

پژوهشی تأثیر هم زمان امواج فراصوت و حرارت بر غیرفعال سازی آنزیم

پکتین متیل استراز آب پرتقال

ندا مهماندوست^۱، رسول کدخدایی^{۲*}، محمد تقی 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 سطح آرزی متفاوت و فرکانس ثابت ۳۰ kHz قرار داده شد و سپس فعالیت باقیمانده 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 غیرفعال شدن بیشتر آنزیم گردید. با این وجود محاسبات می‌تیکی 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 آرزی امواج بر روی غیرفعال 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 تحریبی 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 غیرفعال 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 بالقوه ای برای این منظور دارند [۲]. مکانیسم تحریبی 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 پسندی این محصول به شمار می‌آید. این ویژگی به علت حضور ترکیبات پکتینیکی مختلف می‌باشد که با ایجاد سامانه کلئیدی و پراکنش نور موجب کدر شدن ظاهر آب پرتقال می‌شوند. با این حال این ترکیبات به تدریج توسط آنزیم‌های پکتیناز از قبیل پکتین متیل استراز و پکتین گالاكتوروناز تجزیه شده و به این ترتیب کدورت آب پرتقال از 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: rkadkhodae@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 غیرفعالسازی 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

۱-۲- مواد شیمیایی

پکتین سیب (درجه متیلاسیون ۷۵-۷۰٪ و ۱۰٪ رطوبت) از شرکت سیگما آلدریچ (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 سانتریفیوژ گردید. برای جداسازی کامل ذرات معلق باقیمانده بخش شفاف عصاره به کمک پمپ خلاء از کاغذ صافی واتمن شماره‌ی ۱ عبور داده شد.

۳-۲- اعمال فراصوت به آب پرتقال

۵ میلی لیتر آب پرتقال صاف شده به یک لوله 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 سانتی گراد 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 سونوتروف 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

۵۰۰۰ درجه کلوین و فشار ۵۰۰ بار است. در این شرایط مولکول‌های آب سونولیز شده و رادیکال‌های آزاد تولید می‌گردند که خاصیت اکسید کنندگی و واکنش دهنده‌گی بسیار زیادی با ترکیبات مختلف از جمله پروتئین‌ها و آنزیم‌ها را دارند [۳۰-۴]. علاوه بر این، ارتعاش دیواره حباب‌ها و انفجار آنها در میدان کاویپتاسیون 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 [۶، ۵، ۷]. بررسی‌های زیادی در زمینه استفاده از امواج فراصوت در غیرفعالسازی آنزیم‌ها توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف از جمله لوپیز و بورگوس، لوپیز و همکاران، ورست و همکاران، ماناس و همکاران، کو و همکاران، و پوتاپویچ و همکاران انجام گرفته است [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳]. لوپیز و همکاران در زمرة اولین گروه‌های پژوهشی هستند که غیرفعال شدن آنزیم‌های پکتینکی 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 آنزیم‌ها پکتینکی گوجه فرنگی می‌شود، هر چند حساسیت آنزیم پکتین متیل استراز به این شرایط بسیار بیشتر از پکتین گالاکتوروناز می‌باشد. در تحقیقی مشابه، ورست 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 سانتی گراد موجب افزایش اثر امواج فراصوت گردید. این گروه پژوهشی در مطالعه‌ی دیگر بر روی آنزیم‌های پکتینکی گوجه فرنگی به نتایجی مشابه لوپیز 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 ازبین رفت اما فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز فقط ۶٪ کاهش یافت [۱۶].

جستجوی نویسنده‌گان 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

۱-۳- 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 سیستیک واکنش درجه‌ی اول پیروی کرد (شکل ۱). شبیه این خطوط که میان 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. چنان‌که ملاحظه می‌شود با افزایش دما، سرعت غیرفعال شدن آنزیم زیاد می‌شود، به طوری که در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان لازم برای 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 نیمه‌لگاریتیک ترسیم شده است. مطابق رابطه‌ی آرنیوس، شبیه 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 شبیه 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 پرتفال و درجه رسیدگی آن نسبت ایزوآنزیم‌های حساس و مقاوم به حرارت پکتین

گیری سونوتروف 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 پرتفال 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 ۰/۰۵ 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 سانتی گراد گرمانخانه 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 $[NaOH]$ ترمالیته محلول سود، V_{NaOH} حجم نمونه آب پرتفال و t' زمان لازم برای بازگشت pH به نقطه ۷/۷ می‌باشد.

۲- آنزیم بری آب پرتفال با حرارت

۵ میلی لیتر آب پرتفال 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 و ۷۰ 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.

