



پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی
گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی

شفاف سازی مداوم آبمیوه در بیوراکتور بستر ثابت به وسیله تثبیت کووالانسی آنزیم
پکتیناز روی گلوله های شیشه ای با پلی ساکاریدهای آلدهیدی

نگارش

سید سعید حسینی

استاد راهنما

دکتر فرامرز خدائیان

استاد مشاور

دکتر سید محمد موسوی

رساله برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D.)
در رشته علوم و مهندسی صنایع غذایی، گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی

خرداد ۱۴۰۰

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی
گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی

شفاف‌سازی مداوم آبمیوه در بیوراکتور بستر ثابت به وسیله تثبیت کووالانسی آنزیم
پکتیناز روی گلوله‌های شیشه‌ای با پلی ساکاریدهای آلدهیدی

نگارش
سید سعید حسینی

استاد راهنما
دکتر فرامرز خدائیان

استاد مشاور
دکتر سید محمد موسوی

رساله برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D.)
در رشته علوم و مهندسی صنایع غذایی، گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی

اردیبهشت ۱۴۰۰

سوگند نامه دانش آموختگان دکتری دانشگاه تهران

بسم الله الرحمن الرحيم

سپاس یزدان پاک را که مرا مشمول الطافخویش نمود که با طی مراحل تحصیل به اخذ درجه دکتری نائل شوم بهشکرانه این نعمت بزرگالهی که با امکانات این مرز و بوم فراهم و نزد اینجانب به امانت گذاشته شده است، در پیشگاه ملت ایران به کتاب آسمانی خود، قرآن کریم، سوگند یاد می کنمکه:

- ✓ در سراسر زندگی حرفه ای، به نحو احسن راه اعتلای کشور ایران و جامعه بشری قدم برداشته و در این راه از هیچ کوششی دریغ نکنم.
- ✓ در تمام فعالیت های تخصصی، رضای خدا را همراه با صداقت علمی و اجتماعی مدنظر داشته و از موقعیت های به دست آمده در جهت رفع مشکلات مردم استفاده کنم و در همه امور، منافع کشور را بر منافع فردی مقدم بدارم.
- ✓ همواره علم و دانش خود را به روز نگاه داشته و در ادای وظایف و تعهدات حرفه ای در حد توان سعی و تلاش خود را به کار گیرم.
- ✓ واینک از خداوند متعال توفیق بندگی و پای بندی به مفاد این سوگندنامه را خواستارم و از او می خواهم که مرا در ادامه و پیمودن مسیر و فتح قله های رفیع علم و دانش و ایفای رسالت علمی و انسانی خویش موفق بدارد.

و ایمان دارم که:

"إِنَّ اللَّهَ يَعْلَمُ غَيْبَ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاللَّهُ بَصِيرٌ بِمَا تَعْمَلُونَ" (سوره حجرات، آیه ۱۸)

سیدسعید حسینی

امضاء

تقدیم به

پدرم به استواری کوه

مادرم به زلالی چشمه

همسرم به صمیمت باران

برادر و خواهر همیشه بهرام

و برادرزاده و خواهرزاده عزیزم

قدردانی

در آغاز مراتب سپاس خویش را تقدیم به درگاه خداوند متعال می‌نمایم که این حقیر را مورد لطف و رحمت خویش قرار داد و توانایی شکر و سپاس از ذات مقدس خود و بندگان شایسته‌اش را به بنده عطا فرمود.
"من لم یسکر المخلوق لم یسکر الخالق"

تا زنده‌ام بدیون خانواده عزیزم، هم، آن مهربان فرشتگانی که لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های یکم تا و زیبای زندگیم، بدیون حضور سبز آنهست.
از استاد اربنا و مشاور کرامت‌دورم جناب آقای پروفور فرامر ز خدا نیان و جناب آقای پروفور سید محمد موسوی که در کمال سه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ گلی در این عرصه بر این حقیر دریغ ننمودند کمال شکر و قدردانی را دارم.

از داوران محترم رساله جناب آقای پروفور سید مادی رضوی، جناب آقای دکتر سید بهایت حسینی، جناب آقای دکتر محمد جتی و سرکار خانم دکتر مریم سلامی که وقت نظرشان موجب پربار شدن این تحقیق گردید، کمال سپاس را دارم.

از کارمندان پرتلاش گروه خصوصاً سرکار خانم مندرس سیده صلاحی بابت تمام زحماتی که تحمل شده‌اند کمال شکر را دارم.
از خانواده محترم برانزده که در تمام مراحل این تحقیق به‌واره دکنارم بوده‌اند کمال شکر را دارم.

چکیده

در این تحقیق، از پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی برای تثبیت آنزیم پکتیناز روی گلوله های شیشه ای استفاده شده و سپس از گلوله های حاوی آنزیم برای شفاف سازی آب انار و آب زرشک به صورت غیر مداوم و مداوم در یک بیوراکتور بستر ثابت استفاده گردید. بدین منظور، ابتدا پولولان و کفیران با استفاده از سدیم پرپودات برای تشکیل گروه های آلدهیدی آزاد به صورت جزئی اکسید شده و میزان $1/3 \pm 19/9$ و $0/9 \pm 23/6$ درصد گروه های آلدهیدی آزاد روی آن ها تشکیل گردید که به وسیله طیف های FTIR تأیید شد. سپس از این اتصال دهنده های عرضی و همچنین گلو تار آلدهید برای تثبیت آنزیم های پکتیناز روی سطح گلوله های شیشه ای استفاده شد. نتایج نشان داد که کفیران پلی آلدهید بالاترین ظرفیت را در تثبیت آنزیم ها داشته به طوری که گلوله های حاوی گلو تار آلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید به ترتیب دارای $0/05 \pm 0/41$ ، $0/21 \pm 1/83$ و $0/86 \pm 5/25$ میلی گرم بر ده گلوله شیشه ای پروتئین بودند. همچنین، حضور رشته های پلیمری روی سطح گلوله های شیشه ای به وسیله SEM و AFM تأیید شد. نتایج نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم های آزاد و تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید در شرایط بهینه (دمای 50°C به ترتیب برابر با 5 و $5/5$ برای آنزیم های آزاد و تثبیت شده) به ترتیب برابر با $0/13 \pm 2/93$ ، $0/12 \pm 2/56$ و $0/18 \pm 2/21$ و $0/24 \pm 1/87$ یونیت بر میلی گرم پروتئین بوده است. همچنین در این شرایط، پارامترهای سینتیکی شامل K_m (میلی گرم و میلی لیتر) و V_{max} (میکرومول بر دقیقه بر میلی لیتر) برابر با $0/22 \pm 9/71$ و $0/13 \pm 3/07$ برای آنزیم های آزاد، $0/37 \pm 10/07$ و $0/29 \pm 2/93$ برای آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید، $0/24 \pm 11/21$ و $0/18 \pm 2/24$ برای آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید و $0/31 \pm 11/58$ و $0/14 \pm 2/17$ برای آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید بوده است. از طرفی، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید بیشترین قابلیت استفاده مجدد را داشته و پس از آن آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید و گلو تار آلدهید قرار داشتند. نتایج نشان داد که روش استفاده شده در این تحقیق به خوبی توانست سبب شفاف سازی آب انار و آب زرشک شده و به طور معنی داری منجر به کاهش کدورت و افزایش شفافیت این دو آبمیوه گردد. بعلاوه، بررسی خصوصیات آبمیوه های شفاف شده و نشده نشان داد که فرایند شفاف سازی منجر به کاهش پی اچ، مواد جامد محلول کل، ویسکوزیته، محتوای فنولی کل، قابلیت مهار رادیکال های آزاد و پارامتر رنگی سبز - قرمز و افزایش اسیدیته قابل تیتر، محتوای قند احیاء، شاخص روشنایی و شاخص آبی - زرد شده است. همچنین، نتایج به دست آمده نشان داد که آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در شرایط مداوم بیشترین اثر را روی خصوصیات آبمیوه ها داشته که این می تواند به دلیل بالاتر بودن قابلیت این اتصال دهنده عرضی در تثبیت آنزیم ها و همچنین تماس بهتر و بیشتر آنزیم ها با سوبسترا در شرایط مداوم باشد. در نهایت، می توان بیان داشت که روش استفاده شده در این مطالعه می تواند جایگزینی بالقوه برای روش متداول صنعتی شامل استفاده غیر مداوم از آنزیم های آزاد باشد.

واژه های کلیدی: پکتیناز؛ گلوله های شیشه ای؛ پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی؛ تثبیت کووالانسی؛ بیوراکتور بستر ثابت؛ شفاف سازی آبمیوه

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات.....	۲
۱-۱- مقدمه.....	۲
۲-۱- آنزیم.....	۵
۱-۲-۱- طبقه‌بندی آنزیم‌ها.....	۷
۲-۲-۱- پکتیناز.....	۸
۳-۱- تثبیت آنزیم.....	۹
۱-۳-۱- تاریخچه تثبیت آنزیم.....	۱۰
۱-۱-۳-۱- قبل از سال ۱۹۷۰.....	۱۲
۲-۱-۳-۱- بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۹۰.....	۱۴
۳-۱-۳-۱- پس از سال ۱۹۹۰ (طراحی منطقی آنزیم‌های تثبیت‌شده).....	۱۷
۲-۳-۱- روش‌های تثبیت آنزیم.....	۲۰
۱-۲-۳-۱- جذب فیزیکی.....	۲۰
۲-۲-۳-۱- حبس غشایی.....	۲۰
۳-۲-۳-۱- به دام انداختن.....	۲۲
۴-۲-۳-۱- اتصال عرضی.....	۲۲
۵-۲-۳-۱- اتصال کووالانسی.....	۲۳
۳-۳-۱- ساپورت یا حامل.....	۲۵
۱-۳-۳-۱- گلوله‌های شیشه‌ای.....	۲۶
۱-۱-۳-۳-۱- اصلاح سطح گلوله شیشه‌ای به‌وسیله ۳-آمینوپروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان.....	۲۷
۴-۳-۱- اتصال‌دهنده عرضی.....	۲۹

۲۹.....	۱-۴-۳-۱- گلاتار آلدهید
۳۱.....	۱-۴-۳-۲- پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی
۳۴.....	۴-۱- بیوراكتور بستر ثابت
۳۶.....	۵-۱- آب انار و آب زرشک
۳۷.....	۱-۵-۱- شفاف سازی آبمیوه
۳۹.....	۶-۱- اهداف پژوهش
۴۱.....	فصل دوم: مروری بر پژوهش های پیشین
۴۱.....	۱-۲- مروری بر مطالعات در زمینه تثبیت آنزیم ها و استفاده از آن ها در فرایندهای غیر مداوم
۴۹.....	۲-۲- مروری بر مطالعات در زمینه تثبیت آنزیم ها و استفاده از آن ها در فرایندهای مداوم
۵۴.....	۳-۲- مروری بر مطالعات در زمینه شفاف سازی آبمیوه ها
۶۲.....	فصل سوم: مواد و روش ها
۶۲.....	۱-۳- مواد
۶۳.....	۲-۳- دستگاه ها و تجهیزات
۶۴.....	۳-۳- روش کار و آزمون ها
۶۴.....	۱-۳-۳- تولید و خالص سازی کفیران
۶۵.....	۲-۳-۳- تولید پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی
۶۵.....	۳-۳-۳- اندازه گیری محتوای آلدهیدی پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی
۶۷.....	۴-۳-۳- بررسی طیف های مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)
۶۷.....	۵-۳-۳- تثبیت آنزیم های پکتیناز روی گلوله های شیشه ای
۶۸.....	۶-۳-۳- بررسی مورفولوژی سطحی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)
۶۸.....	۷-۳-۳- بررسی توپوگرافی سطحی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)
۶۸.....	۸-۳-۳- تعیین محتوای پروتئینی گلوله های شیشه ای حاوی آنزیم

۷۰.....	۹-۳-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده
۷۱.....	۱۰-۳-۳- بررسی اثر پی‌اچ روی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده
۷۱.....	۱۱-۳-۳- بررسی اثر پی‌اچ روی پایداری آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده
۷۱.....	۱۲-۳-۳- بررسی اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده
۷۲.....	۱۳-۳-۳- بررسی اثر دما روی پایداری آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده
۷۲.....	۱۴-۳-۳- اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی
۷۲.....	۱۵-۳-۳- بررسی امکان استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت‌شده
۷۳.....	۱۶-۳-۳- تولید آب زرشک و انار
۷۳.....	۱۷-۳-۳- طراحی و ساخت بیوراکتور بستر ثابت
۷۵.....	۱۸-۳-۳- تأثیر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت
۷۵.....	۱۹-۳-۳- بررسی اثر زمان فرایند روی شفاف‌سازی آبمیوه‌ها در بیوراکتور بستر ثابت
۷۵.....	۲۰-۳-۳- بهره‌وری حجمی آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم
۷۶.....	۲۱-۳-۳- شفاف‌سازی آنزیمی آبمیوه‌ها
۷۷.....	۲۲-۳-۳- بررسی خصوصیات آبمیوه‌های شفاف شده و نشده
۷۷.....	۱-۲۲-۳-۳- کدورت
۷۸.....	۲-۲۲-۳-۳- شفافیت
۷۸.....	۳-۲۲-۳-۳- پی‌اچ
۷۸.....	۴-۲۲-۳-۳- اسیدیته
۷۸.....	۵-۲۲-۳-۳- مواد جامد محلول کل
۷۸.....	۶-۲۲-۳-۳- محتوای قند احیاء
۷۹.....	۷-۲۲-۳-۳- ویسکوزیته
۷۹.....	۸-۲۲-۳-۳- تست حضور پکتین

۳-۲۲-۹-	محتوای فنول کل	۷۹.....
۳-۲۲-۱۰-	مهار رادیکال‌های آزاد ۱، ۱- دیفنیل-۲-پیکریلهیدرازیل (DPPH)	۸۰.....
۳-۲۲-۱۱-	مهار رادیکال‌های آزاد ۲، ۲- آزینوبیس (۳- اتیلبنزوتیازولین-۶- سلفونیک اسید) (ABTS)	۸۰.....
۳-۲۲-۱۲-	پارامترهای رنگی	۸۱.....
۳-۲۳-	آنالیز آماری	۸۱.....
۳-۲۳-	فصل چهارم: نتایج و بحث	۸۳.....
۴-۱-	اندازه‌گیری محتوای آلدهیدی پلی‌ساکاریدهای پلی‌آلدهیدی	۸۳.....
۴-۲-	برای طیف‌های FTIR پلی‌ساکاریدها قبل و بعد از اکسیداسیون	۸۴.....
۴-۳-	بررسی مورفولوژی سطحی به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی	۸۶.....
۴-۴-	بررسی توپوگرافی سطحی به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی	۸۷.....
۴-۵-	محتوای پروتئینی گلوله‌های شیشه‌ای حاوی آنزیم‌های پکتیناز تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف	۸۹.....
۴-۶-	اثر پی‌اچ روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده	۹۱.....
۴-۷-	اثر پی‌اچ روی پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده	۹۲.....
۴-۸-	اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده	۹۳.....
۴-۹-	اثر دما روی پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده	۹۵.....
۴-۱۰-	فعالیت ویژه آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده	۹۶.....
۴-۱۱-	پارامترهای سینتیکی مربوط به آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده	۹۸.....
۴-۱۲-	قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت‌شده	۹۹.....
۴-۱۳-	اثر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت	۱۰۰.....
۴-۱۴-	بررسی اثر زمان فرایند روی شفاف‌سازی آب انار و زرشک در بیوراکتور بستر ثابت	۱۰۲.....

۱۵-۴	- بهره‌وری حجمی آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده	۱۰۴
۱۶-۴	- اثر فرایند شفاف‌سازی روی خصوصیات آبمیوه‌ها	۱۰۵
۱۶-۴-۱	- کدورت و شفافیت	۱۰۵
۱۶-۴-۲	- پی‌اچ و اسیدیته	۱۰۸
۱۶-۴-۳	- مواد جامد محلول کل و محتوای قند احیاء	۱۱۰
۱۶-۴-۴	- ویسکوزیته و تست حضور پکتین	۱۱۲
۱۶-۴-۵	- محتوای فنول کل و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی	۱۱۴
۱۶-۴-۶	- پارامترهای رنگی	۱۱۶
	فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات	۱۲۰
۵-۱	- نتیجه‌گیری کلی	۱۲۰
۵-۲	- پیشنهادات	۱۲۲
	منابع	۱۲۳

فهرست جداول

- جدول ۱-۱- مزایا و معایب آنزیم‌ها برای استفاده به‌عنوان کاتالیزور ۶
- جدول ۱-۲- مزایا و معایب تثبیت آنزیم‌ها ۱۰
- جدول ۱-۳- مزایا و معایب روش‌های مختلف تثبیت آنزیم ۲۴
- جدول ۳-۱- مواد استفاده شده در این پژوهش ۶۲
- جدول ۳-۲- دستگاه‌ها و تجهیزات استفاده شده در این پژوهش ۶۳
- جدول ۳-۳- تیمارهای بکار رفته برای شفاف‌سازی آب انار و زرشک ۷۷
- جدول ۱-۴- محتوای آلدهیدی پلی‌ساکاریدهای پلی‌آلدهیدی مورد استفاده در این تحقیق ۸۴
- جدول ۲-۴- محتوای پروتئینی گلوله‌های شیشه‌ای حاوی آنزیم‌های پکتیناز تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف ۹۰
- جدول ۳-۴- فعالیت ویژه آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در شرایط بهینه فرایند (دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی - اچ ۵ برای آنزیم‌های آزاد و دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پی‌اچ ۵/۵ برای آنزیم‌های تثبیت‌شده) ۹۷
- جدول ۴-۴- پارامترهای سینتیکی شامل ثابت میکائلیس-منتن (K_m : میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و حداکثر نرخ سرعت (V_{max} : میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم) آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در شرایط بهینه فرایند (دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵ برای آنزیم‌های آزاد و دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پی‌اچ ۵/۵ برای آنزیم‌های تثبیت‌شده) ۹۸
- جدول ۴-۵- بهره‌وری حجمی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر دقیقه) آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در شرایط فرایند غیر مداوم و مداوم (دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵ و زمان ۲۱ دقیقه برای آنزیم آزاد، دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ و زمان ۲۱ دقیقه برای آنزیم‌های تثبیت‌شده در شرایط فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۲۱ دقیقه برای آنزیم‌های تثبیت‌شده در شرایط فرایند مداوم) ۱۰۵
- جدول ۴-۶- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی کدورت و شفافیت آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم) ۱۰۷

جدول ۴-۷- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی کدورت و شفافیت آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۰۸

جدول ۴-۸- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پی‌اچ و اسیدیته قابل تیتر (TTA؛ درصد حجمی/وزنی اسید سیتریک) آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۰۹

جدول ۴-۹- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پی‌اچ و اسیدیته قابل تیتر (TTA؛ درصد حجمی/وزنی اسید مالیک) آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۰

جدول ۴-۱۰- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی مواد جامد محلول کل (TSS؛ °Brix) و محتوای قند احیاء (میلی‌لیتر/میلی‌گرم) آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۱

جدول ۴-۱۱- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی مواد جامد محلول کل (TSS؛ °Brix) و محتوای قند احیاء (میلی‌لیتر/میلی‌گرم) آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۲

جدول ۴-۱۲- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی ویسکوزیته (میلی‌پاسکال ثانیه) و تست حضور پکتین آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۳

جدول ۴-۱۳- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی ویسکوزیته (میلی‌پاسکال ثانیه) و تست حضور پکتین آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۴

جدول ۴-۱۴- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی محتوای فنول کل (TPC؛ میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والانت بر میلی‌لیتر) و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH- (DPPH- RSA؛ درصد) و ABTS (ABTS-RSA؛ درصد) آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۵

جدول ۴-۱۵- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی محتوای فنول کل (TPC؛ میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والانت بر میلی‌لیتر) و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH- (DPPH- RSA؛ درصد) و ABTS (ABTS-RSA؛ درصد) آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۶

