استعمال أنزيم Naringinase و Pectinase المقيد في تحسين خواص العصير الطبيعي

محمد عبد الرزاق الصوفي*

* استاذ مساعد – مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد - alsoufim@mracpc.uobaghdad.edu.iq

المستخلص

اجري البحث في مختبرات مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد، وهدف البحث الى استعمال تقنية الربط الانزيمي المزدوج لازالة المرارة والعكارة من عصير البرتقال الطبيعي بخطوة واحدة ودراسة الظروف المثلى لعملها، واظهرت النتائج ان استعمال هلام الجينات الصوديوم ادى الى ربط 84 و87% من الكمية الاصلية للنارنجيز والبكتنيز على التوالي، وبلغ الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية النارنجيز والبكتنيز المقيد 4، واظهر كل منهما ثباتا عند اس هيدروجيني بين 3 الى 6 لمدة 30 دقيقة، وبلغت درجة الحرارة المثلى لفعالية النارنجيز والبكتنيز المقيد 50م، ولوحظ انهما كانا ثابتين بدرجة حرارة 45 و50م على التوالي لمدة 30 دقيقة، وبينت نتائج خزن النارنجيز والبكتنيز المقيد بدرجة حرارة 4م انهما حافظا على فعاليتهما لمدة 24 و27 يوما على التوالي، وبين تحديد الوقت الأمثل لعمل النارنجيز والبكتنيز المقيد انهما اظهرا اعلى فعالية عند مدة حضن 75 و60 دقيقة على التوالي، وبلغت كمية السكريات المختزلة المحررة من العصير بفعل الانزيمات المقيدة 0.82 ملغم/ مللتر عند مدة حضن 60 دقيقة، وانخفضت لزوجة العصير الطبيعي بفعل الانزيمات المقيدة من 2.3 لتكون 1.14 سنتيبواز (cp) عند مدة حضن 60 دقيقة، وحافظ النارنجيز المقيد على كامل فعاليته بعد مرور 6 دورات، بينما حافظ البكتنيز المقيد على كامل فعاليته بعد مرور 7 دورات.

الكلمات المفتاحية: الانزيمات المقيدة، النارنجيز، البكتنيز، هلام الجينات الصوديوم، العصير الطبيعي.

المقدمة

يشهد السوق العالمي نموا متزايدا في صناعة عصائر الفواكه الطبيعية، وهذا ما دفع المنتجين لزيادة نشاطهم لتوفير المنتوج الذي يطلبه المستهلك من حيث الجودة والنوعية من خلال استعمال التقانات الحديثة في الانتاج ومنها استعمال الانزيمات للتغلب على المشكلات التصنيعية التي تسببها المواد الموجودة طبيعيا في الفواكه مثل المركبات المسببة للمرارة والعكارة (Deboni واخرون، 2014).

تنتج المرارة من الفلافونيدات الموجودة طبيعيا في عصائر الحمضيات، ويعد النارنجين (-4´,5,7 (trihydroxyflavanone-7-β-L-rhamnoglucoside-(1,2)-α-D-glucopyranoside اهم هذه المركبات المسببة للمرارة، وعليه فقد استعمل النارنجيز (EC 3.2.1.40) في ازالة هذه المركبات والذي يعبر عنه بفعالية انزيمي α-L-rhamnosidase و β-D-glucosidase، اذ يعمل الاول على تحليل النارنجين الى كل من rhamnose و prunin (trihydroxyflavanone-7-glucoside) الذي تكون نسبة مرارته 1 الى 3 من النارنجين، في حين يقوم الثاني بالقضاء على وجود المرارة بشكل تام من خلال قيامه بتحليل prunin الى glucose و naringenin (4´,5,7-trihydroxyflavanone) الفاقد للطعم المر (Ferreira واخرون، 2008).

يستعمل البكتنيز او ما يعرف بـ polygalacturonase (EC:3.2.1.15) من النوع الداخلي endo بشكل واسع على المستوى التجاري لقدرته على تحليل البكتين من خلال فعله المؤثر في عملية الترويق وزيادة استخلاص العصير من الفواكه والخضراوات، والبكتين عبارة عن سكريات متعددة عالية الوزن الجزيئي وذات صفة حامضية تتكون من جزيئات من D-galacturonic acid مرتبطة مع بعضها البعض باصرة من نوع α(1-4) مع وجود عدد من جزيئات سكر Rhamnose في السلسلة الرئيسة وكل من سكري Arabinose و Xylose في السلسلة الجانبية، لذا فأن فعل الأنزيم يكون بازالة التضبب

تاريخ تسلم البحث 25 / 1 / 2015 .
تاريخ قبول النشر 19 / 4 / 2015 .
http://www.agriculmag.uodiyala.edu.iq/

الموجود في العصير من خلال قيامه بتحليل البكتين الذي يكون مرتبطا مع البروتينات الموجودة طبيعيا في العصير عن طريق كسر الاصرة الكلايكوسيدية لسلسة الكاربون الطويلة (Chauhan واخرون، 2013 ؛ Ramirez واخرون، 2013).

يعد تقييد الانزيمات احد الوسائل المهمة التي توفر مزايا عدة منها تعزيز استقرارها وزيادة ثباتيتها وتحسين الخصائص الحفزية وامكانية استعمالها لاكثر من مرة، وقد استعملت طرائق عدة في تقييد كل من النارنجنيز والبكتنيز (Nisha واخرون، 2012 ؛ Ramankannan واخرون، 2013)، لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى استعمال تقنية الربط الانزيمي المزدوج لازالة المرارة والعكارة من عصير البرتقال الطبيعي بخطوة واحدة.

المواد وطرائق البحث

مكان اجراء البحث:

اجريت جميع التجارب المتعلقة بهذا البحث في مختبرات مركز بحوث السوق وحماية المستهلك في عام 2014، وشملت خطوات البحث والمعاملات التي اجريت ما يأتي.

مصدر الانزيمات:

استعمل انزيما النارنجنيز (EC: 3.2.1.40) والبكتنيز (EC:3.2.1.15) المجهزان من شركة Sigma الامريكية في هذه الدراسة لاجراء جميع التجارب المتعلقة بهذه الدراسة.

تحضير هلام الالجينات:

حضر هلام الالجينات لكل من النارنجنيز والبكتنيز وخليط النارنجنيز والبكتنيز باستعمال محلول الجينات الصوديوم ذي تركيز 2.5% ومحلول كلوريد الكاليسيوم ذي تركيز 2% لتكوين حبيبات هلام صغيرة يتروح قطرها بين 4-3 ملم وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Vu و Le (2008).

