دما (k_{heat}) و تأثیر امواج فراصوت (k_{us}) دانست:

$$k_{total} = k_{heat} + k_{us}$$

از این رو با استفاده از عبارت فوق می توان سهم امواج فراصوت را در غیرفعال شدن آنزیم پکتین متیل استراز و در غیاب حرارت محاسبه نمود. نتایج این محاسبات در جدول ۳ آورده شده اند. چنان که ملاحظه می شود افزایش دما ابتدا موجب افزایش و سپس کاهش سهم امواج فراصوت در غیرفعال شدن آنزیم می گردد. افزایش سهم امواج فراصوت در غیرفعال شدن آنزیم با زیاد شدن دما دور از انتظار و کاملاً نا متعارف می باشد. تصور می شود این رویداد به علت کاهش آستانه کاویتاسیون در دماهای بالا و تشدید شدت ارتعاشات دیواره حباب باشد که از طریق ایجاد تنش برشی و گرداب های موضعی موجب دنا توره شدن آنزیم می شود. از سوی دیگر کاهش اثرات فیزیکوشیمیایی فراصوت که در این

حضور امواج فراصوت می‌باشد. تغییرات سایر پارامترهای ترمودینامیکی (آنتالپی و آنتروپی) را می‌توان به تفاوت مکانیسم غیرفعال شدن آنزیم در روش ترموسونیکاسیون در مقایسه با روش حرارتی نسبت داد. نگاهی به ترکیب اسیدهای آمینه جایگاه اتصال ملکول پکتین به آنزیم پکتین متیل استراز نشان می‌دهد که قسمت مرکزی آن از چندین اسید آمینه آروماتیک شامل فنیل آلانین ۸۴، تیروزین ۱۳۹، فنیل آلانین ۱۶۰، تیروزین ۲۲۲، تریپتوفان ۲۲۷، فنیل آلانین ۲۵۰ و تریپتوفان ۲۵۲ تشکیل شده است [۲۷]. این اسیدهای آمینه تمایل بسیار زیادی برای واکنش با رادیکال آزاد هیدروکسی که در اثر انفجار حباب‌ها ایجاد می‌شوند دارند. در بین اسیدهای آمینه اسید آمینه تیروزین با سرعت قابل ملاحظه ای ($1.0 \times 10^{-1} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) با رادیکال هیدروکسی واکنش می‌دهد [۲۸]. نتیجه‌ی این واکنش، جدا شدن اتم هیدروژن از کربن α اسید آمینه تیروزین و تبدیل آن به رادیکال تیروزیل می‌باشد. این رادیکال می‌تواند با یک رادیکال تیروزیل و یا یک اسید آمینه تیروزین دیگر واکنش دهد. نتایج تحقیقاتی که در این رابطه انجام شده حاکی از این است که بی‌تیروزین، فراوان‌ترین محصول این گونه واکنش‌هاست که می‌تواند در داخل خود آنزیم و یا بین زنجیره‌های پروتئینی دو آنزیم ایجاد شود [۲۹ و ۳۰]. به این ترتیب تشکیل بی‌تیروزین موجب تغییر برگشت‌ناپذیر ساختمان نوع سوم آنزیم، جایگاه اتصال سوبسترا و یا فعال آن می‌شود که نتیجه‌ی همگی آنها از دست رفتن فعالیت آنزیم می‌باشد. از آنجایی که ماهیت این گونه واکنش‌ها از نوع تراکمی است، از آنتروپی سیستم کاسته می‌شود. این کاهش به وضوح در داده‌های مربوط به تغییرات آنتروپی غیرفعال شدن آنزیم پکتین متیل استراز به روش ترموسونیکاسیون قابل مشاهده می‌باشد (جدول ۴).

۴- نتیجه‌گیری

در این آزمایشات مشخص شد که استفاده از امواج فراصوت موجب هم‌افزایی اثر تخریب‌کنندگی حرارت بر روی آنزیم پکتین متیل استراز می‌شود. میزان از بین رفتن آنزیم در حضور امواج فراصوت به عوامل متفاوتی از قبیل شدت امواج فراصوت، زمان و دمای اعمال فراصوت بستگی دارد. همچنین نشان داده شد که افزایش دما اثر دوگانه‌ای بر روی غیر فعال