جدول ۴-۱۶- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پارامترهای رنگی آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۷

جدول ۴-۱۷- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پارامترهای رنگی آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)..... ۱۱۸

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- انواع مختلف پکتینازها و مکانیسم عملشان روی ترکیبات پکتیکی..... ۹
- شکل ۲-۱- مقالات منتشرشده در مورد تثبیت آنزیم (PubMed) ۱۱
- شکل ۳-۱- روش‌های تثبیت آنزیم: (الف) جذب غیر کووالانسی آنزیم یا یک ذره نامحلول؛ (ب) تثبیت کووالانسی آنزیم روی یک ذره نامحلول؛ (ج) حبس آنزیم در یک غشای نیمه‌تراوا؛ (د) به دام انداختن آنزیم در یک شبکه پلیمری؛ (و) اتصال عرضی بین مولکولی بین مولکول‌های آنزیم..... ۲۱
- شکل ۴-۱- دسته‌بندی ساپورت‌ها ۲۶
- شکل ۵-۱- ظاهر و ساختار شیمیایی گلوله‌هایی شیشه‌ای سودالایمی..... ۲۷
- شکل ۶-۱- ساختار شیمیایی یک مولکول ۳- آمینوپروپیل تری‌اتوکسی‌سیلان ۲۸
- شکل ۷-۱- واکنش سیلان‌یلاسیون بین شیشه هیدروکسیله شده و مولکول‌های ۳- آمینوپروپیل تری‌اتوکسی‌سیلان ۲۸
- شکل ۸-۱- جهت‌گیری‌های مختلف ۳- آمینوپروپیل تری‌اتوکسی‌سیلان برای اتصال به سطح شیشه ۲۹
- شکل ۹-۱- ساختار شیمیایی گلوآرالدهید ۳۰
- شکل ۱۰-۱- مکانیسم تثبیت آنزیم به‌وسیله گلوآرالدهید روی سطح گلوله شیشه‌ای اصلاح‌شده به‌وسیله ۳- آمینوپروپیل تری‌اتوکسی‌سیلان ۳۰
- شکل ۱۱-۱- مکانیسم اکسیداسیون یک واحد قندی شش کربنه به‌وسیله پریودات ۳۱
- شکل ۱۲-۱- مکانیسم تشکیل همی‌استال در اثر واکنش یک گروه آلدهیدی آزاد با یک گروه هیدروکسیل چسبیده به کربن مجاور ۳۲
- شکل ۱۳-۱- مکانیسم اکسیداسیون جزئی پولولان به‌وسیله یون پریودات و تبدیل آن به پولولان پلی‌آلدهید ۳۳
- شکل ۱۴-۱- مکانیسم اکسیداسیون جزئی کفیران به‌وسیله یون پریودات و تبدیل آن به کفیران پلی‌آلدهید ۳۴
- شکل ۱۵-۱- نمایی از یک بیوراکتور بستر ثابت استوانه‌ای ۳۵

شکل ۱-۱۶- ساختار شیمیایی پکتین ۳۷

شکل ۳-۱- مکانیسم اکسیداسیون جزئی کفیران و پولولان به وسیله سدیم پریدات و تبدیل آن به کفیران و پولولان پلی آلدئید ۶۶

شکل ۳-۲- مکانیسم سیلانی شدن و تثبیت آنزیم های پکتیناز به وسیله گلو تار آلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید روی سطح گلوله شیشه ای ۶۹

شکل ۳-۳- بیوراکتور بستر ثابت استفاده شده در این پژوهش ۷۴

شکل ۳-۴- نمای کلی از بیوراکتور و همچنین نحوه فرایند مداوم مورد استفاده در این پژوهش ۷۴

شکل ۴-۱- طیف های FTIR پولولان (الف) قبل و (ب) بعد از فرایند اکسیداسیون ۸۵

شکل ۴-۲- طیف های FTIR کفیران (الف) قبل و (ب) بعد از فرایند اکسیداسیون ۸۵

شکل ۴-۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله پولولان پلی آلدئید ۸۸

شکل ۴-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله کفیران پلی آلدئید ۸۸

شکل ۴-۵- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله پولولان پلی آلدئید ۸۹

شکل ۴-۶- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله کفیران پلی آلدئید ۸۹

شکل ۴-۷- اثر پی اچ روی فعالیت آنزیم های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف شامل گلو تار آلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه انجام شد) ۹۲

شکل ۴-۸- پایداری آنزیم های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف شامل گلو تار آلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید در پی اچ های مختلف (پس از آنکوبه کردن در پی اچ های مختلف، از دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی اچ ۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای انجام واکنش هیدرولیز به وسیله آنزیم های آزاد و از دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی اچ ۵/۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای انجام واکنش هیدرولیز به وسیله آنزیم های تثبیت شده استفاده شد) ۹۳

شکل ۴-۹- اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوٲارآلدهید، پولولان پلی‌آلدهید و کفیران پلی‌آلدهید (فرایند در پی‌اچ ۵ و مدت‌زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های آزاد و در پی‌اچ ۵/۵ و مدت‌زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های تثبیت‌شده انجام شد) ۹۴.....

شکل ۴-۱۰- پایداری (الف) آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل (ب) گلوٲارآلدهید، (ج) پولولان پلی‌آلدهید و (د) کفیران پلی‌آلدهید در دماهای مختلف (پس‌از آن‌کوبه کردن در دماها و زمان‌های مختلف، فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵ و مدت‌زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های آزاد و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ و مدت‌زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های تثبیت‌شده انجام شد) ۹۶.....

شکل ۴-۱۱- قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوٲارآلدهید، پولولان پلی‌آلدهید و کفیران پلی‌آلدهید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ و مدت‌زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای هر سیکل واکنش انجام شد) ۱۰۰.....

شکل ۴-۱۲- اثر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوٲارآلدهید، پولولان پلی‌آلدهید و کفیران پلی‌آلدهید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پی‌اچ ۳ انجام شد) ۱۰۲.....

شکل ۴-۱۳- اثر مدت‌زمان شفاف‌سازی مداوم آب انار در بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوٲارآلدهید، پولولان پلی‌آلدهید و کفیران پلی‌آلدهید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد) ۱۰۳.....

شکل ۴-۱۴- اثر مدت‌زمان شفاف‌سازی مداوم آب زرشک در بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوٲارآلدهید، پولولان پلی‌آلدهید و کفیران پلی‌آلدهید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد) ۱۰۴.....

شکل ۴-۱۵- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و مدت‌زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم) ۱۰۶.....

شکل ۴-۱۶- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و مدت‌زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم) ۱۰۷.....

فصل اول

مقدمه و کلیات

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

پکتیناز^۱ نامی عمومی برای گروهی از آنزیمها است که واکنش هیدرولیز پکتین^۲ (عامل اصلی کدورت و ایجاد رسوب در آبمیوهها) را به عنوان یکی از مهم ترین پلی ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی گیاهان کاتالیز می کنند (کاظمی^۳ و همکاران، ۲۰۲۰؛ عسگری^۴ و همکاران، ۲۰۲۰). این گروه از آنزیمها معمولاً شامل پکتین لیاز^۵، پلی- گالاکتوروناز^۶ و پکتین استراز^۷ بوده که به ترتیب واکنش هیدرولیز پکتین، پلی گالاکتورونیک اسید^۸ و پیوندهای استری موجود در ساختار پکتین را کاتالیز می نمایند و کاربرد گسترده ای در تخمیر چای و قهوه، تولید غذای دام، تیمار ضایعات کشاورزی و شفاف سازی^۹ آبمیوهها دارند (امین^{۱۰} و همکاران، ۲۰۱۷). اکثر این فرایندها بخصوص شفاف سازی آبمیوهها به وسیله روش های شیمیایی نیز قابل انجام است اما آنچه سبب جایگزین شدن آنزیمها شده است مربوط به صرفه اقتصادی، عدم آلودگی محیط زیست، عملکرد اختصاصی و فعالیت در شرایط ملایم واکنش می باشد (گو^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۲). به هر حال، علیرغم این مزایای بالقوه، استفاده از آنزیمهای آزاد با محدودیتهایی همراه است که از مهم ترین آن می توان به پایداری پایین، مشکلات مربوط به جداسازی از محصول و عدم امکان استفاده مجدد اشاره کرد (رهمان^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۴a). برای غلبه بر این مشکلات، مطالعات گسترده ای در مورد تثبیت آنزیم به منظور افزایش پایداری آنزیم، کنترل بهتر فرایند، امکان استفاده مجدد و همچنین امکان انجام فرایند

¹¹ Pectinase

² Pectin

³ Kazemi

⁴ Asgari

⁵ Pectin lyase

⁶ Polygalacturonase

⁷ Pectinesterase

⁸ Polygalacturonic acid

⁹ Clarification

¹⁰ Amin

¹¹ Goh

¹² Rehman

به صورت مداوم در انواع بیوراکتورها در حال انجام بوده و تاکنون مقالات متعددی در این زمینه به چاپ رسیده است (شلدان^۱ و همکاران، ۲۰۰۷؛ امین و همکاران، ۲۰۱۷).

در فرایند تثبیت آنزیم، انتخاب یک حامل یا ساپورت^۲ مناسب و استفاده از یک روش تثبیت کارآمد برای دستیابی به عملکردی مناسب ضروری است (دال ماگرو^۳ و همکاران، ۲۰۱۹). تاکنون ساپورت‌ها و پروتکل‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌های مختلف استفاده شده است که از آن می‌توان به تثبیت پکتیناز در ماتریکس آگار-آگار یا کلسیم آلزینات با استفاده از روش به دام انداختن (رهمان و همکاران، ۲۰۱۳ و ۲۰۱۴a)، تثبیت کووالانسی پکتیناز در گلوله‌های کیتوزانی به وسیله فرمالدهید^۴ و یا روی گلوله‌هایی از جنس پلی‌آکریل آمید به وسیله گلو تار آلدهید^۵ (رهمان و همکاران، ۲۰۱۴b؛ لی و جیانگ^۶، ۲۰۱۱) و تثبیت کووالانسی بتا-گالاکتوزیداز، پراکسیداز و یا پکتیناز روی گلوله‌های شیشه‌ای به وسیله گلو تار آلدهید (گومز^۷ و همکاران، ۲۰۰۶؛ دیانو^۸ و همکاران، ۲۰۰۸؛ اسکندرلو و عباسپورراد^۹، ۲۰۱۸) اشاره کرد.

در میان ساپورت‌های مختلف، گلوله‌های شیشه‌ای^{۱۰} به دلیل عدم حلالیت، پایداری بالا و مقاومت در برابر شرایط سخت فرایند مداوم بسیار مورد توجه می‌باشند. برای استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای به عنوان ساپورت، ایجاد تغییراتی روی سطح آن به منظور ایجاد قابلیت تثبیت آنزیم امری اجتناب‌ناپذیر است. بدین منظور، در تحقیقات مختلف معمولاً به ترتیب از ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان^{۱۱} برای ایجاد گروه‌های آمینی آزاد و سپس از گلو تار آلدهید به منظور ایجاد گروه‌های آلدهیدی آزاد استفاده می‌شود. اگرچه گلو تار آلدهید یک اتصال‌دهنده عرضی بسیار مناسب و در دسترس می‌باشد اما ترکیبی بسیار سمی است و بنابراین کاربرد صنعتی آن با محدودیت‌های همراه بوده و جایگزین

¹ Sheldon

² Support

³ Dal Magro

⁴ Formaldehyde

⁵ Glutaraldehyde

⁶ Lei and Jiang

⁷ Gomez

⁸ Diano

⁹ Eskandarloo and Abbaspourrad

¹⁰ Glass beads

¹¹ 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES)

کردن آن امری ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر، پلی‌ساکاریدهای پلی‌آلدهیدی^۱ توجه زیادی را به‌عنوان اتصال‌دهنده‌های عرضی به خود جلب کرده که قادرند با گروه‌های آلدهیدی آزاد خود به گروه‌های آمین آنزیم از طریق تشکیل شیف‌باز^۲ متصل شوند (گو^۳ و همکاران، ۲۰۱۴).

پولولان^۴ یک اگزوپلی‌ساکارید^۵ خطی تولیدی به‌وسیله *آئروباژیدیوم پولولانس*^۶ بوده از واحدهای سه گلوکزی مالتوتریوز با اتصال داخلی آلفا-۱ به ۴ و اتصال خارجی آلفا-۱ به ۶ تشکیل شده است (چن^۷ و همکاران، ۲۰۱۷؛ سینگ^۸ و همکاران، ۲۰۱۷؛ حمیدی^۹ و همکاران، ۲۰۱۹). کفیران^{۱۰} نیز یک اگزوپلی‌ساکارید شاخه‌دار تولیدی به‌وسیله فلور میکروبی دانک کفیر بخصوص *لاکتوباسیلوس کفیرانوفایشنس*^{۱۱} بوده که از مقادیر برابری از گلوکز و گالاکتوز با پیوندهای گلیکوزیدی مختلف تشکیل شده است (زلفی^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۴). از نظر تئوری، با ایجاد گروه‌های آلدهیدی آزاد روی این اگزوپلی‌ساکاریدها می‌توان از آن‌ها به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی ایمن و با کارایی بالا استفاده نمود. سدیم پریودات^{۱۳} یکی از مهم‌ترین ترکیباتی است که به فراوانی برای اکسیداسیون و ایجاد گروه‌های آلدهیدی آزاد روی پلی‌ساکاریدها استفاده می‌شود. در فرایند اکسیداسیون به‌وسیله این ترکیب، یون‌های پریودات به پیوند بین کربن‌های شماره ۲ و ۳ مونومرهای سازنده یک پلی‌ساکارید حمله کرده و سبب شکسته شدن آن‌ها و تشکیل دو گروه آلدهیدی آزاد می‌شوند (گو و همکاران، ۲۰۱۴؛ لی^{۱۴} و همکاران، ۲۰۱۱).

همان‌طور که بیان شد، یکی از مهم‌ترین کاربرد آنزیم‌های پکتیناز در شفاف‌سازی آبمیوه‌ها از طریق حذف پکتین می‌باشد. عملکرد پکتین در آبمیوه‌ها بدین صورت بوده که این ترکیب شبکه‌ای را تشکیل داده و مواد معلق در آبمیوه

¹ Polyaldehyde polysaccharides

² Schiff's base

³ Guo

⁴ Pullulan

⁵ Exo-polysaccharide

⁶ *Aureobasidium pullulans*

⁷ Chen

⁸ Singh

⁹ Hamidi

¹⁰ Kefiran

¹¹ *Lactobacillus kefiranofaciens*

¹² Zolfi

¹³ Sodium periodate

¹⁴ Li

را در خود نگه می‌دارد که سبب ایجاد کدورت در آبمیوه و در نهایت رسوب در محصول نهایی طی مدت زمان نگهداری می‌شود. آنزیم‌های پکتیناز با هیدرولیز پکتین و تخریب شبکه پلیمری ایجاد شده به وسیله آن منجر به آزاد شدن ترکیبات معلق و رسوب آن‌ها شده و در نتیجه محصولی شفاف و بدون رسوب را تولید می‌نماید. آب زرشک و آب انار از جمله آبمیوه‌های فراسودمند بوده که به فراوانی در ایران تولید و مصرف می‌گردد. این محصولات سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بوده و در نتیجه در طب سنتی به استفاده از آن‌ها بسیار تأکید شده است. به هر حال، این آبمیوه‌ها نیز پس از تولید کدر بوده و در طی نگهداری رسوب تشکیل می‌دهند که سبب کاهش مشتری‌پسندی آن‌ها می‌شود و بنابراین فرایند شفاف‌سازی آن‌ها امری ضروری است. پس از تثبیت آنزیم، استفاده از فرایند شفاف‌سازی مداوم در یک بیوراکتور بستر ثابت بسیار کارآمدتر از فرایند غیر مداوم خواهد بود که این مربوط به کاهش زمان و هزینه، کنترل آسان‌تر و بهتر فرایند، جداسازی آسان‌تر محصول از آنزیم و همچنین تولید محصولات یکنواخت با کمترین میزان آلودگی می‌باشد. به توجه به موارد گفته شده در بالا، می‌توان بیان داشت که هدف کلی این تحقیق، تثبیت کووالانسی آنزیم پکتیناز روی گلوله‌های شیشه‌ای به وسیله پلی‌آلدهیدهای پولولان و کفیران و استفاده از آن به منظور شفاف‌سازی مداوم آب زرشک و انار در بیوراکتور بستر ثابت می‌باشد.

۱-۲- آنزیم

آنزیم^۱ها کاتالیزورهای پروتئینی ماکرومولکولی هستند که از پیوندهای آمیدی بین آلفا-آمینواسیدها تشکیل می‌شوند. هر آنزیم دارای توالی آمینواسیدی مشخص با ساختار سه‌بعدی منحصر به فردی است (لودیش^۲ و همکاران، ۱۹۹۹) که سبب تسریع واکنش‌های بیولوژیکی در سیستم‌های زنده از طریق کاهش انرژی فعال‌سازی می‌شود. این مولکول‌ها از چندین هزار اتم با سازمان‌دهی دقیق تشکیل شده‌اند که می‌توانند واکنش‌های شیمیایی مختلفی را در سلول‌های بیولوژیکی کاتالیز نمایند. نقش آنزیم‌ها در فرایندهای بیولوژیکی و همچنین در سلامتی و بیماری

¹ Enzyme

² Lodish

موجودات مختلف به صورت ویژه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است. این کاتالیزورها قبل از اینکه به عنوان یک ترکیب کلیدی شناخته شوند نقش ویژه‌ای را در زندگی بشر بخصوص در فرایند مواد غذایی داشتند (استرایر،^۱ ۱۹۹۵). آنزیم‌ها فعالیت کاتالیزوری را تحت شرایط بسیار ملایم و به صورت اختصاصی^۲ برای سوبستراهای^۳ ویژه با کمترین میزان تولید محصولات جانبی انجام می‌دهند. در واکنش‌های کاتالیز شده به وسیله آنزیم، یک سری از تبدیلات شیمیایی بسیار پیچیده بین ماکرومولکول‌های بیولوژیکی اتفاق می‌افتد که در روش‌های معمول شیمی آلی قابل بررسی نیست که همین مورد آن‌ها را برای استفاده بیوتکنولوژیکی بسیار جذاب می‌کند. در آغاز قرن بیستم، آنزیم‌ها به عنوان عوامل اصلی فرایند تخمیر شناخته شده و ساختار و ترکیبات آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (کریگتون،^۴ ۱۹۸۴) و نتایج این بررسی‌ها منجر به استفاده گسترده از آن‌ها برای کاتالیز بیولوژیکی در زمینه‌های مختلفی مانند صنایع نساجی، دارویی و شیمیایی شد. در جدول ۱-۱ به برخی از مزایا و معایب آنزیم‌ها برای کاربرد در صنایع مختلف اشاره شده است.

جدول ۱-۱- مزایا و معایب آنزیم‌ها برای استفاده به عنوان کاتالیزور

مزایا	معایب
بسیار اختصاصی عمل می‌کنند	دارای ساختار مولکولی پیچیده هستند
تحت شرایط ملایم دارای فعالیت بالا هستند	تولید آن‌ها هزینه‌بر است
راندمان تولید بالایی دارند	ذاتاً ترکیبات شکننده‌ای هستند
زیست تخریب پذیر هستند	
در کل جزو ترکیبات طبیعی در نظر گرفته می‌شوند	

¹ Stryer

² Specificity

³ Substrate

⁴ Creighton

۱-۲-۱- طبقه بندی آنزیم ها

کمیته نام گذاری اتحادیه بین المللی بیوشیمی و بیولوژی مولکولی (IUBMB)^۱ آنزیم ها را بر اساس واکنش شیمیایی که کاتالیز می کنند به شش خانواده کلی تقسیم کرده است. همچنین کمیسیون آنزیم (EC)^۲ این کمیته یک عدد چهار بخشی را به هر آنزیم اختصاص داده است که بر این اساس عدد اول نشان دهنده خانواده، عدد دوم نشان دهنده زیر کلاس خانواده که به نوع گروه شیمیایی که روی آن عمل می کند مربوط است، عدد سوم نشان دهنده زیر گروه یک زیر کلاس است که مرتبط با گروه شیمیایی خاص درگیر در واکنش می باشد و نهایتاً عدد چهارم شماره ای برای شناسایی در یک زیر گروه است. این شش خانواده عبارتند از:

(۱) اکسیدوردوکتازها^۳: آنزیم های که واکنش های اکسیداسیون/احیا را کاتالیز می کنند و در انتقال الکترون ها درگیر هستند در این خانواده قرار می گیرند.