۳- تحلیل آماری

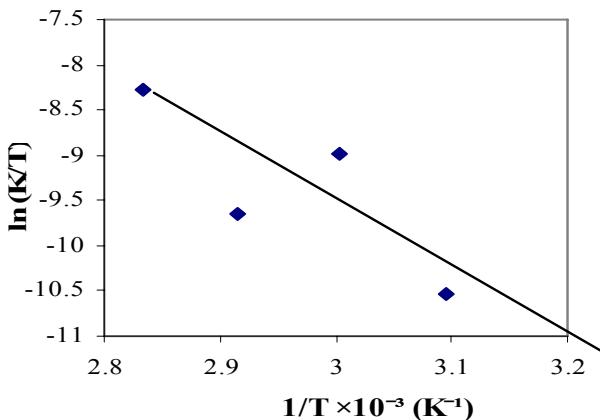
در این مطالعه تغییرات فعالیت آنزیم پکتین متیل استراز در پاسخ به دما در چهار سطح ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد، شدت امواج فراصوت در سه سطح ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد توان اسمی دستگاه و زمان فرآیند در پنج سطح ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ دقیقه در قالب طرح آزمایشی فاکتوریل کاملاً تصادفی بررسی گردید. کلیه‌ی آزمایشات با 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 دامنه‌ای دانکن در سطح معنی دار $p < 0.05$ مقایسه

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

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

در این معادله، k_B ثابت بولتزمن، h ثابت پلانک، T دمای مطلق، R ثابت عمومی گازها، $\Delta G^\#$ تغییرات انرژی آزاد گیبس، $\Delta H^\#$ تغییرات آنتالپی و $\Delta S^\#$ تغییرات آنتروپی می‌باشد. برای تعیین مقدار $\Delta H^\#$ و $\Delta S^\#$ می‌توان طبق شکل ۳

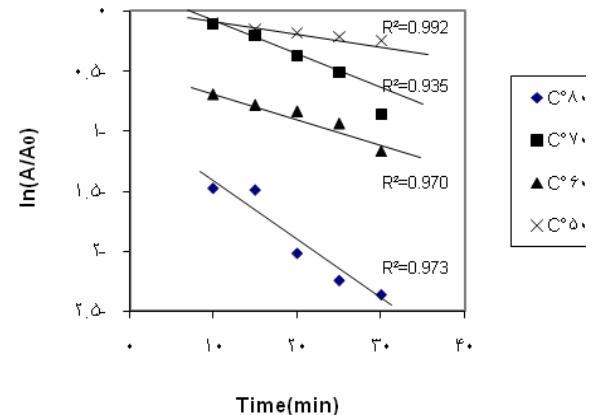
تغییرات نسبت $\frac{k}{T}$ را در مقیاس لگاریتمی در مقابل معکوس دمای مطلق رسم نمود. در این صورت $\Delta H^\#$ و $\Delta S^\#$ به ترتیب از روی شیب خط و عرض از مبدأ آن بدست خواهند آمد. چنان که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود $\Delta H^\#$ غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز در حدود 60 kJ/mol می‌باشد که بسیار کمتر از انرژی لازم برای باز شدن ساختمان سه بعدی پروتئین های محلول می باشد [۲۱]؛ اما با توجه به منفی بودن $\Delta S^\#$ فرضیه انجام واکنش های شیمیایی تراکمی از جمله ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی بین اسیدهای آمینه سیستئین و یا دامیداسیون اسیدهای آمینه تعویت می‌شود.



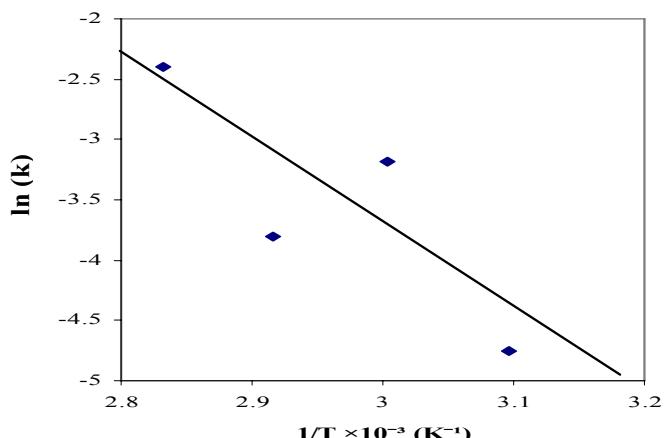
شکل ۳ رابطه‌ی بین مقدار $\ln(k_{\text{heat}}/T)$ نسبت به معکوس دمای مطلق برای غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم پکتین متیل استراز

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 $\Delta G^\#$ تقریباً یکسان