تقدير تركيز البروتين:

قدر تركيز البروتين وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Bradford (1976) باستعمال البومين المصل البقري كبروتين قياسي على طول موجي مقداره 595 نانومتر.

تحديد درجة كفاءة التقييد:

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Soares و Hotchkiss (1998) في تحديد درجة كفاءة التقييد على النسبة المئوية لارتباط الانزيم الحر بالمادة الساندة وفقا للمعادلة الاتية:

$$\text{حصيلة التقييد (\%)} = \frac{\text{كمية الانزيم المضافة} - \text{كمية الانزيم غير المرتبطة}}{\text{كمية الانزيم المضافة}} \times 100$$

تقدير فعالية النارنجنيز:

قدرت الفعالية الانزيمية وفقا للطريقة التي قام بوصفها Puri واخرون (2005) باستعمال النارنجين مادة اساس لتقدير شدة اللون الاصفر المتكون عند طول موجي مقداره 420 نانومتر، وعرفت وحدة الفعالية الانزيمية بأنها كمية الانزيم التي تحلل 1 مايكرومول من النارنجين في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير فعالية البكتنيز:

قدرت فعالية البكتنيز بقياس السكريات المختزلة galacturonic acid كنتيجة لتحلل البكتين بفعل الانزيم وفقا لما جاء من قبل Ramankannan واخرين (2013)، وتم تقدير السكريات المختزلة في رائق التفاعل باستعمال طريقة dinitrosalicylic acid (DNS) التي قام بوصفها Miller (1959) وتحديد شدة التغاير اللوني عند طول موجي مقداره 540 نانومتر، وعرفت وحدة الفعالية الانزيمية بانها كمية galacturonic acid المتحررة او المنتجة مقدرة بـ(مايكرومول/ ملغم) من الانزيم المستعمل.

تحديد الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم:

استعملت الطريقة الموصوفة لكل من Ramirez واخرين (2013) و Puri واخرين (2005) لتحديد الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات البكتنيز والنارنجنيز الحر والمقيد على التوالي باستعمال محلول خلات الصوديوم الدارئ ذي تركيز 50 ملي مولار لتحضير مديات من الاس الهيدروجيني تراوحت بين 3.0-6.0.

تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الإنزيم:

عينت درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم البكتنيز والنارنجنيز الحر والمقيد وفقا لما وصفه Ramirez واخرون (2013) و Puri واخرون (2005) على التوالي وذلك باضافة الانزيم الى محلول التفاعل ذي اس هيدروجيني مقداره 4.5 المحضن بدرجات حرارية عدة تراوحت بين 30 الى 70م، في حين حددت درجة الثبات الحراري باستعمال درجات حرارية مختلفة تراوحت بين 30 الى 80م.

خزن الانزيم:

جرت متابعة فعالية الانزيم المقيد المخزون بمحلول خلات الصوديوم الدارئ ذي تركيز 50 ملي مولار ذي اس هيدروجيني مقداره 4.5 بدرجة حرارة 4م لمدة 30 يوم وفقا لما اشار اليه Puri واخرون (2005).

تحضير العصير:

حضر عصير البرتقال وفقا للطريقة التي قام بوصفها Puri واخرون (2005) وذلك باستعمال العصر اليدوي والنبذ المركز بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق للتخلص من الراسب.

تحديد الوقت الامثل لعمل النارنجنيز المقيد لازالة المرارة:

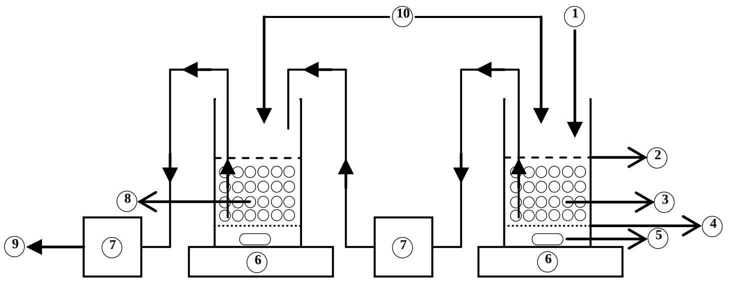
اتبعت الطريقة التي وصفها Puri واخرون (2005) وذلك بحضن 50 مللتر من رائق عصير البرتقال بدرجة حرارة 45 الى 50م لكل من الانزيم المقيد والحر على التوالي لمدة 15 الى 90 دقيقة.

تحديد الوقت الامثل لعمل البكتنيز المقيد لترويق العصير:

اتبعت الطريقة التي قام بوصفها Srivastava و Tyagi (2013)، اذ قدر ترويق العصير بعد المعاملة الانزيمية لمدة حضن تراوحت بين 15 الى 90 دقيقة مع التحريك، وتم تحديد درجة الترويق وذلك بقياس النفاذية transmittance باستعمال جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي مقداره 450 نانومتر، واستعمل الماء المقطر كمعامل سيطرة، واعتبرت نسبة النفاذية كمقياس لدرجة ترويق العصير.

تصميم المفاعل الانزيمي:

يبن الشكل، 1 تصميم المفاعل الانزيمي للنارنجنيز والبكتنيز المقيدان بوساطة الجينات الصوديوم، لاستعماله في ازالة المرارة وترويق عصير البرتقال بدرجة حرارة مقدارها 40م لمدة 60 دقيقة لكل معاملة مع التحريك المستمر لخليط التفاعل طيلة مدة العمل، مع امكانية اجراء التفاعل المستمر، اذ عندما تنتهي المدة المحددة لازالة المرارة من العصير بفعل النارنجنيز المقيد، يتم نقل العصير الى الجزء الخاص بترويق العصير بفعل البكتنيز المقيد، ثم يتم اجراء عملية غسل الجزء الخاص بالنارنجنيز المقيد واضافة كمية جديدة من العصير واخضاعها لظروف التفاعل، وحين انقضاء الوقت المحدد لترويق العصير بفعل البكتنيز يتم اجراء عملية الغسل تمهيدا لنقل العصير المعامل بالنارنجنيز ليتم ترويقه بفعل البكتنيز، وبهذا تكون عملية ازالة المرارة والترويق بشكل مستمر دون الحاجة الى ايقاف التفاعل للبدء بتفاعل اخر، وبعد الانتهاء من اجراء التفاعل يتم اجراء الغسل النهائي واضافة محلول الحفظ لحين الاستعمال الاخر.