(۲) ترانسفرازها^۴: آنزیم هایی که یک گروه عملکردی را از یک دهنده به یک گیرنده مناسب منتقل می کنند در این گروه قرار دارند.

(۳) هیدرولازها^۵: آنزیم هایی که واکنش های هیدرولیز را کاتالیز کرده و درگیر در شکستن باندهایی شیمیایی هستند در این خانواده قرار دارند.

(۴) لیاها^۶: آنزیم های کاتالیز کننده واکنش های غیر اکسیداتیو و غیر هیدرولیتیک شکستن باندها در این خانواده قرار می گیرند.

(۵) ایزومرازها^۷: آنزیم هایی که واکنش تبدیل ایزومرها به یکدیگر را کاتالیز می کنند در این خانواده قرار می گیرند.

(۶) لیگازها^۸: آنزیم هایی که واکنش پیوند کووالانسی بین دو مولکول را کاتالیز می کنند در این خانواده قرار می گیرند.

¹ Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology

² Enzyme Commission

³ Oxidoreductases

⁴ Transferases

⁵ Hydrolases

⁶ Lyases

⁷ Isomerases

⁸ Ligases

۱-۲-۲- پکتیناز

به طور کلی، پکتیناز^۱ به عنوان عضوی از خانواده هیدرولازها شامل مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه کننده پکتین^۲ به عنوان یک هتروپلی ساکارید^۳ موجود در دیواره سلولی همه گیاهان می باشد (رهمان^۴ و همکاران، ۲۰۱۴b؛ حسینی^۵ و همکاران، ۲۰۱۹). این آنزیم در واقع مجموعه‌ای از آنزیم‌ها بوده که از مهم ترین آن می توان به پکتین لیاز^۶ (EC 4.2.2.10)، پلی گالاکتوروناز^۷ (EC 3.2.1.15) و پکتین استراز^۸ (EC 3.1.1.11) اشاره کرد. همان طور که در شکل ۱-۱ نشان داده شده است، آنزیم اول و دوم به ترتیب باندهای گلیکوزیدی^۹ موجود در پکتین و پلی گالاکتورونیک اسید^{۱۰} را هیدرولیز کرده و آنزیم سوم منجر به داستریفیکاسیون^{۱۱} پکتین و تولید سوپسترا برای پلی گالاکتوروناز می شود (دیانو^{۱۲} و همکاران، ۲۰۰۸). این مجموعه آنزیمی کاربرد فراوانی در صنایع غذایی بخصوص در شفاف سازی آبمیوه دارند چراکه قابلیت هیدرولیز پکتین به عنوان عامل اصلی ایجاد کدورت و رسوب در بسته بندی های آبمیوه را دارا می باشند (رهمان و همکاران، ۲۰۱۳).

¹ Pectinases

² Pectin

³ Heteropolysaccharide

⁴ Rehman

⁵ Hosseini

⁶ Pectinlyase

⁷ Polygalacturonase

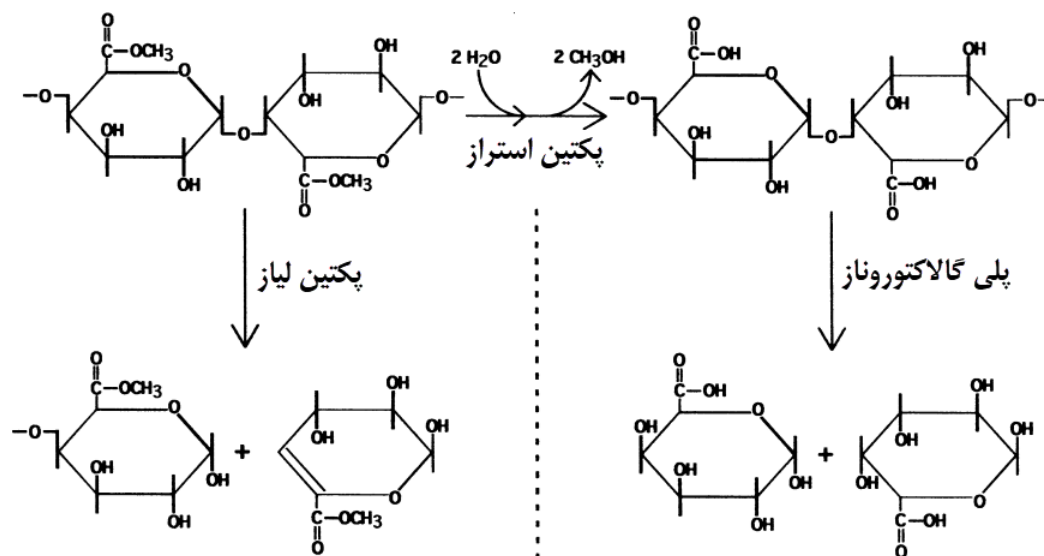
⁸ Pectinesterase

⁹ Glycosidic bonds

¹⁰ Polygalacturonic acid

¹¹ De-esterification

¹² Diano



شکل ۱-۱- انواع مختلف پکتینازها و مکانیسم عملشان روی ترکیبات پکتیکی

۳-۱- تثبیت آنزیم

اگرچه استفاده از آنزیم برای تسریع واکنش‌ها مزایای گسترده‌ای دارد اما مشکلاتی نیز وجود دارد که کاربرد آن‌ها را محدود کرده است. برای مثال اکثر آنزیم‌ها نسبتاً ناپایدار هستند، هزینه تولید و خالص‌سازی آن‌ها هنوز هم زیاد بوده و همچنین جداسازی آنزیم‌های فعال (به‌منظور استفاده مجدد) از محیط واکنش پس از کامل شدن فرایند پروسه‌ای دشوار است (د الیویرا^۱ و همکاران، ۲۰۱۸a).

به‌طور کلی، آنزیم‌ها قادرند در حالت‌های مختلفی مانند: (۱) به‌صورت آزاد در محلول؛ (۲) به‌صورت توده‌های^۲ آنزیمی که در آن آنزیم‌ها به یکدیگر متصل هستند؛ (۳) به‌صورت چسبیده به یک سطح واکنش‌ها را کاتالیز نمایند. حالت چسبیده یا تثبیت‌شده در تحقیقات علمی و کاربردهای صنعتی و برای رفع مشکلات مربوط به استفاده از آنزیم آزاد بسیار مورد توجه است. به‌طور کلی آنزیم‌های تثبیت‌شده^۳ به آنزیم‌هایی گفته می‌شود که با حفظ فعالیت‌های کاتالیزوری خود، در یک منطقه مشخص از فضا به‌طور فیزیکی به‌صورت بی‌حرکت قرار می‌گیرند و می‌توانند به‌طور

¹ de Oliveira

² Aggregates

³ Immobilized enzymes



مکرر و مداوم استفاده شوند (محمد^۱ و همکاران، ۲۰۱۵). در جدول ۱-۲ به مزایا و معایب آنزیم‌های تثبیت شده اشاره شده است.

جدول ۱-۲- مزایا و معایب تثبیت آنزیم‌ها

مزایا	معایب
افزایش پایداری	کاهش فعالیت
امکان استفاده مجدد	محدودیت انتشار
عملیات آسان تر در راکتور	هزینه اضافی
جداسازی آسان تر محصول	
انتخاب گسترده تر راکتور	

۱-۳-۱- تاریخچه تثبیت آنزیم

مفهوم تغییر حرکت آزادانه آنزیم به یک حالت ثابت با حرکت جزئی در جایگاه فعال آنزیم از سال ۱۹۱۶ شروع شد و اولین تحقیقات مربوط به نقش بخش‌های غیر از جایگاه فعال آنزیم در طول فرایند کاتالیز بود. این بخش‌ها باید تا جای ممکن شکل طبیعی خود را حفظ کرده و جایگاه فعال را به سمتی هدایت کنند که به درستی با سوبسترا درگیر شده و فرایند کاتالیز انجام شود (فرشت،^۲ ۱۹۹۸؛ پاورز،^۳ ۲۰۰۶). اینورتاز^۴ اولین آنزیمی بود که روی یک ماتریکس مانند زغال چوب یا آلومینیوم هیدروکسید در اواخر سال ۱۹۱۶ تثبیت شد که نتایج نشان داد که فرایند تثبیت تأثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم نداشت (نلسون و گریفین،^۵ ۱۹۱۶). در طول سال‌های قبل از ۱۹۴۰، روش‌های تثبیت بر اساس استفاده از حجم بالای آنزیم نسبت به ماتریکس شکل گرفته بودند و بنابراین از این روش‌ها بیشتر برای تثبیت آنزیم‌هایی استفاده می‌شد که در دسترس بوده و قیمت پایین‌تری داشتند.

¹ Mohamad

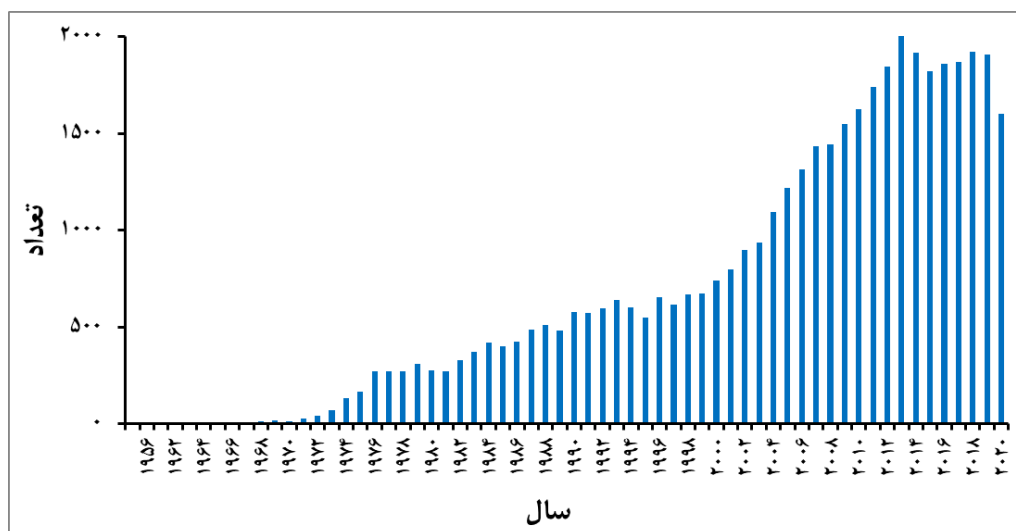
² Fersht

³ Powers

⁴ Invertase

⁵ Nelson and Griffin

تاکنون بیش از سی هزار اثر علمی و تعدادی ثبت اختراع برای فرایند تثبیت آنزیم منتشر شده است و انتظار می رود این میزان در سال های آینده با رشد بسیار چشمگیری همراه باشد (شکل ۱-۲). از نگاه صنعتی نیز تاکنون آنزیم های تثبیت شده متفاوتی شامل پنی سیلین جی آسیلاز^۱، اینورتاز، لیپاز^۲ها و پروتئاز^۳ها به صورت تجاری و در مقیاس های بالا تولید و مورد استفاده قرار گرفتند (چری و فیدانتسف، ۲۰۰۳^۴). اگرچه تاکنون مقالات متعددی در این زمینه به چاپ رسیده است اما همچنان محققین به دنبال بررسی جنبه های مختلف و بررسی نشده این فرایند هستند.



شکل ۱-۲- مقالات منتشر شده در مورد تثبیت آنزیم (PubMed)

به طور کلی، تاریخچه فرایند تثبیت آنزیم را می توان در چندین بخش مهم مورد بررسی قرار داد که در زیر به آن ها

اشاره شده است:

¹ Penicillin G acylase

² Lipase

³ Protease

⁴ Cherry and Fidantsef

۱-۳-۱- قبل از سال ۱۹۷۰

❖ ۱۹۱۶ تا ۱۹۴۰ (مرحله اولیه)

در طول این مدت ماتریکس‌های تثبیت متفاوتی مورد بررسی قرار گرفتند که اکثراً حامل‌های معدنی مانند شیشه، آلومینا، شیشه‌های پوشش داده شده با ترکیبات آب‌گریز بودند که برای تثبیت آنزیم و مولکول‌های زیستی دیگر شامل ایمونوگلوبولین‌ها، اندامک‌های سلولی و یا خود سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند (نلسون و هیچکاک،^۱ ۱۹۲۱؛ لانگمویر و اسکافر،^۲ ۱۹۳۸؛ هارکینز^۳ و همکاران، ۱۹۴۰؛ هارتمیر،^۴ ۱۹۸۸؛ تریوان،^۵ ۱۹۸۰). همچنین در این سال‌ها، تمامی روش‌های استفاده شده غیرقابل بازگشت و بر اساس روش جذب^۶ بوده‌اند. تثبیت اینورتاز روی آلومینیوم هیدروکسید و زغال چوب به‌وسیله نلسون و گریفین به‌عنوان اولین مقاله علمی منتشر شده در مورد تثبیت آنزیم شناخته می‌شود که زمینه را برای کارهای بعدی فراهم کرد (نلسون و گریفین، ۱۹۱۶).

❖ ۱۹۴۰ تا ۱۹۶۵ (مرحله در حال توسعه)

این دوره را می‌توان به‌عنوان مرحله گذار روش تثبیت از جذب فیزیکی به جذب یونی به‌عنوان روشی تخصصی‌تر و بادوام‌تر نامید. در این دوره، ماتریکس‌های مختلفی شامل فسفوسلولز، DEAE-سلولز، سلولز، آمبرلیت XE-۹۷ و پلیمرهای سنتزی مانند پلی‌آمینوآستایرن و پلی‌ایزوسیانات و همچنین مواد معدنی مانند شیشه و خاک رس مورد استفاده قرار گرفت. همچنین تلاش زیادی برای استفاده از روش کووالانسی به‌منظور تثبیت روی این ماتریکس‌ها صورت پذیرفت که به دلیل قدرت نگهداری ضعیف و خاصیت آب‌گریزی بسیار بالا این حامل‌ها اغلب با شکست

¹ Nelson and Hitchcock² Langmuir and Schaefer³ Harkins⁴ Hartmeier⁵ Trevan⁶ Adsorption

مواجه شد (کروبهوفر و اسکلیس،^۱ ۱۹۵۳؛ دیکی،^۲ ۱۹۵۵؛ مکلارن،^۳ ۱۹۵۷، بارت و بال،^۴ ۱۹۵۹؛ کیوچو و ریچاردز،^۵ ۱۹۶۴).

❖ ۱۹۶۵ تا ۱۹۷۰ (مرحله توسعه)

این مرحله بیشتر روی تثبیت آنزیم به روش کووالانسی با استفاده از اتصال دهنده‌های عرضی متفاوت فوکوس داشته است. در این مورد، برای اولین بار گلو تار آلدهید^۶ برای تثبیت آنزیم روی حامل‌های نامحلول شامل پلیمرهای طبیعی و سنتزی مورد استفاده قرار گرفت. حامل‌های متعدد با طبیعت شیمیایی و فیزیکی، آب دوستی یا آبگریزی و در شکل‌های و اندازه‌های متفاوتی مورد استفاده قرار گرفت که در این بین می‌توان به گلوله‌ها، صفحه‌ها، فیلم‌ها، غشاها و یا کپسول‌های پلیمری مختلف اشاره کرد. برای مثال، پلیمر آکریل آمید به منظور تثبیت تعدادی از مولکول‌های فعال بیولوژیکی با وزن مولکولی بالا مانند انواع میکروارگانیزم‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها استفاده شد (موسبیچ^۷ و موسبیچ، ۱۹۶۶؛ چاس و شاو،^۸ ۱۹۶۷؛ براون^۹ و همکاران، ۱۹۶۸، بارکر^{۱۰} و همکاران، ۱۹۶۸؛ سایکس،^{۱۱} ۱۹۶۸؛ هاینس و والش،^{۱۲} ۱۹۶۹).

¹ Grubhofer and Schelth

² Dickey

³ McLaren

⁴ Barnet and Bull

⁵ Quiocho and Richards

⁶ Glutaraldehyde

⁷ Mosbach

⁸ Chase and Shaw

⁹ Brown

¹⁰ Barker

¹¹ Sykes

¹² Haynes and Walsh

۱-۳-۲- بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۹۰

❖ ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ (مرحله توسعه یافته)

این مرحله شامل شناسایی ماتریکس‌های جدیدی برای تثبیت آنزیم به روش‌های مختلف کووالانسی، جذب، به دام انداختن و انکپسولاسیون^۱ می‌باشد. همچنین اصلاحاتی در روش‌های پایه تثبیت به منظور افزایش کارایی انجام شد که به عنوان مثال می‌توان به به دام انداختن آنزیم در ماتریکس ژل با استفاده از پیوند کووالانسی به منظور کاهش رهایش آنزیم‌ها اشاره کرد (کوچ-اسکمیدت و مسباچ،^۲ ۱۹۷۷a). در این دوره، تثبیت آنزیم با استفاده از فاصله دهنده^۳ به منظور جلوگیری از تجمع آنزیم‌ها روی حامل توسعه یافت. پلیمرهای مختلفی با ویژگی‌های معین با توجه به خصوصیات آب‌گریزی یا آب‌دوستی، اندازه ذره و عملکرد اتصال به منظور تثبیت‌سازی آنزیم طراحی شدند (کالدول^۴ و همکاران، ۱۹۷۶a,b). همچنین واکنش‌های شیمیایی جدید مختلفی به منظور تثبیت آنزیم به روش کووالانسی تعریف شدند که از آن می‌توان به واکنش یوگی^۵ و آسیلاسیون^۶ با یک ایمیدواستر^۷ اشاره کرد. بعلاوه مکانیسم‌های جدیدی برای بهبود عملکرد تثبیت آنزیم‌ها توسعه یافتند که از آن‌ها می‌توان به استراتژی پایداری-تثبیت، تثبیت آنزیم با جایگاه فعال ویژه روی میسل، اتصال درون‌مولکولی و اتصال چندگانه اشاره کرد، که مجموع این موارد برای کاربردهای وسیع آنزیم بسیار مفید واقع شد (گلدستین،^۸ ۱۹۷۲؛ کوچ-اسکمیدت و همکاران، ۱۹۷۷b؛ گابل^۹ و همکاران، ۱۹۷۱). از بزرگ‌ترین دستاوردهای این دوره می‌توان به تثبیت پنی‌سیلین جی آسیلاز برای تولید APA-۶ به عنوان یک حد واسط برای سنتز بتا-لاکتام آنتی‌بیوتیکس و همچنین تولید شربت فروکتوز با استفاده از گلوکز

¹ Encapsulation² Koch-Schmidt and Mosbach³ Spacer⁴ Caldwell⁵ Ugi reaction⁶ Acylation⁷ Imidoester⁸ Goldstein⁹ Gabel

ایزومراز^۱ تثبیت شده، اشاره کرد (بالاسینگام^۲ و همکاران، ۱۹۷۲؛ یوکت^۳ و همکاران، ۱۹۷۵). همچنین در این دوره بود که برای اولین بار آنزیم‌های تثبیت شده به عنوان دارو مورد استفاده قرار گرفتند (بلچتز^۴ و همکاران، ۱۹۷۷).