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

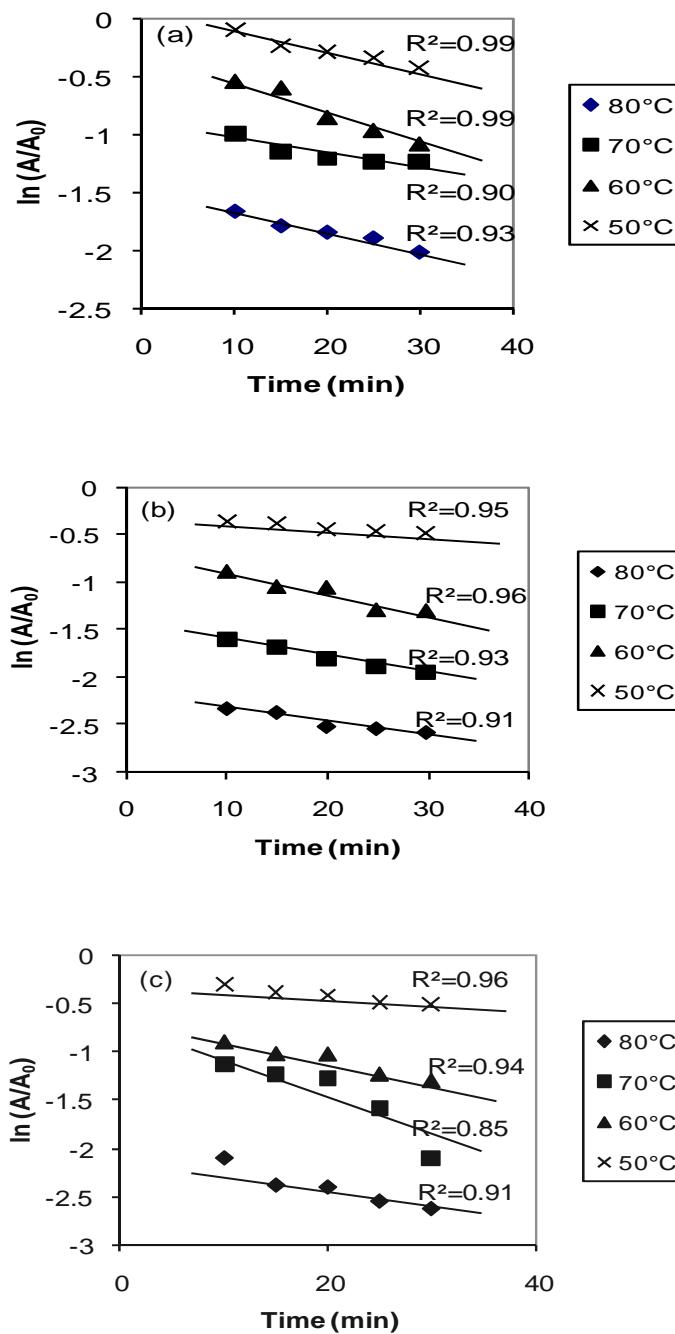


شکل ۱ تأثیر ترکیب‌های مختلف دمایی-زمانی بر روی فعالیت باقیمانده (A/A_0) آنزیم پکتین متیل استراز



شکل ۲ تغییرات ثابت سرعت غیرفعال‌شدن 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 آسپاراژین و گلایسین نیز انجام شود که طبیعتاً موجب از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود [۱۹]. برای بررسی دقیق‌تر مکانیسم غیرفعال‌شدن 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 ۱۰٪؛ (b) شدت فراصوت ۸۰٪؛ (c) شدت فراصوت ۱۰۰٪

بود. از آنجایی که $\Delta G^\#$ 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.

۲-۳- 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 سیستیک واکنش درجه هی اول پیروی می کند. ثابت سرعت غیرفعال شدن آنزیم تحت تأثیر دما و امواج فراصوت در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه ای 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 هی زمان از صوت موجب تشدید اثرات تخریب کنندگی دمای های بالا می شود. از بین رفتان 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 ای 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

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

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

عدد Z (°C)	زمان کاهش اعشاری (min)	ضریب غیر فعال شدن ناشی از امواج فراصوت (min ⁻¹)	ضریب غیر فعال شدن کل (min ⁻¹)	درجہ حرارت (°C)	شدت صوت (%)
۴۰/۹۷۸۰	۱۶۷/۱۰۲۲	۰/۰۰۵۱	۰/۰۱۳۷	۵۰	
	۵۹/۳۵۵۷	۰/۰۲۴۰	۰/۰۳۸۸	۶۰	
	۴۳/۶۱۴۷	۰/۰۳۰۵	۰/۰۵۲۸	۷۰	
	۲۷/۵۴۷۸	۰/۰۰۲۴	۰/۰۸۳۶	۸۰	
۴۰/۱۹۲۰	۱۱۶/۹۰۳۵	۰/۰۱۱۱	۰/۰۱۹۷	۵۰	
	۴۴/۸۰۵۴	۰/۰۳۶۶	۰/۰۵۱۴	۶۰	
	۲۸/۳۲۷۲	۰/۰۵۹۰	۰/۰۸۱۳	۷۰	۸۰
	۲۰/۶۹۱۸	۰/۰۳۰۱	۰/۱۱۱۳	۸۰	
۴۲/۱۷۹۰	۱۱۶/۳۱۳۱	۰/۰۱۱۲	۰/۰۱۹۸	۵۰	
	۴۵/۵۱۳۸	۰/۰۳۵۸	۰/۰۵۰۶	۶۰	
	۳۲/۹۰۰۰	۰/۰۴۷۷	۰/۰۷۰۰	۷۰	۱۰۰
	۲۱/۰۳۲۰	۰/۰۲۸۳	۰/۱۰۹۰	۸۰	