الشكل 1: تصميم المفاعل الانزيمي للنارنجنيز والبكتنيز المقيدان بوساطة الجينات الصوديوم، اذ يشير: 1: اضافة الانموذج (العصير الخام) او المحلول الدارئ (محلول الحفظ). 2: مستوى ارتفاع السائل. 3: حبيبات الهلام المقيد بها النارنجنيز. 4: مشبك بلاستيكي لمنع تاثر الهلام اثناء التحريك. 5: قضيب مغناطيسي لتحريك المحلول. 6: محرك مغناطيسي ذي سطح ساخن. 7: مضخة نبذية. 8: حبيبات الهلام المقيد بها البكتنيز. 9: خروج ناتج التفاعل النهائي. 10: اضافة المحلول الدارئ (محلول الغسل او الحفظ).

تحديد كفاءة المفاعل الانزيمي:

قياس السكريات المختزلة:

قدرت السكريات المختزلة في رائق التفاعل باستعمال طريقة dinitrosalicylic acid (DNS) التي وصفها Miller (1959) وتحديد شدة التغاير اللوني عند طول موجي مقداره 540 نانومتر.

اللزوجة: اتبعت الطريقة التي وصفها Srivastava و Tyagi (2013) باستعمال انبوبة Ostwald الشعرية لقياس اللزوجة.

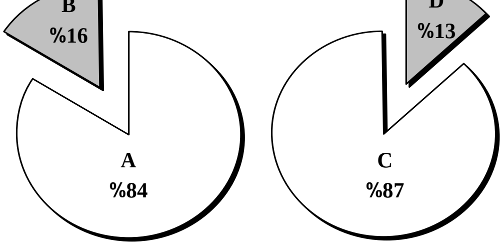
تأثير عدد مرات استعمال الانزيم المقيد في الفعالية:

اتبعت الطريقة التي وصفها Ramankannan واخرون (2013) في حساب الدورة الانزيمة لعدد مرات الاستعمال حيث تعرف بانها اجراء قياس نشاط الانزيم المقيد مع محلول المادة الاساسية والحضن في الظروف المثلى للثبات لمدة 24 ساعة (التي تعرف بالدورة) والاستمرار بذلك لحين وصول الانزيم الى نصف فعاليته القصوى.

النتائج والمناقشة

تحديد درجة كفاءة التقييد:

ادى استعمال هلام الجينات الصوديوم الى ربط 84 و 87% من الكمية الاصلية لانزيمي النارنجنيز والبكتنيز على التوالي (الشكل، 2).



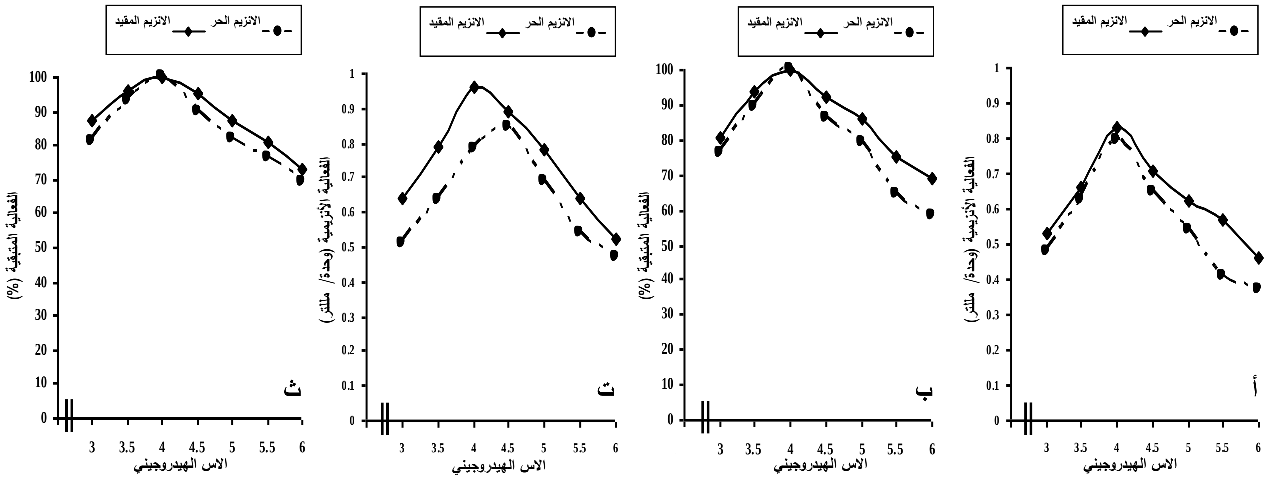
الشكل 2: كفاءة هلام الجينات الصوديوم في تقييد انزيم النارنجنيز والبكتنيز، اذ يمثل:

A: نسبة النارنجنيز المرتبط من الكمية الكلية للانزيم. B: نسبة النارنجنيز غير المرتبط من الكمية الكلية للانزيم. C: نسبة البكتنيز المرتبط من الكمية الكلية للانزيم. D: نسبة البكتنيز غير المرتبط من الكمية الكلية للانزيم.

يمثل تحديد درجة كفاءة التقييد احد الخطوات الهامة التي تعتمد عليها نجاح هذه العملية، اذ يعود هدف اختيار المادة الساندة الى قدرتها في تقييد اكبر كمية ممكنة من الانزيم الحر دون ان يكون لها تأثير سلبي في ثباتية واستقرار الانزيم فضلا عن فعاليته الحفزية التي تمثل المحور الاساس لعمله (Nisha واخرون، 2012)، ويلاحظ ان درجة التقييد المستحصل عليها كانت مشجعة بشكل كبير لاعتمادها في هذه الدراسة، اذ اشار Saad واخرون (2012) الى انه قيد انزيم البكتنيز مع مواد مختلفة مثل الحبيبات الزجاجية المسامية والكايتين وعظم الدجاج والرمل والجينات الكاليسيوم، ولاحظ ان كفاءة التقييد كانت 81.86 و74.07 و78.39 و75.85 و77.09% على التوالي، ولاحظ Lakhanpal و Gupta (2014) ان درجة كفاءة التقييد لانزيم البكتنيز التجاري المقيد مع السليكا بلغت 43.68%

تحديد الاس الهيدروجيني الامثل للفعالية والثبات:

يبين الشكل، 3 تحديد الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات انزيمي النارنجنيز والبكتينيز، اذ يشير الشكل، 3 أ الى أن الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية النارنجنيز الحر والمقيد كان 4، ويتضح من الشكل، 3 ب ان الأنزيم الحر كان ثابتا عند اس هيدروجيني يتراوح بين 3 الى 6 لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 25م، اذ بلغت الفعالية المتبقية 76 و58% على التوالي، في حين اظهر الانزيم المقيد ثباتا حراريا اعلى، اذ كان ثابتا عند اس هيدروجيني يتراوح بين 3 الى 6 لمدة 30 دقيقة بفعالية متبقية بلغت 81 و69% على التوالي، ويبين الشكل، 3 ت تباين في قيمة الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية البكتنيز الحر والمقيد، اذ بلغ 4.5 و4 على التوالي، ويلاحظ من الشكل، 3 ث ان الأنزيم الحر والمقيد اظهرا ثباتا اعلى من النارنجنيز الحر والمقيد عند اس هيدروجيني يتراوح بين 3 الى 6 لمدة 30 دقيقة، اذ بلغت الفعالية المتبقية 81 و76% للانزيم الحر على التوالي، بينما كانت 87 و73% للانزيم المقيد على التوالي.



شكل 3: الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات انزيمي النارنجنيز والبكتنيز

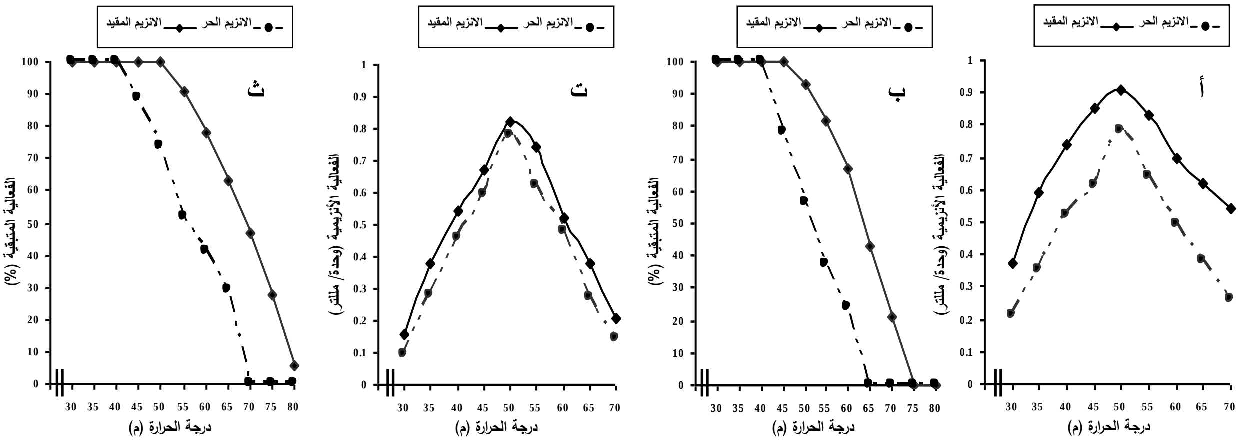
أ. الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية النارنجنيز الحر والمقيد. ب. الاس الهيدروجيني الامثل لثبات النارنجنيز الحر والمقيد. ت. الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية البكتنيز الحر والمقيد. ث. الاس الهيدروجيني الامثل لثبات البكتنيز الحر والمقيد.

بين Dalal واخرون (2007) ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية البكتنيز المقيد باستعمال تقنية ارتباطات المجاميع الانزيمية المستعرضة (CLEAs) بلغ 4.5، واكد Ribeiro و Rabaca (2011) ان الاس الهيدروجيني للنارنجنيز المقيد باستعمال ذات التقنية كان 4.0، ولاحظ Saad واخرون (2012) ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية البكتنيز المقيد مع الجينات الكاليسيوم كان 4.8، واكد Ramankannan واخرون (2013) ان الاس الهيدروجيني يؤثر بشكل كبير في عمل البكتنيز الحر والمقيد، وهذا يعود الى اسباب عدة منها ان الظروف الحامضية سوف توفر للانزيم المقيد بيئة افضل لاداء فعله تجاه البكتين من خلال زيادة الالفة بين الانزيم والمادة الاساس، كما ان التغير في الاس الهيدروجيني للبكتنيز ربما لايؤثر على شكله لكن يمكن ان يغير شكل او خصائص شحنة البكتين، لذا اما

ان لايرتبط البكتين بالموقع الفعال او لا يتم تحليله بشكل كامل، واشار Ramirez واخرون (2013) الى ان الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية البكتنيز المقيد باستعمال تقنية الادمصاص على هلام الالجينات المدعم بالكايتين كانت 4.5 بينما الحر كانت 5.0.

درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات:

يبين الشكل، 4 درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات النارنجنيز والبكتنيز، اذ يشير الشكل، 4 أ الى ان درجة الحرارة المثلى لفعالية النارنجنيز الحر والمقيد كانت 50م، ويلاحظ من الشكل، 4 ب ان الأنزيم الحر كان ثابتا بدرجة حرارة 40م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد 76 و100% من فعاليته عند درجة حرارة 60 و65م على التوالي، بينما يلاحظ ان الانزيم المقيد امتلك ثباتا حراريا اعلى، اذ كان ثابتا بدرجة حرارة 45م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد 79 و100% من فعاليته عند درجة حرارة 70 و75م على التوالي، واظهر الشكل، 4 ت ان درجة الحرارة المثلى لفعالية البكتنيز الحر والمقيد كانت 50م، ويشير الشكل، 4 ث ان الأنزيم الحر كان ثابتا بدرجة حرارة 40م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد 71 و100% من فعاليته عند درجة حرارة 65 و70م على التوالي، بينما يلاحظ ان الانزيم المقيد امتلك ثباتا حراريا اعلى، اذ كان ثابتا بدرجة حرارة 50م لمدة 30 دقيقة بعدها بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد 72 و94% من فعاليته عند درجة حرارة 75 و80م على التوالي.