❖ ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ (مرحله پسا توسعه)

این دوره بیشتر روی طراحی آنزیم‌های تثبیت شده با قابلیت انتخاب گری و اختصاصی بودن بسیار بالا به منظور افزایش کارایی آن‌ها در همه بخش‌های پزشکی، کشاورزی، محیط زیست و صنعت فوکوس داشت. هدف اصلی این گونه فرایندها جایگزین کردن فرایندهای شیمیایی با معایب زیاد به وسیله فرایندهای آنزیمی بوده است. آنزیم‌های بسیاری با قابلیت فعالیت و پایداری در دامنه وسیعی از حلال‌های آلی مورد بررسی قرار گرفتند. بعلاوه تکنیک‌های تثبیت مختلفی برای حذف اثر حامل روی رفتار آنزیم تثبیت شده مورد مطالعه قرار گرفت. از مهم‌ترین دستاوردهای این دوره می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- تولید گاز هیدروژن از آب با استفاده از کلروپلاست‌های حاوی آنزیم دهیدروژناز تثبیت شده روی شبکه نایلونی و فولاد ضدزنگ با استفاده از کلیسم آلزینات در حضور نور خورشید (گیسبای و هال،^۵ ۱۹۸۰)؛
- استفاده از روش تثبیت برای تعدادی از آنزیم‌های دارای کاربرد پزشکی مانند گلوکز اکسیداز^۶، گلوکز پراکسیداز^۷، اوروکیناز^۸ روی غشای نازکی در داخل لوله‌های پلی وینیل کلریدی^۹ و یا روی فیلم‌های پلی اتیلنی^{۱۰} به استفاده از پلیمریزاسیون تحریک شده به وسیله پرتو در دمای ۷۸- درجه سلسیوس (کاتسو^{۱۱} و همکاران، ۱۹۸۰)؛

¹ Glucose isomerase

² Balasingham

³ Yokote

⁴ Belchetz

⁵ Gisby and Hall

⁶ Glucose oxidase

⁷ Glucose peroxidase

⁸ Urokinase

⁹ Polyvinyl chloride

¹⁰ Polyethylene

¹¹ Kaetsu

- استفاده از تثبیت برای مطالعات ساختاری پروتئین‌ها و آنزیم‌ها. این فرایند شامل تثبیت آنزیم به وسیله سیستم‌تئیل^۱ روی حامل‌های غیر محلول و به دنبال آن پروتئولیز با استفاده از سیستم‌تئین پروتئاز^۲ بود (آمارانت و بوهاک،^۳ ۱۹۸۱)؛
- تولید آسپارتیک اسید با استفاده از تثبیت آسپارتاز^۴ حاصل از *اشریشیا کولی*^۵ (وود و کالتن،^۶ ۱۹۸۴)؛
- استفاده از مواد مغناطیسی به عنوان حامل برای تثبیت آنزیم (تورچیلین^۷ و همکاران، ۱۹۸۵)؛
- استفاده از بیوراکتور حاوی ترمولایزین^۸ تثبیت شده برای تولید آسپارتام^۹ در مقیاس بالا (ناکانیشی^{۱۰} و همکاران، ۱۹۸۵)؛
- استفاده از هپاریناز^{۱۱} تثبیت شده در یک بیوراکتور به منظور انجام همودیالیز^{۱۲} یک گوسفند به وسیله مدار خارج از بدن (برنستین^{۱۳} و همکاران، ۱۹۸۷). هپاریناز آنزیمی است که با شکستن هپارین سبب انعقاد خون می شود؛
- تثبیت هم‌زمان آنزیم‌های متابولیز کننده مختلف به منظور استفاده در متابولیسم دارو، سنتز متابولیت‌های زینوبیوتیک^{۱۴} و سم‌زدایی‌های خارج از بدن. همچنین این روش به منظور پیش‌بینی مسیرهای متابولیکی وابسته به گونه‌ها، مورد استفاده قرار گرفت (دولیک و فنسلاو،^{۱۵} ۱۹۸۸).

¹ Cysteinyll² Cysteine protease³ Amarant and Bohak⁴ Aspartase⁵ *Escherichia coli*⁶ Wood and Calton⁷ Torchilin⁸ Thermolysin⁹ Aspartame¹⁰ Nakanishi¹¹ Heparinase¹² Hemodialysis¹³ Bernstein¹⁴ Xenobiotic¹⁵ Dulik and Fenselau

۱-۳-۳- پس از سال ۱۹۹۰ (طراحی منطقی آنزیم‌های تثبیت‌شده)

در این دوره تکنیک‌های تثبیت پیشرفته‌ای مورد استفاده قرار گرفتند که نه تنها سبب شدند آنزیم‌های تثبیت‌شده دارای توانایی کاتالیزوری تقریباً مشابه با آنزیم آزاد باشند بلکه از پایداری بسیار مناسبی نیز برخوردار بوده‌اند. در تحقیقات انجام‌شده در این دوره بیشتر تأکید روی آنزیم‌های تثبیت‌شده بسیار پایدار با خصوصیات هندسی دلخواه از نظر شکل، اندازه و طول بوده که در نتیجه آن‌ها را برای کاربرد در صنایع مختلف مناسب ساخته است. مهم‌ترین دستاورد این دوره، توسعه بلوره‌های آنزیمی کراس لینک شده (CLEC)^۱ می‌باشد که توانایی کاتالیزوری در محیط‌های غیرآبی و یا حتی در محیط‌های آلی آبی را در شرایط سخت دارا می‌باشند. نتایج این قبیل تحقیقات نشان دادند که تثبیت آنزیم را می‌توان حتی بدون حضور حامل انجام داد به‌طوری‌که بلوره‌های به‌دست‌آمده دارای پایداری و انتخاب‌گری بالایی برای استفاده در واکنش‌های مختلف باشند. از دیگر دستاوردهای مهم این دوره می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- استفاده از یک روش ارزان برای شناسایی سرولوژیک عفونت‌های ویروس اچ‌آی‌وی^۲ به‌وسیله تثبیت گلیکوپروتئین‌های پوشش اچ‌آی‌وی-۱ در چاهک‌های میکروتیتر پوشش داده‌شده با کنکاناوالین A (ConA)^۳ (رابینسون^۴ و همکاران، ۱۹۹۰)؛
- تثبیت پروتئین‌های مختلف روی سطح طلای اصلاح‌شده با کربوکسی‌متیل‌دکستران^۵ (جانسون^۶ و همکاران، ۱۹۹۱)؛
- ساخت بیوسنسور گلوکز با استفاده از تثبیت گلوکز اکسیداز در جهت مناسب بر اساس ساختار سه‌بعدی آن (آلوارز-ایسازا^۷ و همکاران، ۱۹۹۵)؛

^۱ Cross linked enzyme crystals

^۲ HIV

^۳ Concanavalin A

^۴ Robinson

^۵ Carboxymethyl dextran

^۶ Johnsson

^۷ Alvarez-Icaza

- تثبیت موفق آمیز پروکسیداز ترب کوهی روی مواد مغناطیسی که سبب افزایش چهل درصدی توانایی تصفیه همراه با قابلیت حذف آلوده کننده هایی مانند کلروفنل ها^۱، دی کلروفنل ها، تری کلروفنل ها، تتراکلروفنل ها و پنتا کلروفنل های موجود در فاضلاب بوده است (تاتسومی^۲ و همکاران، ۱۹۹۶)؛
- تثبیت کاتالاز حاصل از گونه های پنی سیلیوم^۳ روی فیبرهای مشتق شده از سلولزتری استات، کلرین، پلی سولفون و استفاده از آن ها برای تصفیه آب (نازارو^۴ و همکاران، ۱۹۹۸)؛
- در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار فرایند تثبیت بدون هیچ حاملی با روش تجمع آنزیم ها (پنی سیلیوم جی آسیلاز) در کنار هم با استفاده از اتصال عرضی انجام شد (کاو^۵ و همکاران، ۲۰۰۰)؛
- تثبیت کاتالاز گونه های باسیلوس^۶ به وسیله گلو تار آلدهید روی آلومینیوم سیلانی شده و استفاده از آن برای تصفیه پساب مرحله رنگ بری پارچه (کاستا^۷ و همکاران، ۲۰۰۱)؛
- تثبیت لاکاز^۸ روی مونتموریلونیت^۹ و استفاده از آن برای بازسازی خاک های آلوده به ۲،۴- دی کلروفنل (آهن^{۱۰} و همکاران، ۲۰۰۲)؛
- استفاده از ترکیبات نانو (نانوذرات و نانوفیبرها) برای تثبیت با کاهش حداقلی در فعالیت آنزیم ها (کیم^{۱۱} و همکاران، ۲۰۰۶)؛
- تثبیت فاکتور مهار سرطان خون^{۱۲} حاضر در سلول های بنیادی جنینی موش روی فیلم نازک کوپلیمری مالئیک انهیدرید^{۱۳} (آلبرتی^{۱۴} و همکاران، ۲۰۰۸)؛

¹ Chlorophenols

² Tatsumi

³ *Penicillium*

⁴ Nazarov

⁵ Cao

⁶ *Bacillus*

⁷ Costa

⁸ Laccase

⁹ Montmorillonite

¹⁰ Ahn

¹¹ Kim

¹² Leukemia inhibitory factor (LIF)

¹³ Maleic anhydride

¹⁴ Alberti

- تثبیت لیپاز روی ماترکس پلیمری متخلخل حاوی گروه‌های آلدئیدی فعال برای تولید متیل استرها ی اسید چرب (دایزگ^۱ و همکاران، ۲۰۰۹)؛
- آنزیم‌های تریپسین به‌طور مؤثری روی پلی استایرن سولفونات با روش جذبی تثبیت شدند و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که انجام فرایندهای پروتئولایزیس به‌وسیله تکنولوژی تثبیت بسیار کارآمد خواهد بود (زو^۲ و همکاران، ۲۰۱۰)؛
- آنزیم متالوپروتئیناز^۳ روی سیلیکای فعال‌شده به‌وسیله اپوکسی^۴ تثبیت شد و از آن به‌صورت مداوم در بیوراکتور برای غربالگری داروهای مورد استفاده برای درمان بیماری‌های قلبی، مولتیپل اسکلروزیس^۵، آرتروز^۶ و سایر بیماری‌های التهابی استفاده شد (مازینی^۷ و همکاران، ۲۰۱۱)؛
- آزمایش‌های جدید تشخیصی برای بررسی سطح آسپاراژین^۸ در بیماران مبتلا به سرطان لنفوبلاستیک^۹ حاد با استفاده از تثبیت آنزیم ال-آسپاراژیناز^{۱۰} ایجاد شدند (کومار^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۳)؛
- حامل‌های جدیدی برای تثبیت مولکول‌های زیستی مختلف مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها با کاربرد در تمامی علوم مورد بررسی قرار گرفتند که در آن می‌توان به تثبیت توانی DNA روی نانوذرات طلا اشاره کرد (رولیم^{۱۲} و همکاران، ۲۰۱۵)؛
- از مدل‌سازی کامپیوتری برای غربالگری ماتریکس‌های مختلف به‌منظور تثبیت آنزیم اینولیناز استفاده شد (هولیواکا^{۱۳} و همکاران، ۲۰۱۶)؛

¹ Dizge² Xu³ Metalloproteinase⁴ Epoxy⁵ Multiple sclerosis (MS)⁶ Osteoarthritis⁷ Mazzini⁸ Asparagine⁹ Lymphoblastic¹⁰ L-asparaginase¹¹ Kumar¹² Rolim¹³ Holyavka

۱-۳-۲- روش های تثبیت آنزیم

۱-۳-۲-۱- جذب فیزیکی

جذب فیزیکی^۱ یکی از قدیمی ترین و ساده ترین روش ها با ظرفیت بالای تثبیت سازی می باشد. جذب عبارت است از چسبیدن آنزیم ها به یک منطقه از سطح حامل که وابسته به نیروهای واندروالسی، یونیک، پیوندهای هیدروژنی و همچنین فعل و انفعالات هیدروفوبیک می باشد (شکل ۱-۳) (تانگراج^۲ و همکاران، ۲۰۱۵؛ احمد و سردار، ۲۰۱۵). این نیروها به صورت هم زمان بر اساس ساختار آنزیم های تثبیت شونده عمل می کنند.

روش جذب در تثبیت آنزیم دارای مزایای ویژه ای است که از آن می توان به شرایط آماده سازی آسان و ملایم، هزینه پایین، عدم حضور افزودنی های شیمیایی بخصوص اتصال دهنده های عرضی، ظرفیت بالای تثبیت، و قابلیت استفاده مجدد اشاره کرد (ژانگ^۴ و همکاران، ۲۰۱۰). این روش بیشتر در فرایندهایی با مقیاس بالا بخصوص زمانی که آنزیم مورد استفاده در دسترس و ارزان باشد، استفاده می شود (برادی و جردن، ۲۰۰۹). در این روش به دلیل فعل و انفعالات کافی، معمولاً مولکول های آنزیم دست نخورده باقی می ماند (گوسان، ۲۰۰۶).

۱-۳-۲-۲- حبس غشایی

حبس غشایی^۷ یا کپسوله کردن^۸ فرایندی است که در آن آنزیم ها را در غشاهای کروی نیمه تراوا با نفوذپذیری کنترل شده به دام می اندازند (شکل ۱-۳) (نودویک^۹ و همکاران، ۲۰۱۱). در این سیستم، غشا مانع خروج آنزیم ها شده اما اجازه عبور آزادانه محصولات را می دهد (پرازرس و کابرال، ۱۹۹۴^{۱۰}).

¹ Physical adsorption

² Thangaraj

³ Ahmad and Sardar

⁴ Zhang

⁵ Brady and Jordaen

⁶ Guisan

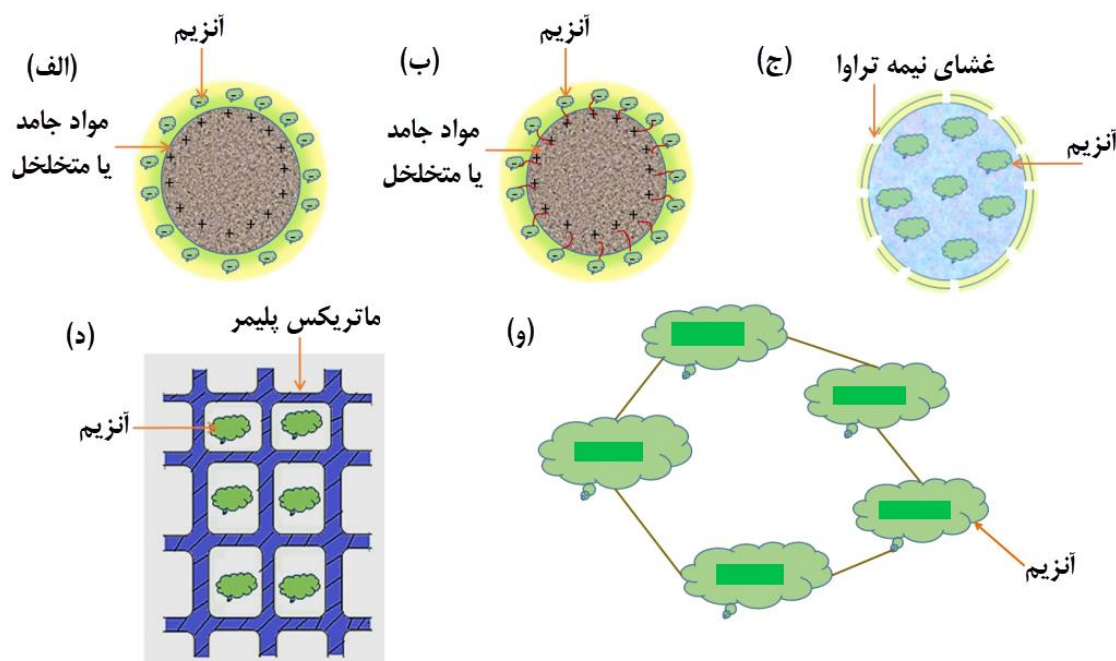
⁷ Membrane confinement

⁸ Encapsulation

⁹ Nedovic

¹⁰ Prazeres and Cabral

غشاهای فیبری که به صورت تجاری در دسترس می باشند دارای سطح ویژه بالایی هستند (بالاتر از بیست مترمربع بر لیتر) و از آن ها می توان برای ترکیباتی با وزن مولکولی کمتر از آنزیم استفاده نمود. در این روش آنزیم ها در قطرات کوچک متصل به غشا یا لیپوزوم ها^۱ تجمع می یابند. از جمله غشاهایی که به فراوانی برای کپسوله کردن آنزیم ها مورد استفاده قرار می گیرند می تواند به نایلون، سلولز نیترات، سلولز استات، رزین های اپوکسی، کلاژن، پلی-سولفون ها، پلی اکریلات ها و پلی کربنات ها اشاره کرد (گوپسان، ۲۰۰۶).



شکل ۱-۳- روش های تثبیت آنزیم: (الف) جذب غیر کووالانسی آنزیم یا یک ذره نامحلول؛ (ب) تثبیت کووالانسی آنزیم روی یک ذره نامحلول؛ (ج) حبس آنزیم در یک غشای نیمه تراوا؛ (د) به دام انداختن آنزیم در یک شبکه پلیمری؛ (و) اتصال عرضی بین مولکولی بین مولکول های آنزیم

¹ Liposomes

۱-۳-۲-۳- به دام انداختن

در روش به دام انداختن،^۱ آنزیم‌ها در داخل یک شبکه پلیمری و یا غشا به دام می‌افتد به طوری که آنزیم‌ها ثابت باقی می‌مانند اما سوبسترا به راحتی در شبکه مذکور نفوذ می‌کند. به دام انداختن از روش‌های اتصال کووالانسی و اتصال عرضی متفاوت است زیرا که آن ماتریکس ژل یا غشا باند تشکیل نمی‌دهند (بیکرستاف،^۲ ۱۹۹۷). این روش ممکن است موجب از دست رفتن فعالیت آنزیم شود بنابراین اصلاح تخلخل پلیمر، ساختار شبکه، عملکرد سطح و اندازه ذرات در این روش ضروری است (شلدان و پلت،^۳ ۲۰۱۳). این روش با جلوگیری از تماس مستقیم آنزیم با محیط از آن محافظت می‌کند. همچنین از آنزیم در مقابل تنش مکانیکی و حلال‌های آب‌گریز محافظت کرده و در نتیجه تداخل حباب‌های گاز را به حداقل می‌رساند. از مهم‌ترین معایب این روش می‌توان به محدودیت انتقال جرم و ظرفیت پایین تثبیت‌سازی آنزیم اشاره کرد (لالوند و مارگولین،^۴ ۲۰۰۲). در نهایت می‌توان بیان داشت که روش به دام انداختن بخصوص زمانی که کلسیم آلژینات^۵ به عنوان بستر مورد استفاده قرار می‌گیرد، بسیار مناسب برای تثبیت سلول‌های میکروبی، حیوانی و گیاهی می‌باشد.

۱-۳-۲-۴- اتصال عرضی^۶

تثبیت به وسیله اتصال عرضی بین مولکولی^۷ پروتئین با مولکول‌های پروتئینی دیگر و یا با گروه‌های عملکردی یک ماتریکس غیر محلول در شکل ۱-۳ نشان داده شده است. اتصال عرضی بین مولکولی یک آنزیم به وسیله روش‌های شیمیایی و فیزیکی موجب ایجاد ساختار سه بعدی خاصی می‌شود (الناشار،^۸ ۲۰۱۱؛ زی^۹ و همکاران،

¹ Entrapment

² Bickerstaff

³ Sheldon and Pelt

⁴ Lalonde and Margolin

⁵ Calcium alginate

⁶ Cross-linking

⁷ Intermolecular cross-linking

⁸ Elnashar

⁹ Xie

۲۰۰۹). این روش کاملاً به معرف‌های کوپلینگ^۱ برای اتصال عرضی بین مولکول‌های آنزیم وابسته است. از مهم‌ترین معرف‌های کوپلینگ می‌توان به پلی‌آمین‌ها، پلی‌اتیلن‌ایمین‌ها، پلی‌استایرن سولفونات‌ها و فسفات‌ها اشاره کرد. از نظر شیمیایی اتصال عرضی شامل اتصال کووالانسی آنزیم‌ها به یکدیگر با استفاده از یک اتصال‌دهنده عرضی مانند گلو تار آلدهید^۲ و تولوئن دی ایزوسیانات^۳ می‌باشد (الناشار، ۲۰۱۱).