افزایش انرژی امواج فراصوت، تعداد بسیار زیادی حباب به صورت یک ابر متراکم در زیر سونوترود تشکیل می‌شوند. تراکم بیش از حد این حباب‌ها باعث می‌شود که بخش اعظم امواج فراصوت توسط حباب‌های سطحی به اطراف پراکنده شوند و انرژی اندکی به حباب‌های واقع در بخش‌های داخلی برسد. در این شرایط، این حباب‌ها با یکدیگر امتزاج پیدا کرده و به حباب‌های بزرگی تبدیل می‌شوند که در اثر نیروی رانشی به سطح مایع می‌آیند و از محیط خارج می‌شوند و یا این که در داخل توده باقی مانده ولی به تدریج تحلیل شده و از بین می‌روند. در نتیجه از تعداد حباب‌های فعال، شدت انفجار آنها و نیز سرعت واکنش‌های فیزیکوشیمیایی کاسته می‌شود [۲۴]. لازم به توضیح است که روند یکسانی برای تغییرات سرعت واکنش‌های شیمیایی در پاسخ به شدت امواج فراصوت گزارش نشده است [۲۴، ۲۵ و ۲۶]. بنا براین در خصوص تأثیر شدت امواج فراصوت می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که برای شدت فراصوت یک مقدار بهینه وجود دارد که مقدار آن بستگی به مکانیسم واکنش مورد بررسی و شرایط آزمایش دارد. محاسبات مربوط به مقاومت حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز در شرایط ترموسونیکاسیون نشان داد که عدد Z این آنزیم در حضور امواج فراصوت افزایش یافت (جدول ۳) که مشابه یافته‌های سایر محققین می‌باشد [۱۵]. افزایش مقدار عدد Z در حضور امواج فراصوت موضوع جالبی است که بررسی دقیق علت آن به تحقیقات بیشتری نیاز دارد. شایان ذکر است که عدد Z کمترین مقدار را در شدت فراصوت ۸۰٪ داشت. این روند تغییرات در عدد Z به احتمال زیاد به علت اثر پوشاندگی حباب‌های سطحی بر روی حباب‌های واقع در مرکز است که قبلاً در مورد تأثیر شدت امواج فراصوت توضیح داده شد.

پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن آنزیم پکتین متیل استراز در شرایط ترموسونیکاسیون که از روی منحنی‌های آرنیوس و آیرینگ (منحنی‌ها نشان داده نشده‌اند) محاسبه گردیده‌اند، در جدول ۴ آورده شده‌اند. همان گونه که ملاحظه می‌شود استفاده از امواج فراصوت موجب کاهش انرژی اکتیواسیون لازم برای غیرفعال شدن حرارتی آنزیم گردید. چنان که قبلاً نشان داده شد، سرعت غیرفعال شدن آنزیم در روش ترموسونیکاسیون به مراتب بیشتر از روش حرارتی بود. این افزایش سرعت به علت کاهش انرژی اکتیواسیون واکنش در

- concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 620-625.
- [10] Lopez, P., Sala, F.J., de la Fuente, J., Condon, S., Raso, J. Burgos, J. 1994. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase, and polyphenol oxidase by manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 252-256.
- [11] Vercet, A., Burgos, J., Crelier, S., Lopez-Buesa, P. 2001. Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2, 139-150.
- [12] Ku, J.Y., Park, S.O., Noh, B. S. 2000. Inactivation of peroxidase by hurdle technology. *Food Science and Biotechnology*. 9, 124-129.
- [13] Potapovich, M.V., Adzerikho, I.E., Eremin, A.N., Metelista, D.I. 2003. Kinetics of inactivation of catalase in solutions under high-and low-frequency ultrasound. *Russian Journal of Physical Chemistry*. 77, 299-306.
- [14] Lopez, P., Vercet, A., Sanchez, A.C., Burgos, J. 1998. Inactivation of tomato pectic enzymes by manothermosonication. *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und-forschung A-Food research and technology*. 207, 249-252.
- [15] Vercet, A., Lopez, P. Burgos, J. 1999. Inactivation of heat-resistant pectin methylesterase from orange by manothermosonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 432-437.
- [16] Vercet, A., Sánchez, C., Burgos, J., Montanes, L., Lopez Buesa, P. 2002. The effects of manothermosonication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of Food Engineering*. 53, 273-278.
- [17] Kimball, D.A. 1999. *Citrus Processing. A complete Guide*, 2nd Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [18] Snir, R., Koehler, P.E., Sims, K.A., Wicker, L. 1996. Total and thermostable pectinesterases in citrus juices. *Journal of Food Science*. 61, 379-382.
- [19] Tanaka, A., Hoshino, E. 2003. Similarities between the thermal inactivation kinetics of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase in an aqueous solution of sodium dodecyl sulphate and the kinetics in the solution of anionic-
کردن آنزیم با امواج فرا صوت دارد که تصور می شود برای همه آنزیم ها یکسان نباشد.
- چنان که در این تحقیق نیز مشخص شد، برای شدت امواج فراصوت یک مقدار بهینه وجود دارد که در آن سرعت واکنش های فیزیوشیمیایی در بیشینه ی مقدار خود می باشد.
- شدت بهینه امواج فرا صوت بستگی به عوامل مختلفی از جمله توان دستگاه سونیکاتور و قطر سونوتروود دارد و برای هر سامانه مورد بررسی می بایست به صورت آزمایشی تعیین شود.