شكل 4: درجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات النارنجنيز والبكتنيز

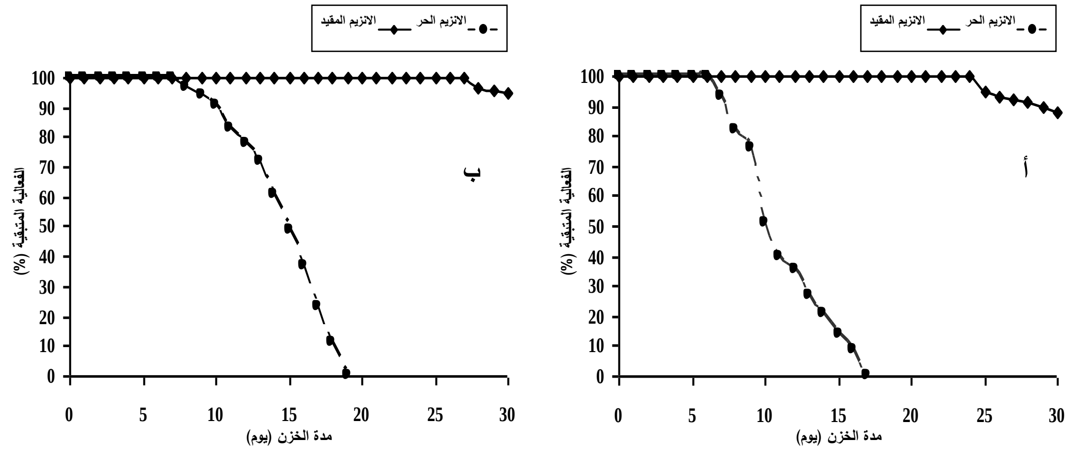
أ: محنى درجة الحرارة المثلى لفعالية النارنجنيز الحر والمقيد. ب: محنى درجة الحرارة المثلى لثبات النارنجنيز الحر والمقيد. ت: محنى درجة الحرارة المثلى لفعالية البكتنيز الحر والمقيد. ث: محنى درجة الحرارة المثلى لثبات البكتنيز الحر والمقيد.

اشار Puri واخرون (2005) الى ان الثبات الحراري للانزيمات المستعملة في صناعة العصائر يعد احد الميزات المهمةالواجب توافرها في هذه الصناعة، ولاحظ Ramankannan واخرون (2013) ان درجة الحرارة المثلى لعمل البكتنيز الحر والمقيد باستعمال الدقائق النانوية ازدادت بشكل ملاحظ لحين الوصول الى درجة الحرارة المثلى نتيجة زيادة الطاقة الحركية وبالتالي زيادة فرصة حدوث التصادمات بين الانزيم والمادة الاساس، الا ان ارتفاع درجة الحرارة يسبب نقصان فعالية الانزيم بسبب تحطم الاواصر الكيميائية وبالتالي حدوث خلل في عمل الموقع الفعال، واشار الى أن الزيادة في نسبة الفعالية المتبقية للانزيم المقيد عند درجات الحرارة العالية يعزى الى الاواصر التساهمية التي حدثت بين الانزيم والمادة الساندة التي وفرت حيزا نسبيا من الصلابة مما أسهم بشكل كبير في حماية الانزيم من التأثر بارتفاع درجات الحرارة، واكد Wu واخرون (2013) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية النارنجنيز الحر والمقيد بخيوط الفايبرين النانوية بلغت 55م وكانت فعالية الانزيم المقيد اعلى من الحر في مدى من درجات الحرارة بين 35 الى 40م و 50 الى 60م، وبين بأن الانزيم المقيد كان اقل حساسية لتغير درجات الحرارة من الحر، الا ان درجة الحرارة المثلى للفعالية كانت متساوية بين كل من الانزيم الحر والمقيد، بينما اشار Lakhanpal و Gupta (2014) الى ان درجة الحرارة المثلى لفعالية البكتنيز المقيد

بتقنية الادمصاص على هلام السليكا بوجود glutaraldehyde والمستعمل في ترويق عصير الاجاص كانت 40م.

تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية الانزيم:

يشير الشكل، 5 الى تأثير الخزن بدرجة حرارة 4م في فعالية انزيمي النارنجنيز والبكتنيز، اذ يلاحظ من الشكل، 5 أن النارنجنيز المقيد حافظ على كامل فعاليته لمدة 24 يوماً، في حين حافظ الانزيم الحر على كامل فعاليته لمدة 6 ايام، بينما يوضح الشكل، 5 ب ان البكتنيز المقيد حافظ على كامل فعاليته لمدة 27 يوماً، في حين حافظ الانزيم الحر على كامل فعاليته لمدة 7 ايام.



شكل 5: تأثير درجة حرارة الخزن في فعالية انزيمي النارنجنيز والبكتنيز

أ. تأثير الخزن بدرجة حرارة 4م لمدة 30 يوماً في فعالية النارنجنيز الحر والمقيد بوساطة الجينات الصوديوم.

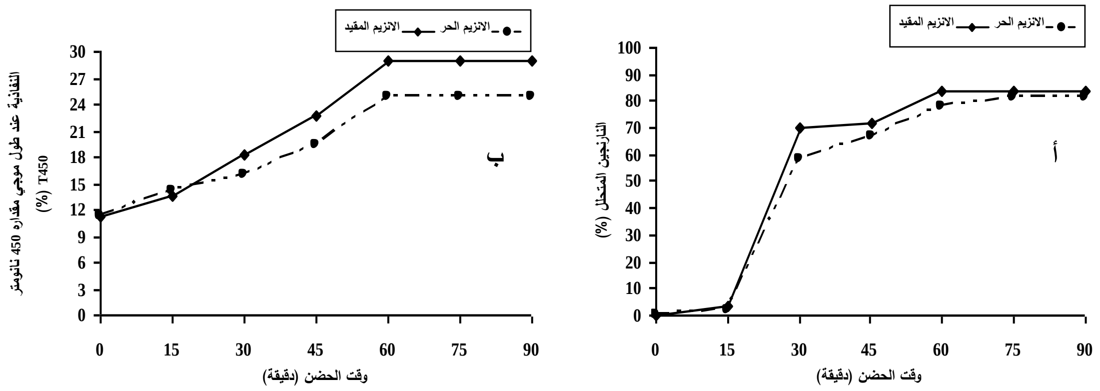
ب. تأثير الخزن بدرجة حرارة 4م لمدة 30 يوماً في فعالية البكتنيز الحر والمقيد بوساطة الجينات الصوديوم.

اشار Ramankannan واخرون (2013) الى ان انزيم البكتنيز المقيد بالدقائق النانوية حافظ على حوالي 60% من فعاليته الاصلية بالمقارنة مع الانزيم الحر الذي حافظ على حوالي 51% من فعاليته الابتدائية بعد الخزن لمدة 24 يوم بدرجة حرارة 4م، بينما لاحظ Puri واخرون (2005) ان النارنجنيز المقيد بنشارة الخشب بوجود glutaraldehyde حافظ على كامل فعاليته الابتدائية عند الخزن لمدة 30 يوم بدرجة حرارة 4م.