۱-۳-۲-۵- اتصال کووالانسی

تثبیت آنزیم‌ها به یک حامل جامد به وسیله اتصال کووالانسی به دلیل اتصال قوی بین آنزیم و حامل غیرقابل برگشت است که این موجب بهبود پایداری آنزیم‌ها می‌شود (تانگراج و همکاران، ۲۰۱۵؛ احمد و سردار، ۲۰۱۵). در این نوع اتصال الکترون‌ها بین گروه‌های عاملی آمین مولکول آنزیم و سطح ساپورت^۴ یا حامل^۵ به اشتراک گذاشته می‌شود (شکل ۱-۳) (گویسان، ۲۰۰۶). در این روش، باندهای کووالانسی از رهائش آنزیم از سطح حامل حتی در شرایط واکنش سخت نیز جلوگیری می‌کند (گارسیا^۶ و همکاران، ۱۹۸۹). چندین توالی واکنش وجود دارد که اتصال آنزیم را روی یک ساپورت با اتصال کووالانسی امکان‌پذیر می‌کند که از آن می‌توان به اتصال ایزو اوره^۷، اتصال دیازو^۸، باند پپتیدی^۹ و یا آلکیلاسیون^{۱۰} اشاره کرد. در این روش مولکول‌های آنزیم با تشکیل شیف‌باز^{۱۱}، که از واکنش بین گروه‌های عاملی (آمین‌ها) آمینواسیدهای آنزیم با یک گروه فعال سطح ساپورت ایجاد می‌شود، تثبیت می‌شوند (الناشار، ۲۰۱۱). به هر حال این روش نیز معایبی دارد که از آن می‌توان به کاهش فعالیت آنزیم

¹ Coupling reagents

² Glutaraldehyde

³ Toluene diisocyanate

⁴ Support

⁵ Carrier

⁶ Garcia

⁷ Iso-urea

⁸ Diazo

⁹ Peptide

¹⁰ Alkylation

¹¹ Schiff base

به وسیله تثبیت و همچنین سمیت اتصال دهنده های عرضی اشاره کرد (ژنگ^۱ و همکاران، ۲۰۱۲). فهرستی از مزایا و معایب روش های مختلف تثبیت در جدول ۱-۳ آورده شده است.

جدول ۱-۳- مزایا و معایب روش های مختلف تثبیت آنزیم (تانگراج و سالامون، ۲۰۱۹)

روش های تثبیت	مزایا	معایب
جذب فیزیکی	بدون اثر یا اثر کم روی ساختار آنزیم بدون محدودیت انتشار در منافذ ساده و ارزان بدون نیاز به اتصال دهنده عرضی تخریب کمتر آنزیم نسبت به روش های شیمیایی کاربرد گسترده ظرفیت بالای تثبیت	احتمال بالای رهائش آنزیم از حامل
اتصال عرضی	روش ساده با تخریب کم آنزیم قابل کاربرد در تلفیق با روش های دیگر رهائش پایین آنزیم کاربرد گسترده	احتمال بالای تغییر در جایگاه فعال آنزیم
به دام انداختن	اثر ناچیز روی فعالیت آنزیم انجام فرایند در شرایط ملایم تغییر اندک ساختار فضایی آنزیم رهائش پایین آنزیم کاربرد گسترده	روشی پیچیده امکان بالای رهائش آنزیم مقاومت در برابر انتقال جرم سوبسترا و محصول عدم نفوذ عمیق سوبسترا
کپسوله کردن	روشی ساده برای تثبیت آنزیم ظرفیت بالای تثبیت آنزیم رهائش پایین آنزیم ها کاربرد بسیار گسترده	محدودیت در اندازه منافذ. تنها مولکول های کوچک می توانند از عرض غشا عبور نمایند
اتصال کووالانسی	اتصال شیمیایی بسیار قوی عدم رهائش آنزیم روش ساده، ملایم، غیر قابل برگشت با کاربردهای تخصصی	احتمال تغییر ساختار آنزیم طی فرایند تثبیت ظرفیت پایین در تثبیت آنزیم

¹ Zheng

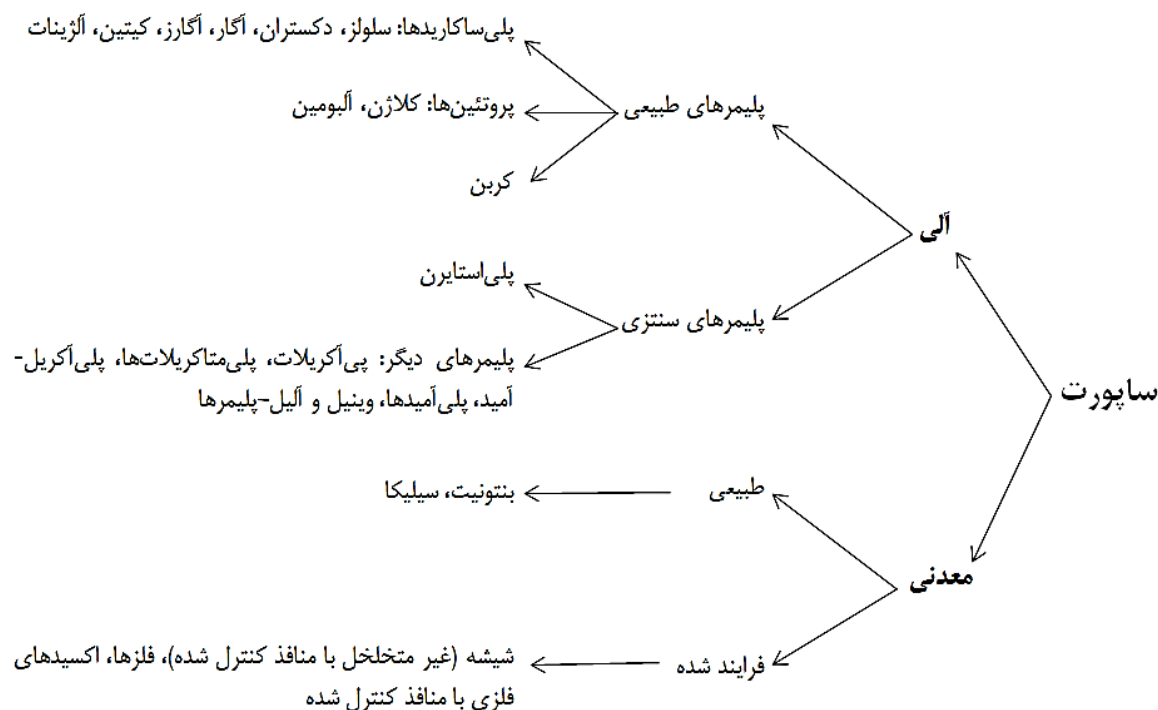
۱-۳-۳- ساپورت یا حامل

خصوصیات ماتریکس‌ها از اهمیت ویژه‌ای در تعیین عملکرد سیستم‌های آنزیم‌های تثبیت‌شده برخوردار هستند. از خصوصیات یک ساپورت ایده آل می‌توان به مقاومت فیزیکی در مقابل فشردگی، آبدوستی، حداقل تأثیر روی فعالیت آنزیم تثبیت‌شده، سادگی تولید، سازگاری با محیط زیست، مقاومت به حملات میکروبی و ارزان بودن اشاره کرد (تریوان،^۱ ۱۹۸۰؛ برودیلوس و موسباچ،^۲ ۱۹۸۷؛ بوچلز و کلین،^۳ ۱۹۸۷؛ خان و الزهیری،^۴ ۲۰۱۰). به‌هرحال، حتی اگر تثبیت روی ساپورت‌های جامد یک تکنولوژی باشد، اما هنوز قوانین کلی برای انتخاب بهترین ساپورت برای تمامی کاربردها وجود ندارد.

به‌طور کلی، ساپورت‌ها را با توجه به ترکیبات شیمیایی آن‌ها می‌توان به دو دسته کلی آلی و معدنی طبقه‌بندی نمود (شکل ۱-۴). ساپورت‌های آلی را نیز می‌تواند به دو زیردسته پلیمرهای طبیعی و سنتزی تقسیم کرد (کابرال و کندی،^۵ ۱۹۹۱).

خصوصیات فیزیکی ماتریکس‌ها شامل قطر ذرات، میزان قابلیت تورم،^۶ مقاومت فیزیکی و عکس‌العمل به فشار از اهمیت ویژه‌ای برای عملکرد سیستم‌های تثبیت و همچنین تعیین نوع راکتور انتخابی (تانک‌های دارای همزن،^۷ راکتور بستر سیال^۸ و یا راکتور بستر ثابت^۹) برای یک فرایند برخوردار است. به‌طور کلی، میزان تخلخل و اندازه ذرات تعیین‌کننده سطح در دسترس بوده و بنابراین نقش اساسی را در ظرفیت تثبیت آنزیم دارند (گمینر،^{۱۰} ۱۹۹۲).

¹ Trevan² Brodelius and Mosbach³ Buchholz and Klein⁴ Khan and Alzohairy⁵ Cabral and Kennedy⁶ Swelling⁷ Stirred tank⁸ Fluidized bed reactor⁹ Packed bed reactor¹⁰ Gemeiner



شکل ۱-۴- دسته‌بندی ساپورت‌ها

۱-۳-۳-۱- گلوله‌های شیشه‌ای

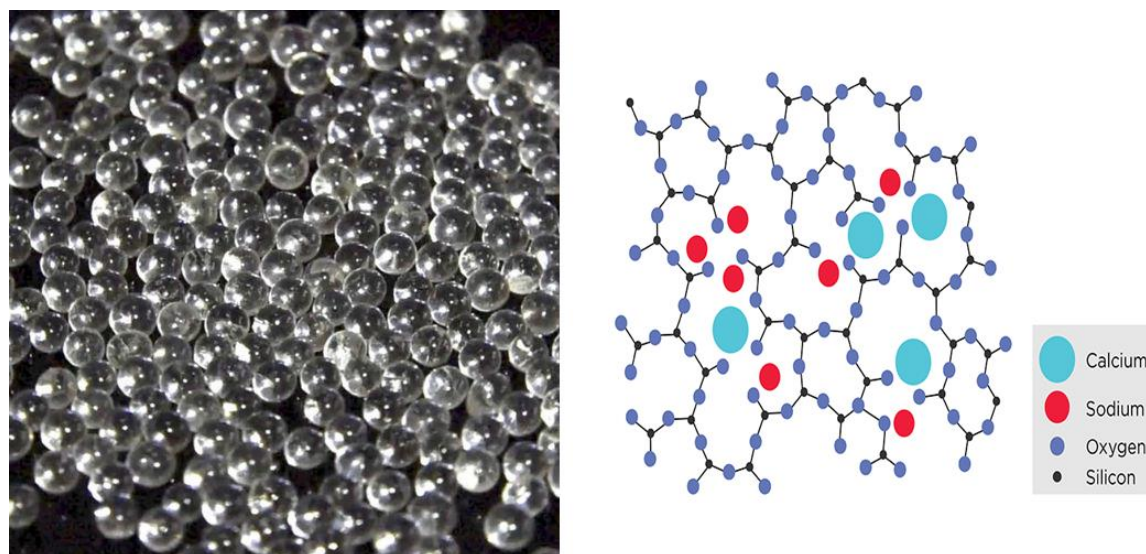
شیشه یک ماده غیر کریستالی، و اغلب یک جامد آمورف شفاف بوده که کاربرد گسترده علمی، فنی و زینتی دارد. معروف‌ترین و قدیمی‌ترین نوع آن شیشه سیلیکاتی بوده که از سیلیکا یا همان ماده پایه‌ای ماسه ساخته شده است. شیشه انواع مختلفی دارد که تفاوت آن‌ها عمدتاً در میزان ترکیبات سازنده است که از آن می‌توان به شیشه سیلیسی یا سیلیکاتی، شیشه سدیم بوروسیلیکات، شیشه بلور، شیشه آلومینوسیلیکات، شیشه اکسیدی و شیشه آهک سوددار اشاره کرد (شلبای،^۱ ۲۰۲۰).

شیشه آهک سوددار یا سودالایم^۲ مهم‌ترین شیشه تولیدی بوده که ۷۵ درصد شیشه‌های موجود در بازار را به خود اختصاص داده است. ترکیبات سازنده این شیشه شامل ۷۲ درصد سیلیس، ۱۴/۲ درصد اکسید سدیم، ۲/۵ درصد

¹ Shelby

² Soda-lime

اکسید منیزیم، ۱۰ درصد آهک یا اکسید کلسیم و ۰/۶ درصد اکسید آلومینیوم می باشد که پایداری حرارتی مناسبی دارد (شلبای، ۲۰۲۰). ظاهر و ساختار شیمیایی گلوله های شیشه ای سودالایمی در شکل ۱-۵ نشان داده شده است.



شکل ۱-۵- ظاهر و ساختار شیمیایی گلوله های شیشه ای سودالایمی

۱-۳-۳-۱- اصلاح سطح گلوله شیشه ای به وسیله ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان

آلکوکسی سیلان ها^۱ ترکیباتی هستند که به فراوانی به عنوان عامل اتصال^۲ برای چسبیدن مولکول های آلی به شیشه ها یا سیلیکون دی اکسیدها^۳ استفاده می شوند (کیم^۴ و همکاران، ۲۰۱۰). از مهم ترین آلکوکسی سیلان مورد استفاده به عنوان عامل اتصال می توان به ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) (شکل ۱-۶) اشاره کرد که امکان اتصال مولکول های دیگر را به سطح شیشه از طریق انتهای آمینی خود می دهد (پاسترناک^۵ و همکاران، ۲۰۰۸).

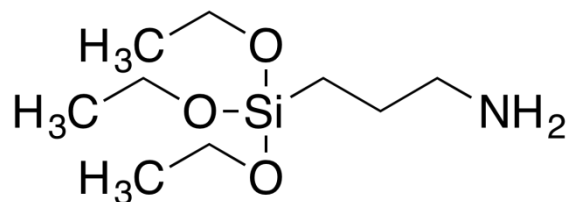
¹ Alkoxysilanes

² Coupling agents

³ Silicon dioxide

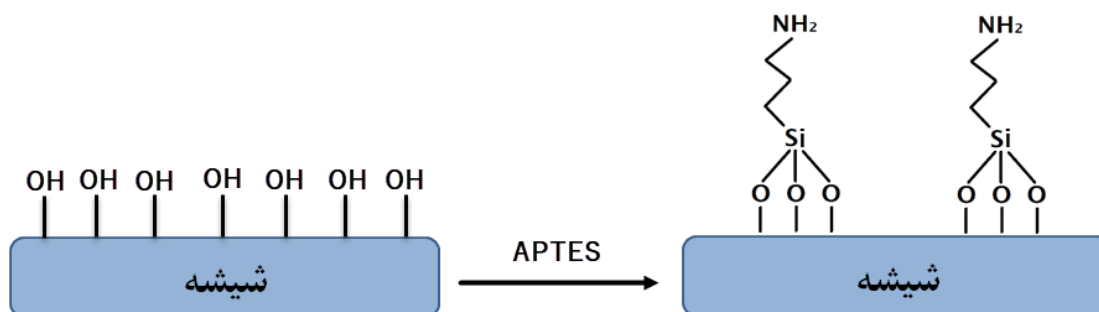
⁴ Kim

⁵ Pasternack



شکل ۱-۶- ساختار شیمیایی یک مولکول ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان

واژه سیلانی کردن اغلب به اتصال APTES به سطوح مختلف گفته می شود (کین^۱ و همکاران، ۲۰۰۷)، به طوری که این واکنش با هیدروکسیلاسیون^۲ اولیه شیشه شروع شده و با هیدرولیز گروه های اتوکسی APTES که با رها شدن یک گروه اتانول به ازای هر پیوند همراه است، ادامه می یابد که در نهایت منجر به تشکیل سطحی با انتهای آمینوپروپیلی می شود (شکل ۱-۷) (پاسترناک و همکاران، ۲۰۰۸).



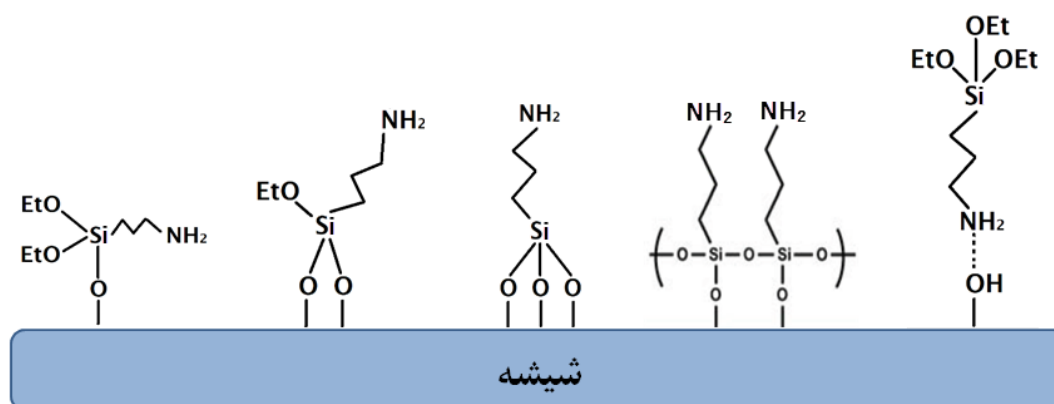
شکل ۱-۷- واکنش سیلانیلاسیون بین شیشه هیدروکسیله شده و مولکول های ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی - سیلان

به هر حال همان طور که در شکل ۱-۸ نشان داده شده است، APTES می تواند با جهت گیری های متفاوتی به سطح شیشه بچسبد که از آن می توان به واکنش تنها یک یا دو گروه اتوکسی با سطح شیشه و رها شدن به ترتیب یک یا دو مولکول اتانول، واکنش هر سه گروه اتوکسی با سطح شیشه و رها شدن سه مولکول اتانول، چسبیدن دو

¹ Qin

² Hydroxylation

گروه اتوکسی به سطح شیشه و اتصال عرضی بین گروه‌های اتوکسی باقیمانده از دو مولکول APTES و نهایتاً چسبیدن گروه NH_2 مولکول APTES به سطح شیشه اشاره کرد. در تمامی موارد فوق به جز مورد آخر یک انتهای آمینی ایجاد می‌شود که اجازه اتصال مولکول‌های دیگر را به شیشه می‌دهد. در مورد آخر نیز پیوند هیدروژنی درگیر ضعیف‌تر و در نتیجه شکستن آن و جهت‌گیری دوباره به شکل سایر موارد محتمل خواهد بود (اکرس^۱ و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل ۱-۸- جهت‌گیری‌های مختلف ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان برای اتصال به سطح شیشه

۱-۳-۴- اتصال دهنده عرضی

۱-۳-۴-۱- گلو تار آلدهید

گلو تار آلدهید (شکل ۱-۹) یکی از مشهورترین اتصال دهنده‌های عرضی است که به صورت تجاری در دسترس می‌باشد. اگرچه این ترکیب می‌تواند با گروه‌های عاملی مختلفی مانند تیول‌ها^۲، فنول‌ها^۳ و ایمیدازول‌ها^۴ واکنش دهد، اما مهم‌ترین کاربرد آن در واکنش با گروه‌های آمین پروتئین‌های مختلف است (باربوزا^۵ و همکاران، ۲۰۱۲).