جدول ۴ انرژی اکتیواسیون و پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعالسازی آنزیم پکتین متیل استراز به روش ترموسونیکاپسیون

$\Delta G^\# (KJ.mol^{-1})$	$\Delta H^\# (KJ.mol^{-1})$	$\Delta S^\# (KJ.mol^{-1}.K^{-1})$	$Ea(KJ.mol^{-1})$	درجه حرارت (°C)	شدت صوت (%)
۹۰/۴۱۹۳				۵۰	
۹۱/۶۱۵۳				۶۰	
۹۲/۸۱۱۳	۵۱/۷۷۰۶	-۰/۱۱۹۶	۵۴/۵۷۶۵		۶۰
۹۴/۰۰۷۳				۷۰	
۸۹/۴۶۴۹				۸۰	
۹۰/۶۵۱۹	۵۱/۱۰۷۰	-۰/۱۱۸۷	۵۳/۹۱۲۹		۸۰
۹۱/۸۳۸۹				۷۰	
۹۳/۰۲۵۹				۸۰	
۸۹/۴۹۷۸				۵۰	
۹۰/۷۴۶۸	۴۹/۱۳۶۴	-۰/۱۲۴۹	۵۱/۹۴۲۴		۶۰
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 بخشن 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 و اکتش های شیمیایی و فیزیکی واپسیت به انفجار حباب ها از جمله غیرفعال شدن آنزیم ها 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 های متراکم حباب ها نسبت داد. معمولاً با

با توجه به ماهیت لگاریتمی واکنش های غیرفعال شدن آنزیم در شرایط ترموسونیکاپسیون، 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 تش بشی و گرداب های موضعی موجب دناتوره شدن آنزیم می شود. از سوی دیگر کاهش اثرات فیزیکو شیمیایی فراصوت که در این

حضور امواج فراصوت می‌باشد. تغییرات سایر پارامترهای ترمودینامیکی (آنالپی 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 آمینه‌ی آروماتیک شامل فنیل آلانین^{۱۶۰}، تیروزین^{۱۳۹}، فنیل آلانین^{۱۶۰}، تیروزین^{۲۲۲}، تیرپوفان^{۲۲۷}، فنیل آلانین^{۲۵۰} و تیرپوفان^{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 آمینه‌ی تیروزین با سرعت قابل ملاحظه ای ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol.s}^{-1}$) با رادیکال هیدروکسی واکنش می‌دهد [۲۸]. نتیجه این واکنش، جدا شدن اتم هیدروژن از کربن α اسید آمینه‌ی تیروزین و تبدیل آن به رادیکال تیروزیل می‌باشد. این رادیکال می‌تواند با یک رادیکال تیروزیل و یا یک اسید آمینه‌ی 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 فعل آن می‌شود که نتیجه‌ی همگن 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 بهوضوح 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 هم‌افرایی اثر تخریب‌کننده‌گی 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 دوگانه ای بر روی غیرفعال

افزایش انرژی امواج فراصوت، تعداد بسیار زیادی حباب به صورت یک ابر متراکم در زیر سونوتروف 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 برسرد. 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 می‌رونند. در نتیجه از تعداد حباب‌های فعل، 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 نتیجه گیری 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 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 80% داشت. این روند تغییرات در عدد Z به احتمال زیاد به علت اثر پوشانندگی 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 آریوس و آیرینگ (منحنی‌ها نشان داده نشده‌اند) محاسبه گردیده اند، 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 مرتب 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 fur 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 pectinestrases 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 فیزیکوشیمیایی در بیشینه ای مقدار خود می باشند. شدت بهینه امواج فرا صوت بستگی به عوامل مختلفی از جمله توان دستگاه سونیکاتور و قطر سونوتروف دارد و برای هر سامانه مورد بررسی می باشد 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., Roony, J., Rooxby, 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 pectinmethyl esterase. *FEBS Letters.* 514, 243-249.
- [28] Butler, 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] Kadkhodaee, 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, Kadkhodaei, 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 $\Delta S^\#$ and $\Delta H^\#$ and possible mechanisms for ultrasonic inactivation of PME are discussed.

Keywords: Ultrasound; Pectin methylesterase; Cavitation; Residual activity

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