تحديد الوقت الامثل لعمل الانزيم:

يظهر الشكل، 6 تحديد الوقت الأمثل لعمل النارنجنيز والبكتنيز، اذ يبين الشكل، 6 أن النارنجنيز الحر أظهر أعلى فعالية لتحلل النارنجين (%) عند مدة حضن مقدارها 75 دقيقة، بينما لوحظ ان الانزيم المقيد اظهر اعلى فعالية عند وقت حضن مقداره 60 دقيقة، كما كانت كمية النارنجين المتحلل بفعل الانزيم المقيد اعلى من الانزيم الحر، اذ ارتفعت نسبتها بفعل الانزيم الحر من 0 لتكون 2 و58 و67 و78 و81 و81% عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي، بينما ارتفعت النسبة بفعل الانزيم المقيد من 0 لتكون 3 و70 و67 و78 و81 و81% عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي، ويلاحظ من الشكل، 6 ب عدم وجود تباين في مدة الحضن (دقيقة) اللازمة لتحليل البكتنين والتي بلغت 60 دقيقة بفعل البكتنيز الحر والمقيد والتي عبر عنها بقياس نسبة النفاذية عند طول موجي مقداره 450 نانومتر T_{450} (%)، الا أن نسبة النفاذية للانزيم المقيد كانت أعلى من نسبتها بفعل الانزيم الحر، اذ ارتفعت من 11.29 للعصير الخام لتكون 14.06 و15.93 و19.28 و24.76 و24.76 و24.76% عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي، في حين ارتفعت نسبة النارنجين المتحلل بفعل الانزيم المقيد من 11.29 للعصير

الخام لتكون 13.52 و18.38 و22.73 و28.86 و28.86 و28.86% عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي.



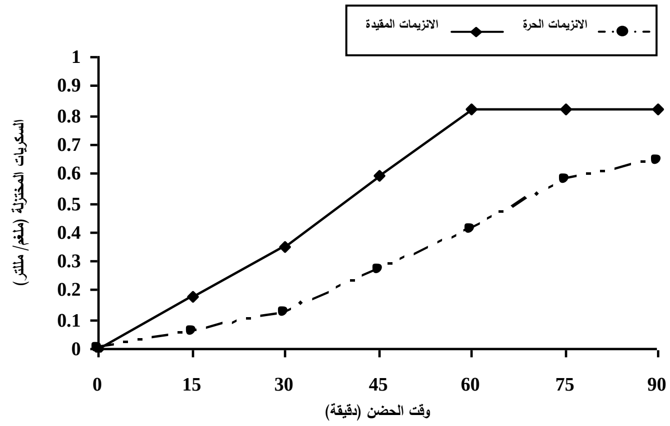
شكل 6: تحديد الوقت الامثل لعمل انزيمي النارنجنيز والبكتنيز
أ. الوقت الامثل لعمل النارنجنيز الحر والمقيد لتحليل النارنجين.
ب. الوقت الامثل لعمل البكتنيز الحر والمقيد لتحليل البكتين.

يوفر تحديد الوقت الامثل لعمل ألانزيم أحد الاسس التي تعطي تصوراً واضحاً لكفاءة الانزيم المقيد في اداء عمله بأقل وقت ممكن وباعلى فعالية، اذ يكون الوقت عاملا هاما في حسابات الكلف والجدوى الاقتصادية من عملية التقييد، فقد اشار Puri واخرون (2005) الى ان الوقت الامثل لفعالية النارنجنيز الحر والمقيد بنشارة الخشب كان 60 دقيقة وبلغت نسبة النارنجين المتحلل بفعل الانزيم الحر والمقيد 68 و 73% على التوالي، وبين Ramirez واخرون (2013) ان البكتنيز المقيد باستعمال تقنية الادمصاص على هلام الالجينات المدعم بالكايتين اعطى اقصى فعالية بعد مرور 120 دقيقة، ولاحظ Srivastava و Tyagi (2013) ان استعمال البكتنيز الحر بتراكيز مختلفة كان له اثر كبير في ارتفاع نسبة ترويق (%) عصير التفاح باعتماد النفاذية (T)، اذ ارتفعت النفاذية من 20.6 الى 24.2 و25.6 و26.8 و27.9 و29.2 و29.8 عند استعمال الانزيم بتركيز 1 و2 و3 و4 و5 و6 و7 ملغم/ 25غم من لب التفاح على التوالي، واكد Lakhanpal و Gupta (2014) ان النفاذية (T) عند طول موجي مقداره 650 نانومتر للبكتنيز التجاري المقيد مع السليكا المستعمل في ترويق عصير التمر ازدادت بشكل متوالي لتصل الى قمتها عند 90 دقيقة من الحضن.

تحديد كفاءة المفاعل الانزيمي:

تحرير السكريات المختزلة:

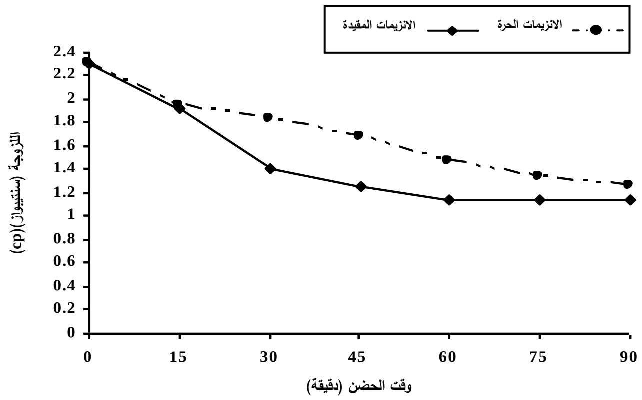
يبين الشكل، 7 كفاءة المفاعل الانزيمي للانزيمات المقيدة (النارنجنيز والبكتنيز) في تحرير السكريات المختزلة من عصير البرتقال الطبيعي بالمقارنة مع فعل نفس الانزيمات بحالتها الحرة، اذ ادى استعمال الانزيمات المقيدة الى حدوث زيادة في كمية السكريات المختزلة المحررة، فبعد ان كانت كميتها 0 ارتفعت لتكون 0.18 و0.35 و0.59 و0.82 و0.82 و0.82 ملغم/ مللتر عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي، بينما ارتفعت كمية السكريات المختزلة المحررة بفعل الانزيمات الحرة من 0 لتبلغ 0.06 و0.12 و0.27 و0.41 و0.58 و0.64 ملغم/ مللتر عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي، ويلاحظ من هذه النتائج ان كمية السكريات المختزلة المحررة بفعل الانزيمات المقيد اظهرت اعلى قراءة بمدة حضن مقدارها 60 دقيقة وبقيت بعدها ثابتة بالرغم من زيادة الوقت لغاية 90 دقيقة، في حين لم تتوقف كمية هذه السكريات عن الزيادة باستعمال الانزيمات الحرة لغاية الوصول الى مدة حضن مقدارها 90 دقيقة وكانت الكمية المستحصل عليها من هذه السكريات اقل من تلك المسجلة باستعمال الانزيمات المقيدة وبمدة حضن مقدارها 90 دقيقة.