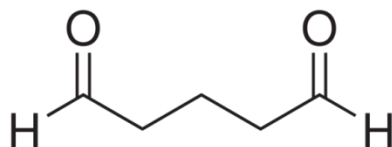
^۱ Acres

^۲ Thiols

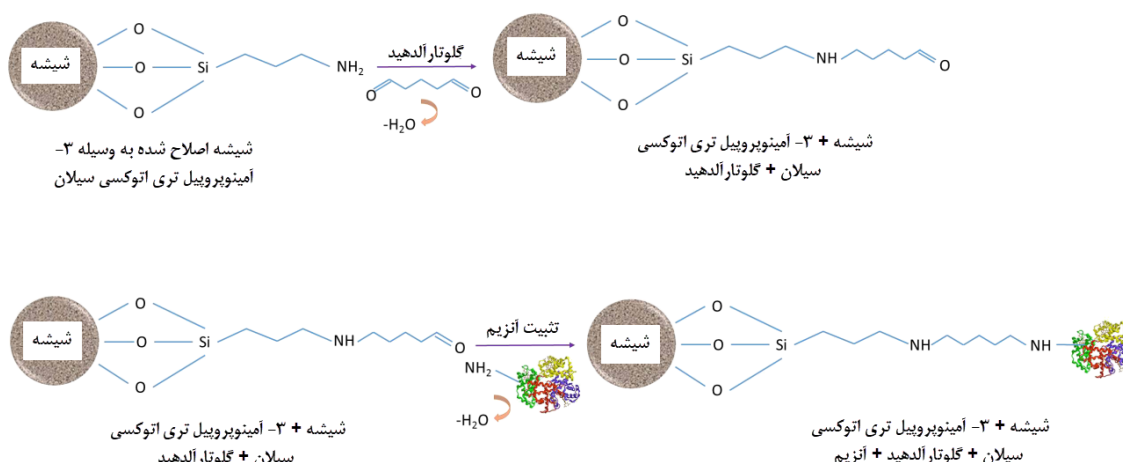
^۳ Phenols

^۴ Imidazoles

^۵ Barbosa



شکل ۱-۹- ساختار شیمیایی گلو تار آلدهید



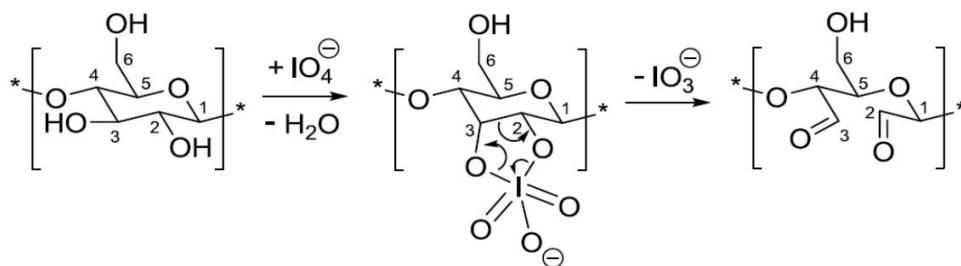
شکل ۱-۱۰- مکانیسم تثبیت آنزیم به وسیله گلو تار آلدهید روی سطح گلوله شیشه ای اصلاح شده به وسیله ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان

مکانیسم عمل گلو تار آلدهید بدین شکل است که به صورت یک لایه از طریق تشکیل شیف باز روی سطح حامل قرار می گیرد و بدین ترتیب سبب ایجاد گروه های آلدهیدی آزاد روی سطح شده که امکان اتصال کووالانسی آنزیم را فراهم می سازد (شکل ۱-۱۰) (زوکا و سانجاست،^۱ ۲۰۱۴). بهر حال، گلو تار آلدهید ترکیبی سمی و در نتیجه کاربرد آن در محصولات غذایی با محدودیت هایی همراه است. علاوه بر این، هر گلو تار آلدهید دو گروه آلدهیدی آزاد دارد و در نتیجه می تواند تنها یک آنزیم را تثبیت نماید. به همین دلایل، محققین به دنبال تولید اتصال دهنده های جدیدی هستند که نه تنها سلامت ماده غذایی را تحت تأثیر قرار ندهند بلکه دارای ظرفیت تثبیت بالاتری نیز باشند.

¹ Zucca and Sanjust

۱-۳-۴-۲- پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی

در سال‌های اخیر، پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی^۱ توجه زیادی را به عنوان اتصال دهنده‌های عرضی ایمن و با کارایی بالا به خود جلب کرده‌اند (گو^۲ و همکاران، ۲۰۱۴). پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی در واقع پلی ساکاریدهایی هستند که با اکسیداسیون جزئی دارای تعداد زیادی گروه‌های آلدهیدی آزاد می‌باشند. این اکسیداسیون جزئی معمولاً به وسیله مشتقات پریودات^۳ انجام می‌شود.



شکل ۱-۱۱- مکانیسم اکسیداسیون یک واحد قندی شش کربنه به وسیله پریودات

در واکنش اکسیداسیون پریودات، یون‌های این ترکیب (IO_4^-) منجر به شکسته شدن پیوند کربن - کربن (معمولاً کربن‌های ۲ و ۳) موجود در مونومرهای سازنده یک پلیمر و تشکیل گروه آلدهیدی آزاد می‌شوند (شکل ۱-۱۱). به هر حال، باید توجه شود که اگر میزان پریودات استفاده شده بیش از مقدار بهینه باشد ممکن است اکسیداسیون بیش از حد^۴ اتفاق افتاده و همی‌استال (در اثر واکنش بین گروه‌های آلدهیدی آزاد و گروه‌های هیدروکسیل مجاور) تشکیل شود (شکل ۱-۱۲) که در نهایت منجر به کاهش محتوای آلدهیدی پلی ساکاریدهای اصلاح شده می‌گردد (بورجسون^۵ و همکاران، ۲۰۱۸).

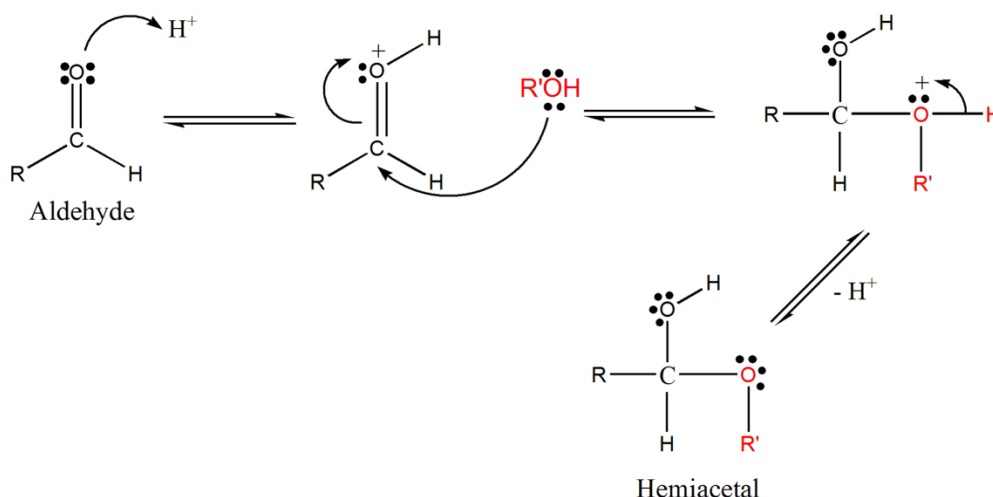
^۱ Polyaldehyde polysaccharides

^۲ Guo

^۳ Periodate

^۴ Over-oxidation

^۵ Börjesson



شکل ۱-۱۲- مکانیسم تشکیل همی استال در اثر واکنش یک گروه آلدهیدی آزاد با یک گروه هیدروکسیل چسبیده به کربن مجاور

از جمله پلی ساکاریدهایی که به نظر می رسد قابلیت بالقوه ای برای تبدیل شدن به اتصال دهنده عرضی دارند، پولولان و کفیران هستند.

پولولان^۱ پلی ساکاریدی خطی و محلول در آب بوده که به وسیله گونه های مختلف آئروبازیوم پولولانس^۲ تولید می شود (سینگ^۳ و همکاران، ۲۰۱۹). این اگزوپلی ساکارید^۴ از واحدهای مالتوتریوزی^۵ با پیوند داخلی آلفا- ۱ به ۴ تشکیل شده که خود این واحدهای سه گلوکزی مالتوتریوز توسط پیوندهای آلفا- ۱ به ۶ به هم متصل شده اند (حقیقت پناه^۶ و همکاران، ۲۰۲۰). به صورت تئوری، این پلی ساکارید را می توان با استفاده از اکسیداسیون پریدوات به یک اتصال دهنده عرضی با محتوای آلدهیدی بالا تبدیل نمود (شکل ۱-۱۳).

¹ Pullulan

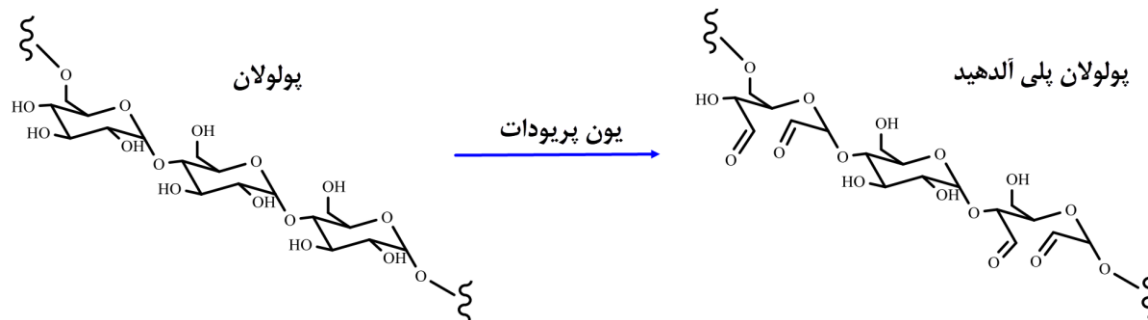
² *Aureobasidium pullulans*

³ Singh

⁴ Exopolysaccharide

⁵ Maltotriose

⁶ Haghighatpanah



شکل ۱-۱۳- مکانیسم اکسیداسیون جزئی پولولان به وسیله یون پریدوات و تبدیل آن به پولولان پلی آلدهید

کفیران^۱ یکی دیگر از آگزوپلی ساکاریدهای میکروبی بوده که کاربرد فراوانی در صنایع غذایی به عنوان یک ترکیب ایمن دارد. کفیران به عنوان یک آگزوپلی ساکارید شاخه دار محلول در آب تولید شده به وسیله گونه های مختلف لاکتوباسیلوس^۲ بخصوص لاکتوباسیلوس کفیرانوفایشنس^۳ از مقادیر برابری از دی-گلوکز^۴ و دی-گالاکتوز^۵ با پیوندهای گلیکوزیدی مختلف تشکیل شده است (سلمانیان^۶ و همکاران، ۲۰۱۹). بررسی های ساختاری نشان داده که کفیران از یک ستون اصلی ۱ به ۶-گلوکز، ۱ به ۳-گالاکتوز، ۱ به ۴-گالاکتوز، ۱ به ۴-گلوکز و ۱ به ۲، ۶-گالاکتوز^۷ تشکیل شده است که در آن شاخه ها به اکسیژن گروه های هیدروکسیل کربن های شماره دو گالاکتوزها متصل هستند (قاسملو^۷ و همکاران، ۲۰۱۲). در شکل ۱-۱۴، مکانیسم اکسیداسیون جزئی کفیران به وسیله سدیم پریدوات نشان داده شده است.

^۱ Kefiran

^۲ *Lactobacillus kefiranofaciens*

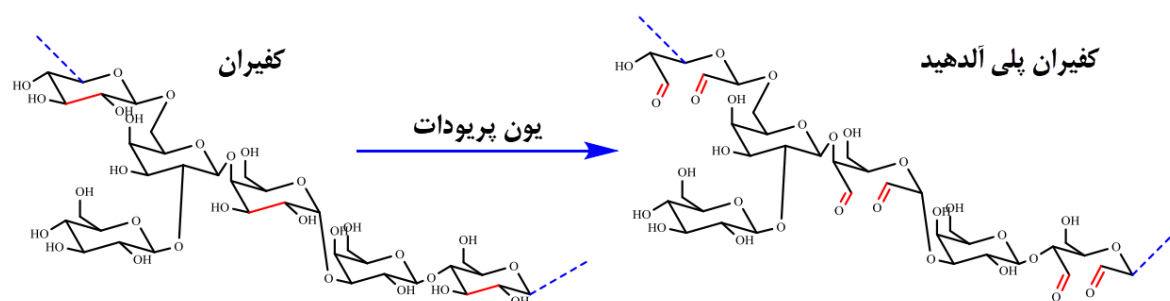
^۳ D-glucose

^۴ D-galactose

^۵ Salmanian

^۶ (1 → 6)-linked Glc, (1 → 3)-linked Gal, (1 → 4)-linked Gal, (1 → 4)-linked Glc and (1 → 2, 6)-linked Gal

^۷ Ghasemlou



شکل ۱-۱۴- مکانیسم اکسیداسیون جزئی کفیران به وسیله یون پریودات و تبدیل آن به کفیران پلی آلدئید

۱-۴- بیوراکتور بستر ثابت

بیوراکتور^۱ قلب هر نوع فرایند بیوشیمیایی بوده و بنابراین طراحی و ساخت بیوراکتور تاکنون به وسیله محققین مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. در مهندسی شیمی کلاسیک، عمومی ترین راکتور کاتالیزوری که به فراوانی مورد استفاده قرار می گیرد، بیوراکتور بستر ثابت^۲ بوده که سیستمی دوفازی است که در آن مخلوط واکنش به صورت مداوم در میان فاز ثابت در جریان است (آکپان^۳ و همکاران، ۲۰۰۷؛ موسی زاده^۴ و همکاران، ۲۰۱۳). مزیت اصلی انجام یک فرایند به وسیله آنزیم های تثبیت شده در بیوراکتور بستر ثابت نسبت به شکل آزاد این بوده که: (۱) انجام عملیات در بیوراکتور به صورت مداوم انجام می شود در حالی که در مورد آنزیم آزاد معمولاً فرایندها به صورت غیر مداوم می باشند؛ (۲) کنترل فرایند در بیوراکتور بسیار بهتر و ساده تر از روش غیر مداوم انجام می شود؛ (۳) استفاده از بیوراکتور سبب کاهش هزینه فرایند آنزیمی می شود؛ (۴) میزان مصرف آنزیم در روش مداوم بسیار کمتر از روش غیر مداوم (به وسیله آنزیم های آزاد) می باشد؛ (۵) جداسازی محصول از محیط واکنش در بیوراکتور بسیار ساده تر و با صرف هزینه کمتر می باشد؛ (۶) در روش مداوم امکان استفاده مجدد از آنزیم های تثبیت شده وجود دارد در حالی که در مورد آنزیم های آزاد این کار بسیار دشوار خواهد بود.

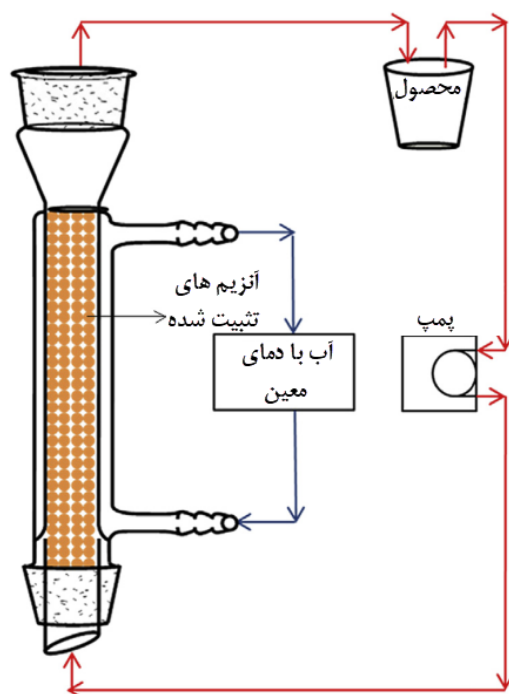
^۱ Bioreactor

^۲ Packed bed bioreactor

^۳ Akpan

^۴ Mousazadeh

به طور کلی، بیوراکتورها از یک یا چند استوانه از جنس شیشه یا استیل تشکیل شده که با ذرات کاتالیزوری در اندازه و شکل های مختلف پر شده اند. در شکل ۱-۱۵ یک نمونه از بیوراکتور بستر ثابت نشان داده شده است. استفاده از بیوراکتور بستر ثابت برای مقاصد آنزیمی یا میکروبی نسبت به سایر راکتورها مزایای فراوانی دارد که از آن می توان به سادگی عمل، کنترل بهتر کیفیت محصولات، انتقال جرم و نرخ واکنش بالا اشاره کرد (آراگون^۱ و همکاران، ۲۰۱۳؛ سانگیتا و آبراهام^۲، ۲۰۰۸؛ گراسووا^۳ و همکاران، ۲۰۰۷؛ وانگ و کاروسو^۴، ۲۰۰۵؛ دنکیک^۵ و همکاران، ۲۰۱۳؛ کیونگ و یوم^۶، ۲۰۱۴).



شکل ۱-۱۵- نمایش از یک بیوراکتور بستر ثابت استوانه ای

¹ Aragon

² Sangeetha and Abraham

³ Grosova

⁴ Wang and Caruso

⁵ Dencic

⁶ Kyeong and Yeom

۱-۵- آب انار و آب زرشک

آبمیوه مایعی است که به طور طبیعی از میوه یا سبزیجات طی فشردن یا خیساندن آن‌ها بدون استفاده از حرارت یا حلال تهیه می‌شود.

انار^۱ با نام علمی *Punica granatum* L. به عنوان میوه‌ای با خصوصیات سلامت بخشی بالا به فراوانی به صورت تازه یا آبمیوه مصرف می‌شود. آب انار غنی از ترکیبات باارزشی است که اثرات دارویی و عملکردی فراوانی به عنوان آنتی‌اکسیدان، ضد میکروب، ضد تومور و ضد دیابت دارد (ویودا-مارتوس^۲ و همکاران، ۲۰۱۰). تحقیقات نشان داده است که پوست انار غنی از پکتین بوده که در طی فرایند تولید آبمیوه وارد محصول شده و منجر به ایجاد کدورت نامناسب و رسوب در طول مدت نگهداری می‌شود (سرتی^۳ و همکاران، ۲۰۱۷) و بنابراین شفاف سازی آبمیوه تولیدی یک مرحله ضروری برای تولید یک محصول مشتری پسند است.

میوه زرشک^۴ با نام علمی *Berberis vulgaris* L. منبعی غنی از ترکیبات زیست فعال مانند کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها و پلی‌فنول‌ها بوده و بنابراین خصوصیات سلامت بخشی مختلفی را به عنوان آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان از خود نشان می‌دهد (علیزاده^۵ و همکاران، ۲۰۱۹). علاوه در طب سنتی، این میوه بخصوص آبمیوه تولیدی از آن کاربرد گسترده‌ای برای درمان کولیت^۶، التهاب مزمن، فشارخون بالا و مشکلات عصبی، قلبی و کبدی دارد (صراف^۷ و همکاران، ۲۰۱۹). با توجه همین خصوصیات سلامت بخشی، مصرف آب زرشک به عنوان یکی از آبمیوه‌های سلامت بخش بسیار توصیه می‌شود. آب زرشک نیز به مانند آب انار پس از تولید دارای کدورت بوده که در طی نگهداری سبب ایجاد رسوب می‌شود و بنابراین شفاف سازی آن امری ضروری است.