۵- منابع

- [1] Lund, D.B. 1977. Design of thermal processes for maximizing nutrient retention. *Food Technology*. 31, 71-78.
- [2] Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. 1995. Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. *New Methods of Food Preservation*. Ed. Gould, G.W. p176-204. Blakie Academic & Professional, Glasgow.
- [3] Gebicki, S., Gebicki, J.M. 1993. Formation of peroxides in amino acids exposed to oxygen free radicals. *Biochemical Journal*. 289, 743-749.
- [4] Suslick, K.S. 1989. The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*. 260, 80-86.
- [5] Kashkooli, H.A., Rooney, J., Rooby, R. 1980. Effects of ultrasound on catalase and malate dehydrogenase. *Journal of the Acoustical Society of America*. 67, 1798-1801.
- [6] Henglein, R. 1995. Chemical effects of continuous and pulsed ultrasound in aqueous solutions. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2, S115-S121.
- [7] Dahlem, O., Reisse, J., Halloin, V. 1999. The radially vibrating horn: a scaling-up possibility for sonochemical reactions. *Chemical Engineering Science*. 54, 2829-2838.
- [8] Manas, P., Munoz, B., Sanz, D., Condon, S. 2006. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 1177-1182.
- [9] Lopez, P., Burgos, J. 1995. Lipoxygenase inactivation by manothermosonication: effects of sonication physical parameters, pH, KCl, sugars, glycerol, and enzyme

- at low ultrasonic intensities. *Journal of the American Chemistry Society*. 103, 6606-6611.
- [26] Adewuyi, Y.G., Appaw, C. 2002. Sonochemical oxidation of carbon disulfide in aqueous solutions: reaction kinetics and pathways. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 41, 4957-4964.
- [27] Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jornvall, H., Markovic, O., Eklund, H. 2002. Crystal structure of plant pectinmethylesterase. *FEBS Letters*. 514, 243-249.
- [28] Bulter, J.L. Swallow, E.J. 1984. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiation Physics and Chemistry*. 24, 273-282.
- [29] Stadtman, E.R., Levine, R.L. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 25, 207-218.
- [30] Davies, K.J.A., Delsignore, M.E. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry*. 262, 9908-9913.
- phospholipid vesicles. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 38, 175-181.
- [20] Eyring, H. 1935. The activated complex and the absolute rate of chemical reactions. *Chemical Reviews*. 17, 65-77.
- [21] Stein, R.A., Staros, J.V. 1996. Thermal inactivation of the protein tyrosin kinase of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry*. 35, 2878-2884.
- [22] Kadkhodae, R., Povey, M. 2008. Ultrasonic inactivation of *Bacillus alpha-amylase*: I. effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15, 133-142.
- [23] Whillock, G.O.H., Harvey, B.F. 1997. Ultrasonically enhanced corrosion of 304L stainless steel I: the effect of temperature and hydrostatic pressure. *Ultrasonics Sonochemistry*. 4, 23-31.
- [24] Sivakumar, M., Pandit, A.B. 2001. Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: optimization with power density. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8, 233-240.
- [25] Sehgal, C.M., Wang, S.Y. 1981. Threshold intensities and kinetics of sonoreaction of thymine in aqueous solutions

Combined effect of ultrasound and heat on orange pectin methylesterase

Mehmandoost, N. ¹, Kadkhodae, R. ^{2*}, Hamed Mousavian, M. T. ³

1- Researcher Department of Chemical Engineering, Islamic Azad University of Quchan.

2- Assistant Professor, Department of Food Technology, Khorasan Razavi Research Institute for Food Science and Technology.

3- Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad.

(Received: 88/8/10 Accepted: 88/11/2)

In this study the combined effect of ultrasound and heat on inactivation of pectin methylesterase (PME) in fresh orange juice was investigated. To this end fresh orange juice was sonicated at 50, 60, 70 and 80 °C for 10, 15, 20, 25, and 30 minutes at various acoustic amplitudes and constant frequency of 30 kHz and the residual activity of PME was then measured. The results showed that ultrasound had a synergistic effect on heat resulting in an increase in the inactivation of PME. However, calculation of kinetic parameters and reaction constants indicated that increasing temperature decreased cavitation intensity and hence contribution of ultrasonic waves to PME inactivation. On the other hand, the acoustic amplitude level was found to initially increase and then diminish the rate of enzyme inactivation. In this article these changes are explained by activation parameters of ΔS^\ddagger and ΔH^\ddagger and possible mechanisms for ultrasonic inactivation of PME are discussed.

Keywords: Ultrasound; Pectin methylesterase; Cavitation; Residual activity

* Corresponding author E-Mail address: rkadkhodae@yahoo.com