شكل 7: قدرة الانزيمات الحرة والمقيدة في تحرير السكريات المختزلة من عصير البرتقال الطبيعي.

بين Ribeiro و Rabaca (2011) انهما استعملا مديات مختلفة من الاس الهيدروجيني كانت 4 و 6 و10 لتحديد قدرة النارنجنيز المقيد باستعمال تقنية ارتباطات المجاميع الانزيمية المستعرضة (CLEAs) في تحرير السكريات المختزلة، ولاحظا ان ارتفاع الاس الهيدروجيني يؤدي الى انخفاض كمية السكريات المختزلة المحررة بفعل الانزيم، كما اشارا الى ازدياد تحرر السكريات بزيادة تركيز الانزيم ومدة الحضن، فقد بينا ان تركيز انزيمي مقداره 4 ملغم/ مللتر ادى الى تحرير ما يقارب من 0.7 ملغم/ مللتر منها بوقت حضن مقداره 120 دقيقة، بينما كان المتحرر من السكريات المختزلة عند مدة حضن 60 دقيقة حوالي 0.65 ملغم/ مللتر، وهذا يعد من النتائج الهامة التي تنعكس بشكل واضح على الجدوى الاقتصادية من استعمال الانزيمات المقيدة، اذ يلاحظ من النتائج التي توصل اليها هذان الباحثان ان مدة حضن 60 دقيقة اسهمت في تحرير حوالي 0.65 ملغم/ مللتر من السكريات المختزلة، بينما ادى زيادة مدة الحضن 60 دقيقة اخرى الى تحرر ما يقرب من 0.7 ملغم/ مللتر من السكريات المختزلة، اي بفارق مقداره 0.05 ملغم/ مللتر، وفي هذه الحالة فأن زيادة الوقت يصبح غير مجد من الناحية الاقتصادية ويتم الاكتفاء بمدة حضن مقدارها 60 دقيقة.

اللزوجة: يلاحظ من الشكل، 8 ان استعمال المفاعل الانزيمي للنارنجنيز والبكتنيز المقيدين أسهم بشكل واضح في تقليل لزوجة عصير البرتقال الطبيعي الناتجة عن وجود البكتين والنارنجين نتيجة تحللها بشكل كبير اذ ادى استعمال الانزيمات المقيدة الى انخفاض لزوجة العصير الطبيعي من 2.3 لتكون 1.92 و1.41 و1.25 و1.14 و1.14 و1.14 سنتيبواز (cp) عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي، ويلاحظ ان انخفاض اللزوجة سجل اعلى معدل له عند مدة حضن مقدارها 60 دقيقة ولم يحدث اي تغير في قيمة اللزوجة عند زيادة مدة الحضن الى 90 دقيقة، في حين يلاحظ ان استعمال الانزيمات الحرة ادى الى انخفاض لزوجة العصير من 2.3 لتبلغ 1.95 و1.82 و1.68 و1.46 و1.34 و1.25 سنتيبواز (cp) عند مدة حضن مقدارها 0 و15 و30 و45 و60 و75 و90 دقيقة على التوالي.



شكل 8: قدرة الانزيمات الحرة والمقيدة في خفض لزوجة عصير البرتقال الطبيعي.

يعد قياس اللزوجة من الفحوصات المهمة لتحديد قدرة الانزيمات المقيد في خفض لزوجة العصير الخام ومقارنتها باللزوجة الحركية للماء والتي تبلغ تقريبا 1 سنتيبواز عند درجة حرارة 20م، فقد اشار كل من Srivastava و Tyagi (2013) الى ان استعمال البكتنيز الحر كان له اثر كبير في تقليل لزوجة عصير التفاح، وبينا ان العلاقة بين زيادة كمية الانزيم (ملغم) واللزوجة (سنتيبواز) كانت علاقة عكسية، اذ انخفضت اللزوجة من 1.28 الى 1.20 و1.13 و1.07 و1.02 و0.8 و0.7 سنتيبواز عند استعمال الانزيم بتركيز 1 و2 و3 و4 و5 و6 و7 ملغم/ 25غم من لب التفاح على التوالي.

تحديد عدد الدورات الانزيمية:

يبين الجدول، 1 أن النارنجنيز المقيد حافظ على كامل فعاليته بعد مرور 6 دورات، ثم بدأت الفعالية بالتناقص ليفقد الانزيم 12 و21 و36 و52% من فعاليته الكلية عند الدورة 7 و8 و9 و10 على التوالي، بينما حافظ انزيم البكتنيز المقيد على كامل فعاليته بعد مرور 7 دورات، ثم بدأت فعاليته الكلية بالتناقص ليفقد 16 و31 و48% عند الدورة 8 و9 و10 على التوالي.

الجدول 1: تأثير عدد مرات الاستعمال في فعالية الانزيم المقيد.

رقم الدورة الانزيمية	الفعالية المتبقية للنارنجنيز (%)	الفعالية المتبقية للبكتنيز (%)
1	100	100
2	100	100
3	100	100
4	100	100
5	100	100
6	100	100
7	88	100
8	79	84
9	64	69
10	48	52