¹ Pomegranate

² Viuda-Martos

³ Cerreti

⁴ Barberry

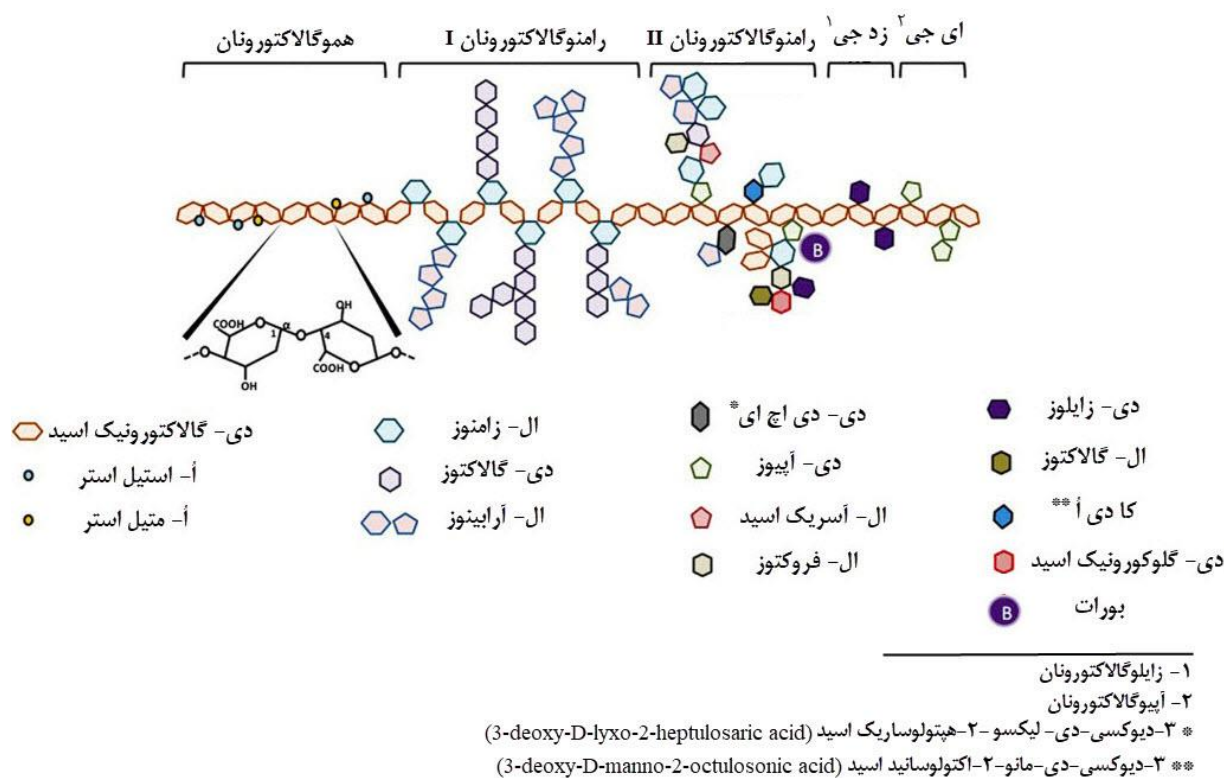
⁵ Alizadeh

⁶ Colitis

⁷ Sarraf

۱-۵-۱- شفاف سازی آبمیوه

به طور کلی، مهم ترین مراحل تولید آبمیوه شامل جداسازی میوه ها از شاخه و بررسی اولیه، شستشو، تولید آبمیوه، شفاف سازی^۱، فرایند حرارتی و بسته بندی می باشد. در میان مراحل گفته شده شفاف سازی، که از نظر تئوری به معنی حذف ترکیبات معلق ایجادکننده کدورت و رسوب در محصول نهایی می باشد، از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا که تأثیر معنی داری روی ظاهر، طعم و پذیرش مشتری دارد. عامل اصلی این کدورت و رسوب هیدروکلوئیدی به نام پکتین (شکل ۱-۱۶) بوده که پلیمری از آلفا- ۱ به ۴ گالاکتورونیک اسید است و حدود ۳۰ درصد دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می دهد (کاظمی^۲ و همکاران، ۲۰۲۰؛ عسگری^۳ و همکاران، ۲۰۲۰).



شکل ۱-۱۶- ساختار شیمیایی پکتین

¹ Clarification

² Kazemi

³ Asgari

پکتین در داخل آبمیوه شبکه‌ای پلیمری تشکیل می‌دهد که مواد معلق را در خود به دام انداخته و سبب ایجاد کدورت می‌گردد. همچنین در مدت‌زمان نگهداری این شبکه ضعیف شده و مواد معلق محصور را آزاد کرده که سبب ایجاد رسوب در آبمیوه می‌شود و بنابراین حذف آن ضروری است (حسینی^۱ و همکاران، ۲۰۱۹). در روش صنعتی متداول، فرایند حذف شبکه پکتینی و مواد معلق در آن به کمک ترکیبات رسوب‌دهنده‌ای مانند ژلاتین، بنتونیت و انواع غشاهای انجام می‌شود (شهرستانی^۲ و همکاران، ۲۰۱۶). به‌هرحال، در سال‌های اخیر، آنزیم‌ها به دلیل کارایی بالا، عمل کاملاً اختصاصی، عدم سمیت و عملکرد تحت شرایط ملایم جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند (گو^۳ و همکاران، ۲۰۱۲؛ دال ماگرو^۴ و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین با پیشرفت علم و آشنایی با مزایای روش‌های مداوم نسبت به غیر مداوم، به نظر می‌رسد تثبیت آنزیم و کاربرد آن در راکتورهای مختلف می‌تواند سبب بهبود فرایند شفاف‌سازی هم از نظر هزینه و هم از نظر کیفیت محصول نهایی شود که به‌عنوان یک فرایند نوین به‌وسیله محققین مختلف در سراسر جهان در حال بررسی است.

¹ Hosseini² Shahrestani³ Goh⁴ Dal Magro

۱-۶- اهداف پژوهش

اهداف پژوهش حاضر به صورت زیر بوده است:

- ❖ تولید پلی آلدهیدهای پولولان و کفیران و اندازه گیری محتوای آلدهیدی آنها؛
- ❖ استفاده از پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی تولید شده و همچنین گلوکار آلدهید برای تثبیت آنزیم پکتیناز روی گلوله های شیشه ای فعال شده به وسیله ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان؛
- ❖ بررسی عملکرد اتصال دهنده های عرضی مختلف برای تثبیت آنزیم روی گلوله های شیشه ای؛
- ❖ بررسی اثر تثبیت روی فعالیت آنزیم پکتیناز؛
- ❖ بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم های آزاد و تثبیت شده؛
- ❖ طراحی و ساخت یک بیوراکتور بستر ثابت به منظور انجام فرایند شفاف سازی مداوم آب انار و زرشک به وسیله آنزیم های تثبیت شده؛
- ❖ بررسی اثر شرایط فرایند روی فعالیت آنزیم های آزاد و تثبیت شده؛
- ❖ بررسی قابلیت استفاده مجدد از آنزیم های تثبیت شده؛
- ❖ بررسی اثر شفاف سازی غیر مداوم و مداوم به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، آنتی اکسیدانی و رنگی آبمیوه ها.

فصل دوم

مروری بر پژوهش‌های پیشین

فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های پیشین

۱-۲- مروری بر مطالعات در زمینه تثبیت آنزیم‌ها و استفاده از آن‌ها در فرایندهای غیر مداوم

اگرچه تاکنون در تحقیقات متعددی از تثبیت آنزیم‌ها برای اهداف مختلف استفاده شد، اما در این بخش سعی شده است که تنها به تحقیقاتی پرداخته شود که سبب درک بهتر پژوهش حاضر گردد.

گومز^۱ و همکاران (۲۰۰۶)، در تحقیقی به بررسی تثبیت آنزیم پراکسیداز^۲ روی گلوله‌های شیشه‌ای پرداختند. در این پژوهش، پراکسیدازهای سویا و ترب کوهی روی گلوله‌های شیشه‌ای فعال شده به وسیله سیلان و گلاتارآلدهید تثبیت شدند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت باقیمانده در پراکسیداز سویا و ترب کوهی پس از تثبیت به ترتیب ۷۴ و ۷۸ درصد بوده است و هر دو آنزیم تثبیت شده عملکرد قابل قبولی را در حذف فنول از محلول آبی در حضور هیدروژن پراکسید داشتند. همچنین بررسی پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده نشان داد که تثبیت آنزیم به‌طوری معنی‌داری سبب افزایش پایداری شده است. به هر حال، یافته نشان داد که پراکسیداز تثبیت شده ترب کوهی عملکرد بهتری را نسبت به پراکسیداز تثبیت شده سویا داشته است. نتایج کلی این تحقیق تأیید کرد که تثبیت کووالانسی آنزیم‌های پراکسیداز روی گلوله‌های شیشه‌ای می‌تواند روشی بالقوه برای افزایش پایداری این آنزیم‌ها باشد.

در سال ۲۰۰۷، وزیر کاهرمان^۳ و همکاران به بررسی تثبیت آنزیم آلفا آمیلاز^۴ روی گلوله‌های شیشه‌ای پرداختند. در این تحقیق، به منظور آمینی کردن سطح گلوله‌های شیشه‌ای از ۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان و در ادامه از فتالوئیل کلرید^۵ به عنوان اتصال دهنده عرضی استفاده شد و در نتیجه تثبیت آنزیم از طریق اتصال بین گروه‌های آمینی آنزیم و گروه‌های اسید کلرید سطح گلوله‌های شیشه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد که میزان تثبیت آنزیم روی گلوله‌های شیشه‌ای حدود ۲۵/۲ میلی گرم بر گرم بوده است. همچنین بررسی اثر پی‌اچ^۶ روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و

¹ Gomez

² Peroxidases

³ Vezir Kahraman

⁴ a-amylase

⁵ Phthaloyl chloride

⁶ pH

تثبیت شده نشان داد که با تثبیت آنزیم، بهینه فعالیت آن‌ها از پی‌اچ ۶/۵ به ۱ تغییر کرد. همچنین بررسی میزان پایداری آنزیم‌ها نشان داد که فرایند تثبیت موجب افزایش معنی‌دار پایداری آنزیم‌ها شده است به‌طوری‌که آنزیم‌های آزاد فعالیت خود را پس از ۱۵ روز نگهداری به‌طور کامل از دست دادند، درحالی‌که آنزیم‌های تثبیت شده ۸۰ درصد فعالیت خود را پس از ۲۵ روز نگهداری حفظ کردند. همچنین بررسی امکان استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده نشان داد که این آنزیم‌ها میزان ۹۸ درصد از فعالیت خود را پس از ۶ تکرار و میزان ۸۱/۴ درصد فعالیت خود را پس از ۲۵ تکرار حفظ کردند. در نهایت، این تحقیق نشان داد که تثبیت کووالانسی آنزیم آلفا-آمیلاز روی گلوله‌های شیشه‌ای روشی مناسب برای افزایش پایداری این آنزیم می‌باشد.

لادول^۱ و همکاران (۲۰۱۴)، در تحقیقی به تثبیت آنزیم تروپیزیم-P^۲ روی نانوذرات فعال شده با گروه‌های آمینو پرداختند. در این تحقیق، تروپیزیم-P به‌عنوان مخلوطی از آنزیم‌های پکتیناز به شکل موفقیت‌آمیزی روی نانوذرات آمینی شده با استفاده از گلو تار آلدهید تثبیت شد. بررسی‌ها نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات پس از تثبیت آنزیم برابر با ۸۰ نانومتر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که اگرچه تثبیت تأثیری روی پی‌اچ بهینه فعالیت آنزیم‌ها نداشت اما بهینه دما را به میزان ۵ درجه سلسیوس جابه‌جا کرد. همچنین بررسی پارامترهای سینتیکی نشان داد که حداکثر سرعت فعالیت آنزیم‌ها پس از تثبیت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. امکان استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده نشان داد که این آنزیم‌ها میزان ۸۵ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۶ سیکل واکنش حفظ کردند.

دالبیورا^۳ و همکاران (۲۰۱۸a)، آنزیم پکتیناز حاصل از *آسپرژیلوس/کولاتوس*^۴ را به روش به دام انداختن در بیدهای آلزینات تثبیت کردند. در این تحقیق، خصوصیات ترمودینامیکی آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که راندمان تثبیت آنزیم برابر با ۵۹/۷۱ درصد بوده است. همچنین این محققین نشان دادند که ثابت دناتوراسیون حرارتی مرتبه اول^۵ در آنزیم‌های تثبیت شده به‌طور معنی‌داری بالاتر از آنزیم‌های

¹ Ladole² Tropizyme-P³ de Oliveira⁴ *Aspergillus aculeatus*⁵ first-order thermal denaturation constant

آزاد بوده است و در نتیجه می توان بیان داشت که تثبیت آنزیم به روش مذکور می تواند سبب افزایش پایداری حرارتی پکتیناز شود.

در تحقیقی دیگر، عبدالوهاب^۱ و همکاران (۲۰۱۸)، تثبیت آنزیم پکتیناز روی ژل آلژینات-آگار^۲ را با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)^۳ بهینه سازی کردند. در این تحقیق آنزیم های پکتیناز به روش کوالانسی روی بیدهای ژل ساخته شده از آلژینات و آگار تثبیت شدند. متغیرهای این تحقیق شامل پلی اتیلن آمین^۴، گلو تار آلدهید، طول زمان تثبیت و واحدهای آنزیم بوده است. نتایج نشان داد که فرایند تثبیت سبب افزایش پایداری آنزیم ها شده است به طوری که آنزیم آزاد بیشترین فعالیت را در پی اچ ۵ داشته در حالی که آنزیم تثبیت شده در دامنه ۴/۵-۵/۵ دارای حداکثر فعالیت بوده اند. همچنین تثبیت آنزیم سبب تغییر بهینه دمای فعالیت از ۵۰ درجه سلسیوس در آنزیم آزاد به ۶۰ درجه سلسیوس در آنزیم تثبیت شده شد. نتایج بررسی ترمودینامیکی نشان داد که تثبیت پکتیناز سبب افزایش در آنتالپی و انرژی آزاد شد که این به دلیل افزایش پایداری آنزیم می باشد. از طرفی، بررسی امکان استفاده مجدد نشان داد که پکتینازهای تثبیت شده حدود ۶۰ درصد فعالیت خود را پس از ۸ سیکل فرایند حفظ کردند. این محققین بیان داشتند که فرمول ژل تولید شده در این پژوهش می تواند برای سایر آنزیم های صنعتی نیز به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گیرد.

دایی^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۸ به بررسی رفتار کاتالیزوری آنزیم پکتیناز تثبیت شده روی بیدهای کمپوزیتی سدیم آلژینات-گرافن اکسید^۶ پرداختند. در این تحقیق پکتینازها روی بیدهای سدیم آلژینات-گرافن اکسید به وسیله پیوندهای آمیدی با استفاده از ماده فعال کننده N، N'-دی سیکلوهگزیل کربودی ایمید/N-هیدروکسی سوکسین-ایمید^۷ تثبیت شده و شرایط تثبیت به وسیله طرح باکس-بنکن بهینه سازی گردید. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم

¹ Abdel Wahab

² Alginate-agar gel

³ Response surface methodology

⁴ Polyethyleneimine

⁵ Dai

⁶ Sodium alginate/graphene oxide composite beads

⁷ N,N'-dicyclohexylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide

تثبیت شده حدود ۸۵ درصد آنزیم آزاد و برابر با ۱۲۳۶/۸۶ یونیت^۱ بر گرم بوده است. همچنین نتایج نشان داد که تثبیت آنزیم سبب تغییر پی‌اچ بهینه فعالیت از ۴/۵ به ۴ و تغییر دمای بهینه فعالیت از ۵۰ به ۶۰ درجه سلسیوس شده است. همچنین یافته‌ها نشان داد که آنزیم‌های تثبیت شده دارای پایداری به مراتب بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد بوده‌اند. نتایج بررسی امکان استفاده مجدد آنزیم‌های تثبیت شده نشان داد که این آنزیم‌ها توانستند حدود ۷۳ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۶ سیکل آزمایش حفظ نمایند. در نهایت این محققین بیان کردند که این سیستم تثبیت آنزیم به دلیل خصوصیات قابل قبولی که دارد می‌تواند برای کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

دال ماگرو^۲ و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی به بررسی اثر تثبیت روی ترکیبات مغناطیسی بر خصوصیات آنزیم پکتیناز پرداختند. این محققین دو بیوکاتالیست مغناطیسی شامل آنزیم تثبیت شده روی ماده مغناطیسی (آهن (III) کلرید) بدون حضور گلو تار آلدهید و آنزیم کووالانسی تثبیت شده روی ماده مغناطیسی با استفاده از گلو تار آلدهید را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیوکاتالیست دوم دارای خصوصیات مغناطیسی بسیار بهتر و همچنین تخلخل بیشتری بوده است. همچنین بررسی پارامترهای سینتیکی^۳ نشان داد که ثابت میکائلیس-متن (K_m)^۴ در بیوکاتالیست دوم به طور معنی داری کمتر از بیوکاتالیست اول بوده است. در مقابل، نتایج نشان داد که بیوکاتالیست اول دارای پایداری حرارتی و قابلیت استفاده مجدد بیشتری نسبت به بیوکاتالیست دوم بوده است. در نهایت، این محققین بیان داشتند که استفاده از بیوکاتالیست‌های مغناطیسی می‌تواند سبب بهبود خصوصیات کاربردی پکتیناز گردد.

محمود^۵ و همکاران (۲۰۱۸)، از میکرو و نانو کپسوله کردن پکتیناز برای تثبیت استفاده کردند. در این تحقیق خصوصیات آنزیم‌های پکتیناز در حالت آزاد، میکرو و نانو کپسوله شده در سدیم آلزینات با یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان داد که آنزیم آزاد دارای پایداری کمی بوده‌اند به طوری که در دمای پاستوریزاسیون و همچنین در اسیدیته پایین

¹ Unit² Dal Magro³ Kinetic parameters⁴ Michaelis-menten constant⁵ Mahmoud

فعالیت بسیار کمی را از خود نشان دادند. بنابراین برای افزایش پایداری آنزیم از روش کپسولاسیون استفاده شد و نتایج به دست آمده از عکس‌های میکروسکوپ نوری عبوری (TEM)^۱ از وجود تخلخل بالا در سطح کپسول‌های سدیم آلژینات حکایت داشت که برای فعالیت آنزیم‌های تثبیت شده بسیار مفید است. نتایج کلی به دست آمده در این تحقیق نشان داد که پکتیناز کپسوله شده نه تنها به خوبی می‌تواند برای حذف پکتین مورد استفاده قرار گیرد بلکه سبب کاهش هزینه به دلیل امکان استفاده مجدد نیز می‌شود.

در تحقیقی دیگر، گور^۲ و همکاران (۲۰۱۸)، به بهینه‌سازی تثبیت هم‌زمان آنزیم‌های مختلف روی سدیم آلژینات و بیدهای کیتوزانی فعال شده با گلوکارآلدهید پرداختند. در این تحقیق از دو بستر مختلف شامل آلژینات و کیتوزان فعال شده با گلوکارآلدهید برای تثبیت هم‌زمان آلفا-آمیلاز، پروتئاز^۳ و پکتیناز استفاده شد. بدین منظور، ابتدا تثبیت آنزیم‌های مختلف روی سدیم آلژینات بهینه‌سازی شد و نتایج نشان داد که بهترین غلظت سدیم آلژینات و کلسیم کلرید در این روش به ترتیب برابر با ۲/۵ درصد و ۰/۱ مولار بوده است و در این شرایط نسبت آنزیم‌های تثبیت شده به ترتیب برابر با ۲، ۱ و ۰/۰۲ برای پکتیناز، پروتئاز و آلفا-آمیلاز بوده است. در مرحله بعد شرایط تثبیت آنزیم‌های مذکور روی بیدهای کیتوزانی فعال شده با گلوکارآلدهید بهینه شد و نتایج نشان داد که بهترین شرایط تثبیت در غلظت کیتوزان ۳ درصد و غلظت گلوکارآلدهید ۰/۲۵ درصد مدت زمان تثبیت ۳ ساعت به دست آمد. در حالی که تثبیت روی هر دو حامل به خوبی انجام شد اما فعالیت ویژه^۴ آنزیم‌های تثبیت شده روی بیدهای کیتوزانی فعال شده با گلوکارآلدهید به طور معنی داری بیشتر بوده است. همچنین این تحقیق نتایج ویژه‌ای را نیز به دنبال داشت و آن اینکه پکتیناز و آلفا-آمیلاز تثبیت شده روی بیدهای کیتوزانی فعال شده با گلوکارآلدهید دارای فعالیت ویژه بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد بودند.

¹ Transmission electron microscopy

² Gur

³ Protease

⁴ Specific activity

یانگ^۱ و همکاران (۲۰۱۹)، در تحقیقی به تثبیت همزمان پکتیناز و گلوکوامیلاز روی بیدهای سدیم آلزینات-گرافن اکسید با استفاده از ماده فعال کننده N، N'-دیسیکلو هگزیل کربودی ایمید/N-هیدروکسی سوکسین ایمید پرداختند. در این تحقیق، فرایند تثبیت همزمان پکتیناز و گلوکوامیلاز در پی‌اچ ۴، دمای ۴۰ درجه سلسیوس و زمان ۳۰ دقیقه انجام شد و نتایج نشان داد که پکتیناز و گلوکوامیلاز به ترتیب ۷۳/۸ و ۸۵/۲ درصد فعالیت خود را پس از تثبیت حفظ کرده و به ترتیب دارای فعالیتی برابر با ۱۲۲۷/۵ و ۱۰۲۷/۲ یونیت بر گرم بوده‌اند. همچنین نتایج نشان داد که پایداری هر دو آنزیم پس از تثبیت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و همچنین این دو آنزیم تثبیت‌شده حدود ۶۰ درصد فعالیت خود را پس از ۶ سیکل تکرار حفظ کردند.