اوضح Puri واخرون (2005) انه لم يلحظ فقدان واضح في فعالية النارنجنيز المقيد بنشارة الخشب بوجود glutaraldehyde بعد مرور 7 دورات من الاستعمال، وبين ان معاملة عصير اليوسفي بالانزيم المقيد والخزن لمدة 1 ساعة بدرجة حرارة 45م ادت الى تحليل 76% من النارنجين، ولم تحصل زيادة في هذه النسبة عند اطالة الوقت الى 3 و 5 ساعة، واكد Dalal واخرون (2007) امكانية استعمال البكتنيز المقيد بوساطة تقنية ارتباطات المجاميع الانزيمية المستعرضة (CLEAs) لثلاث دورات متتالية دون حدوث فقدان في الفعالية التي تبدأ بالانخفاض تدريجيا بعد ذلك باستمرار عملية الاستعمال، ولاحظ Ribeiro و Rabaca (2011) ان النارنجنيز المقيد باستعمال ذات التقنية احتفظ بحوالي 90% من فعاليته الاصلية عند الدورة الثالثة، واحتفظ بحوالي 30% من فعاليته بعد الدورة الرابعة، واشار Ramankannan واخرون (2013) الى ان حساب عدد مرات اعادة الاستعمال للانزيمات المقيد تعد من اهم العوامل الاقتصادية عند التفكير في تقييد الانزيمات، وبين ان البكتنيز المقيد بالدقائق النانوية وصل الى نصف فعاليته الاصلية في نهاية اليوم الثامن، وبين Ramirez واخرون (2013) ان البكتنيز المقيد باستعمال تقنية الادمصاص على هلام الالجينات المدعم بالكايتين حافظ على كامل فعاليته لمدة 4 دورات، ولاحظ Wu واخرون (2013) ان النارنجنيز المقيد بخيوط الفايبرين النانوية حافظ على 67% من فعاليته الابتدائية بعد مرور 8 دورات، واكد Lakhanpal و Gupta (2014) ان البكتنيز المقيد بتقنية الادمصاص على هلام السليكا بوجود glutaraldehyde والمستعمل في ترويق عصير الاجاص احتفظ بحوالي 50% من فعاليته الابتدائية بعد انتهاء ثلاث دورات.

المصادر

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248-254.

Chauhan, S., K. Hiteshi, and R. Gupta, 2013. Immobilization of microbial pectinases: A review. *Academia Journal of Food Research*. 1(2): 19-32.

Dalal, S., A. Sharma, and M. N. Gupta, 2007. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities. *Chemistry Central Journal*. 1:16 doi:10.1186/1752-153X-1-16.

Deboni, T. M., M. Bundchen, C. V. Junior, D. Hotza, R. Piletti, and M. G. N. Quadri, 2014. Effect of the processing steps on cactus juice production. *Food and Bioprocess Technology*. 7(4): 990-1000.

Ferreira, L., C. Afonso, H. Vila-Real, A. Alfaia, and M. H. L. Ribeiro, 2008. Evaluation of the effect of high pressure on naringin hydrolysis in grapefruit juice with naringinase immobilised in calcium alginate beads. *Food Technol. Biotechnol*. 46(2): 146-150.

Lakhanpal, N. A. and R. Gupta, 2014. Immobilization of commercial pectinase on silica and its application in plum juice clarification. *The SciTech Journal of Science and Technology*. 3(1): 38-47.

Miller, G. L. 1959. Use of diniotrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 31: 426-428.

Nisha, S., K. S. Arun, and N. Gobi, 2012. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*. 1(3): 148-155.

Puri, M., H. Kaur, and J. F. Kennedy, 2005. Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80:1160-1165.

Ramankannan, A., J. R. G. Suganthi, N. Balaji, and M. Seenuvasan, 2013. Preparation and Characterization of Pectinase bound Co-precipitated Magnetic Nanoparticles. *Asian J. Pharm. Tech*. 3(4): 175-180.

Ramirez, H. L., A. I. Briones, J. Ubeda, and M. Arevalo, 2013. Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support. *Biotecnologia Aplicada*. 30(2): 101-104.

Ribeiro, M. H. L. and M. Rabaca, 2011. Cross-Linked Enzyme Aggregates of Naringinase: Novel Biocatalysts for Naringin Hydrolysis. SAGE-Hindawi Access to Research. *Enzyme Research*. Volume 2011, Article ID 851272, 8 pages. doi:10.4061/2011/851272.

Saad, S. M. M., F. F. A. Foda, I. M. Abdel-Aleem, and M. S. Gamal El-Deen, 2012. Kinetic parameters of immobilized pectinase enzyme. *Annals of Agric. Sci*. 50(2): 173-184.

Soares, N. F. F. and J. H. Hotchkiss, 1998. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. *Journal of Food Science*. 63(1): 61-65.

Srivastava, S. and S. K. Tyagi, 2013. Effect of Enzymatic Hydrolysis on the Juice Yield from Apple Fruit (*Malus domestica*) Pulp. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*. 4(4): 299-306.

Vu, T. K. H. and V. V. M. Le, 2008. Biochemical studies on the immobilization of the enzyme invertase (EC.3.2.1.26) in alginate gel and its kinetics. *Asean Food Journal*. 15(1): 73-78.

Wu, M. H., L. Zhu, Z. Z. Zhou, and Y. Q. Zhang, 2013. Coimmobilization of naringinases on silk fibroin nanoparticles and its application in food packaging. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Nanoparticles*. Volume 2013, Article ID 901401, 5 pages. doi:org/10.1155/2013/901401.

USING OF IMMOBILIZED NARINGINASE AND PECTINASE TO IMPROVEMENT PROPERTIES OF THE NATURAL JUICE

Mohammed A. Al-Soufi*

*Assistant Professor- Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad - alsoufim@mracpc.uobaghdad.edu.iq.

ABSTRACT

This research was conducted in the laboratories of the Market Research and Consumer Protection Center, University of Baghdad, the research aimed to use immobilized enzymes to removal bitter and turbidity from natural orange juice with a single step and study the optimal conditions for their work, the results showed that used sodium alginate gel was lead to immobilized 84 and 87% of the original amount of the naringinase and pectinase respectively, the optimum pH of the immobilized naringinase and pectinase was 4, the results showed that both enzymes were stable at pH ranging from 3 to 6 for 30 minutes, the optimum temperature for immobilized naringinase and pectinase was 50ºC, it was observed they were stable at 45 and 50ºC for 30 minutes respectively, the results of the immobilized naringinase and pectinase storage at 4ºC showed that they were keep of its activity for 24 and 27days respectively, determination of the optimum time of immobilized naringinase and pectinase activity showed that they have shown the highest activity at 75 and 60 minutes of reaction respectively, using of immobilized enzymes was lead to increase in the amount of reducing sugars that released from juice to 0.82 mg/ml at 60 minutes of reaction time, using of immobilized enzymes lead to a decrease in the viscosity of the natural juice from 2.3 to be 1.14 cp when 60 minutes of reaction time, the immobilized naringinase was keep of all activity after 6 cycle, while the immobilized pectinase was keep of all activity after 7 cycle.

Key words: immobilized enzymes, naringinase, pectinase, sodium alginate gel, natural juice.