نادار و راتود^۲ در سال ۲۰۱۹، در تحقیقی به تثبیت همزمان پکتیناز و سلولاز^۳ روی ذرات مغناطیسی به‌منظور استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از پوست میوه‌ها پرداختند. این محققین بیان داشتند که اصلی‌ترین عامل ممانعت از استخراج ترکیبات زیست فعال، ساختار پیچیده دیواره سلولی گیاهان بوده که از پلی‌ساکاریدهای مختلفی بخصوص پکتین و سلولز ساخته شده است و بنابراین با حذف این دو پلی‌ساکارید به‌وسیله آنزیم می‌توان تولید این ترکیبات را با نرخ و راندمان بیشتری انجام داد. در این تحقیق از ذرات مغناطیسی فعال شده به‌وسیله ترکیبات آمینی و به دنبال آن گلو تار آلدهید به‌عنوان ساپورت استفاده شد. نتایج نشان داد که تثبیت آنزیم موجب افزایش دو برابری پایداری حرارتی در دماهای بین ۵۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس شده است. همچنین آنزیم‌های تثبیت‌شده بیش از ۸۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۱۰ سیکل واکنش حفظ کردند. درنهایت از این آنزیم‌های تثبیت‌شده برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از پوست پرتقال، انبه و موز استفاده شد و نتایج نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدان تولیدشده از پوست میوه‌های مذکور به‌وسیله آنزیم‌های تثبیت‌شده دو برابر بیشتر از روش سنتی استخراج به‌وسیله حلال بوده است.

در تحقیقی دیگر، دال ماگرو و همکاران (۲۰۱۹)، به تثبیت آنزیم پکتیناز روی ذرات کیتوزان مغناطیسی پرداختند. در این تحقیق، سه نوع سطح کیتوزان مغناطیسی با اندازه‌های نانو، میکرو و ماکرو برای تثبیت آنزیم پکتیناز استفاده

¹ Yang

² Nadar and Rathod

³ Cellulase

شد. نتایج نشان داد که اندازه ذرات تأثیر معنی‌داری روی پارامترهای سینتیکی داشته است به‌طوری‌که حداکثر سرعت برای آنزیم‌های تثبیت‌شده روی سطوح نانو به‌مراتب بیشتر از آنزیم‌های تثبیت‌شده روی سطوح میکرو و پس از آن ماکرو بوده است. در مقابل، نتایج نشان داد که بالاترین پایداری حرارتی برای آنزیم‌های تثبیت‌شده روی سطح ماکرو و پس از آن نانو و میکرو بوده است. همچنین یافته‌های حاصل از امکان استفاده مجدد نشان داد که آنزیم‌های تثبیت‌شده روی سطح مغناطیسی ماکرو تنها ۱۵ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۲۵ سیکل واکنش از دست دادند. همچنین نتایج کلی این تحقیق نشان داد که پکتینازهای تثبیت‌شده روی ذرات کیتوزان مغناطیسی دارای پتانسیل بالقوه‌ای برای شفاف‌سازی آبمیوه‌های مختلف می‌باشند.

وو^۱ و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی به تثبیت آنزیم پکتیناز روی فیبر تفاله چوب به روش لایه به لایه^۲ و استفاده از آن برای تصفیه فاضلاب صنعت کاغذسازی پرداختند. به‌طور کلی، ترکیبات پکتیکی موجود در فاضلاب صنعت کاغذسازی روی عملکرد دستگاه‌ها و کیفیت محصول نهایی تأثیر منفی دارند. در این تحقیق، پکتیناز به‌صورت لایه‌ای روی فیبر تفاله به‌وسیله پلی‌آکریل‌آمید کاتیونی^۳ تثبیت شد. روش تثبیت بدین شکل بوده که ابتدا فیبرها با پلی‌آکریل‌آمید کاتیونی فعال شده و سپس آنزیم پکتیناز روی آن تثبیت شد و دوباره همین فرایند تکرار شده تا چندین لایه آنزیم روی حامل ایجاد شود. نتایج نشان داد که با تثبیت لایه به لایه، میزان فعالیت آنزیم از لایه اول تا چهارم از ۹۸۳ به ۳۰۷۴ یونیت بر گرم افزایش یافت و همچنین پایداری آنزیم تثبیت‌شده با افزایش لایه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. از طرفی نتایج نشان داد که تثبیت چندلایه‌ای موجب بهبود قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌ها شده است. درنهایت، نتایج کلی این تحقیق نشان داد که روش تثبیت استفاده شده برای آنزیم پکتیناز بسیار مؤثر برای تصفیه فاضلاب صنعت کاغذسازی می‌باشد.

^۱ Wu^۲ Layer-by-layer^۳ Cationic polyacrylamide

در تحقیقی دیگر، کی^۱ و همکاران (۲۰۲۰)، به تثبیت آنزیم پکتیناز روی بیدهای کامپوزیتی متخلخل هیدروکسی آپاتیت-کلسیم آلزینات^۲ پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که بهینه شرایط تثبیت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۴، میزان آنزیم ۵/۲ یونیت بر میلی‌لیتر و زمان تثبیت ۴ ساعت به دست آمد و در این شرایط آنزیم پکتیناز بالاترین میزان فعالیت (۸۹۹۵ یونیت بر میلی‌گرم) با راندمان تثبیت ۹۱ درصد را از خود نشان داد. همچنین یافته‌ها نشان داد که آنزیم تثبیت‌شده دارای پایداری حرارتی و مقاومت به پی‌اچ بسیار بالاتری نسبت به آنزیم آزاد بوده‌اند. همچنین آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده پس از ۳۰ روز نگهداری به ترتیب ۲۰ و ۵۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کردند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، این محققین بیان کردند که بیدهای کامپوزیتی مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک ساپورت بالقوه برای تثبیت آنزیم‌های مختلف در صنایع گوناگون مطرح باشند.

نوری و خدائیان^۳ (۲۰۲۰) در تحقیقی به تثبیت آنزیم پکتیناز روی نانوذرات مغناطیسی با استفاده از پلی‌آلدهید کفیران پرداختند. در این تحقیق، ابتدا نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 تولید و به‌وسیله کیتوزان پوشش داده شد و سپس از پلی‌آلدهید کفیران به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی برای تثبیت آنزیم پکتیناز روی ساپورت استفاده گردید. نتایج نشان داد که آنزیم تثبیت‌شده ۷۰/۰۲ درصد فعالیت خود را پس از ۱۰ سیکل واکنش حفظ کرد. همچنین ثابت میکائیلیس-منتن برای آنزیم‌های تثبیت‌شده (۲/۶۸۰) به‌مراتب کمتر از آنزیم‌های آزاد (۳/۲۰۱) بوده، درحالی‌که حداکثر سرعت آنزیم تثبیت‌شده به طور معنی‌داری بیشتر از آنزیم آزاد بوده است. این محققین بیان داشتند که مکانیسم تثبیت استفاده شده در این تحقیق می‌تواند به‌عنوان یک روش سبز برای بهبود خصوصیات آنزیم پکتیناز برای کاربرد در صنایع مختلف مطرح باشد.

دال ماگرو و همکاران (۲۰۲۰a)، در تحقیقی به تثبیت آنزیم پکتین‌لیاز با استفاده از گلوکارآلدهید پرداختند. در این تحقیق، از بیدهای آگارزی به‌عنوان ساپورت و از گلوکارآلدهید به‌عنوان اتصال‌دهنده عرضی و همچنین از سه پی‌اچ ۵، ۶/۵ و ۸ برای تثبیت آنزیم‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های تثبیت‌شده در دمای ۲۰ درجه

¹ Qi² Porous hydroxyapatite/calcium alginate composite beads³ Nouri and Khodaiyan

سلسیوس بسیار پایین و کمتر از ۱۰ درصد فعالیت آنزیم‌های آزاد بوده است. به هر حال، زمانی که از پی‌اچ ۵ برای تثبیت آنزیم استفاده شد، آنزیم‌های تثبیت‌شده پایداری بسیار بیشتری را نسبت به آنزیم‌های آزاد از خود نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش دما فعالیت آنزیم‌های تثبیت‌شده به طور معنی‌داری افزایش یافت تا جایی که حتی در دمای ۹۰ درجه سلسیوس نیز آنزیم‌های تثبیت‌شده مقداری از فعالیت خود را حفظ کردند در حالی که در این دما آنزیم‌های آزاد کاملاً غیرفعال شدند. از طرفی یافته‌ها نشان داد که آنزیم‌های تثبیت‌شده حتی در پی‌اچ برابر با ۹ نیز قادر به فعالیت بودند در حالی که آنزیم‌های آزاد در این پی‌اچ کاملاً غیرفعال شدند. نتایج بررسی قابلیت استفاده مجدد نشان داد که آنزیم‌های تثبیت‌شده بیش از ۹۰ درصد فعالیت خود را پس از ۵ سیکل واکنش حفظ کردند.

۲-۲- مروری بر مطالعات در زمینه تثبیت آنزیم‌ها و استفاده از آن‌ها در فرایندهای مداوم

در این بخش نیز سعی شد که تا جای ممکن به تحقیقات مرتبط با پژوهش حاضر در زمینه استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده در فرایندهای مداوم پرداخته شود.

بایراموگلو^۱ و همکاران (۲۰۰۷)، در تحقیقی به هیدرولیز مداوم لاکتوز در یک بیوراکتور بستر ثابت با استفاده از آنزیم‌های بتا-گالاکتوزیداز^۲ تثبیت‌شده روی ذرات مغناطیسی حاصل از پلیمریزاسیون گلیسیدیل متاکریلات^۳ و متیل-متاکریلات^۴ پرداختند. نتایج نشان داد که حداکثر میزان آنزیم تثبیت‌شده برابر با ۹/۸۷ میلی گرم بر گرم ساپورت بوده است. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان داد که ثابت میکائلیس-منتن و همچنین حداکثر سرعت آنزیم‌های تثبیت‌شده به ترتیب بیشتر و کمتر از آنزیم‌های آزاد بوده است، این در حالی بود که فرایند تثبیت سبب افزایش پایداری آنزیم‌ها در دماهای مختلف شد. در نهایت از بیوراکتور بستر ثابت به منظور هیدرولیز لاکتوز در دمای ۳۵ درجه سلسیوس برای مدت ۶۰ ساعت استفاده شد و نتایج نشان داد که در طی این مدت آنزیم‌ها تنها ۱۲ درصد فعالیت اولیه خود را از دست دادند.

¹ Bayramoglu

² B-galactosidase

³ Glycidylmethacrylate

⁴ Methylmethacrylate

در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۸، بایراموگلو و یاکوپ آریسا^۱ از یک بیوراکتور پر شده با آنزیم‌های پراکسیداز تثبیت شده روی بیدهای مغناطیسی به منظور حذف مداوم فنول و پی-کلروفنول^۲ استفاده کردند. این محققین آنزیم‌های پراکسیداز حاصل از ترب کوهی را روی ذرات مغناطیسی حاصل از پلیمریزاسیون گلیسیدیل متاکریلات و متیل متاکریلات به وسیله گلاتارآلدهید تثبیت کرده و سپس از آنزیم‌های تثبیت شده در یک بیوراکتور بستر سیال^۳ به منظور انجام فرایند مداوم استفاده کردند. نتایج نشان داد که ظرفیت حامل مورد استفاده برای تثبیت آنزیم برابر با ۳/۳۵ میلی گرم بر گرم ذرات بوده است و همچنین آنزیم‌های تثبیت شده دارای حدود ۷۹ درصد فعالیت آنزیم‌های آزاد بودند. همچنین بررسی بهینه شرایط فرایند نشان داد که بهترین پی‌اچ برای آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده برابر ۷ و آنزیم‌های تثبیت شده دارای حداکثر فعالیت در دماهای بین ۲۵ تا ۳۵ درجه سلسیوس بودند. همچنین نتایج نشان داد که آنزیم‌های تثبیت شده دارای پایداری حرارتی به مراتب بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد بودند. سرانجام، این محققین بیان داشتند که فرایند مداوم در بیوراکتور بستر متحرک دارای عملکرد بسیار بهتری نسبت به فرایند غیر مداوم بوده است.

چن^۴ و همکاران (۲۰۰۹)، در تحقیقی به تولید مداوم زیست دیزل^۵ از ضایعات پخت روغن با استفاده از لیپاز^۶ تثبیت شده در بیوراکتور بستر ثابت پرداختند. در این تحقیق، تولید مداوم زیست دیزل با استفاده از آنزیم‌های لیپاز تثبیت شده در بیوراکتور بستر ثابت سه مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت. محیط واکنش شامل ضایعات پخت روغن، آب، متانول و هگزان بود و هدف تولید زیست دیزل حاوی اسید چرب متیل استر (FAME)^۷ با ترکیب اصلی متیل اولئات^۸ بوده است. همچنین در این تحقیق، تأثیر لیپاز، حلال، آب، دما و نرخ جریان روی تولید زیست دیزل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان ۹۸/۰۸ درصد تولید محصول در محیط سوپسترا پس از انجام واکنش در

^۱ Bayramoglu and Yakup Arica

^۲ p-chlorophenol

^۳ Fluidized bed reactor

^۴ Chen

^۵ Biodiesel

^۶ Lipase

^۷ Fatty acid methyl ester

^۸ Methyl oleate

شرایط بهینه قابل دستیابی است. همچنین یافته‌ها نشان داد که محصول تولیدی دارای خصوصیات شیمیایی و فیزیکی به مراتب بهتری نسبت به استانداردهای تعیین شده برای زیست دیزل بوده است.

مایر^۱ و همکاران (۲۰۱۰)، در تحقیقی به تولید مداوم لاکتولوز^۲ با استفاده از بتا-گلوکوزیداز^۳ تثبیت شده پرداختند. در این تحقیق از دو حامل رزین تبادل آنیونی^۴ و یوپرژت^۵ برای تثبیت آنزیم مذکور استفاده شد و نتایج نشان داد که راندمان تثبیت روی این دو حامل به ترتیب برابر با ۷۲ و ۸۳ درصد بوده است. همچنین آنزیم‌های تثبیت شده روی این دو حامل دارای فعالیت ویژه به ترتیب برابر با ۹۲۰ و ۱۵۰۰ نانوکاتال بر گرم بوده‌اند. در مرحله بعد، از یک بیوراکتور بستر ثابت برای انجام فرایند مداوم با استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده و از یک بیوراکتور غشایی^۶ برای انجام فرایند مداوم با استفاده از آنزیم آزاد استفاده شد. نتایج نشان داد که حداکثر راندمان تولید لاکتولوز برابر با ۴۳ درصد نسبت به میزان لاکتوز اولیه بوده که به وسیله بیوراکتور بستر ثابت به دست آمد. همچنین بررسی پایداری آنزیم‌ها نشان داد که آنزیم‌های تثبیت شده روی هر دو حامل، ۱۰۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۱۴ روز حفظ کردند.

اسکندرلو و عباسپورراد^۷ (۲۰۱۸)، در تحقیقی به تولید مداوم گالاکتواولیگوساکاریدها^۸ با استفاده از بتا-گالاکتوزیداز تثبیت شده روی گلوله‌های شیشه‌ای پرداختند. در این تحقیق، از آب پنیر به عنوان سوبسترا استفاده شد و از طرفی از آنزیم تثبیت شده روی گلوله‌های شیشه‌ای (به وسیله گلتار آلدهید) در یک شرایط مداوم در بیوراکتور بستر ثابت برای تولید گالاکتواولیگوساکارید استفاده گردید. نتایج نشان داد که تثبیت آنزیم به طور معنی داری سبب افزایش پایداری آنزیم‌ها شد و راندمان تولید گالاکتواولیگوساکارید پس از ۸ سیکل واکنش تنها ۴/۶ درصد کاهش یافت.

¹ Mayer

² Lactulose

³ B-glycosidase

⁴ Anion-exchange resin

⁵ Eupergit® C

⁶ Membrane bioreactor

⁷ Eskandarloo and Abbaspourrad

⁸ Galacto-oligosaccharides

همچنین بررسی‌ها نشان داد که حداکثر راندمان تولید محصول به میزان $3/39$ درصد با تبدیل $4/56$ درصد از لاکتوز پس از دو سیکل واکنش به دست آمد.

در تحقیقی دیگر در سال 2019 ، گناری^۱ و همکاران به بررسی تثبیت بتا-گالاکتوزیداز روی کلاژن^۲ پرداختند. در این پژوهش، ساپورت فعال شده به وسیله چهار روش مختلف شامل استفاده از آلومینیوم، گلوآلدهید، استیک اسید و ترکیبی از آلومینیوم و گلوآلدهید مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت از آنزیم‌های تثبیت شده برای هیدرولیز لاکتوز آب پنیر و شیر در شرایط غیر مداوم و مداوم استفاده شد. نتایج نشان داد که روش‌های مختلف اصلاح ساپورت تأثیر معنی‌داری روی راندمان تثبیت نداشت. همچنین در تمامی روش‌های استفاده شده میزان هیدرولیز لاکتوز به 50 درصد پس از 17 سیکل واکنش در شرایط غیر مداوم رسید. از طرف دیگر، با استفاده از روش مداوم در یک بیوراکتور بستر ثابت این میزان هیدرولیز پس از 48 ساعت حاصل گشت. نتایج بررسی میزان پایداری نشان داد که آنزیم‌های تثبیت شده دارای پایداری بسیار بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد بودند که این افزایش پایداری در شرایط مداوم بسیار مشهود بوده است.

گوررو^۳ و همکاران (2019)، در تحقیقی به تولید مداوم لاکتولوز^۴ در یک بیوراکتور بستر ثابت به وسیله آنزیم‌های بتا-گالاکتوزیداز تثبیت شده پرداختند. در این تحقیق، برای اولین بار، آنزیم بتا-گالاکتوزیداز روی گلیکوزیل-آگارز^۵ تثبیت و از آنزیم‌های تثبیت شده برای تولید لاکتولوز در یک بیوراکتور بستر ثابت استفاده شد. نتایج نشان داد که حداکثر راندمان تولید برابر با $6/0$ گرم بر گرم لاکتوز در دمای 50 درجه سلسیوس، پی‌اچ برابر با $4/5$ ، در حضور 50 درصد وزنی/وزنی شکر، نرخ جریان 15 میلی‌لیتر بر دقیقه و نسبت مولی فروکتوز به لاکتوز برابر با 12 به دست آمد. همچنین بررسی شرایط مداوم واکنش نشان داد که استفاده از روش مداوم تأثیری روی راندمان تولید نداشته درحالی‌که موجب سهولت انجام کار شده است.

¹ Gennari

² Collagen

³ Guerrero

⁴ Lactulose

⁵ Glyoxyl-agarose

بیلال و ایقبال^۱ (۲۰۱۹)، در تحقیقی به تثبیت آنزیم لیگنین پراکسیداز^۲ روی بیدهای کلسیم آلزینات پرداختند. در این مطالعه، لیگنین پراکسیداز به روش کووالانسی با استفاده از گلوآرالدهید روی بیدهای کلسیم آلزینات تثبیت شد. همچنین از روش سطح پاسخ برای بهینه سازی شرایط تثبیت استفاده شد به طوری که فاکتورهای ورودی شامل میزان سدیم آلزینات، میزان کلسیم کلرید و غلظت گلوآرالدهید و فاکتور خروجی راندمان تثبیت بوده است. نتایج نشان داد که حداکثر راندمان تثبیت برابر با ۹۶/۳۱ درصد در حضور ۲ درصد حجمی/وزنی سدیم آلزینات، ۲/۲ درصد حجمی/وزنی کلسیم کلرید و ۰/۲ مولار گلوآرالدهید به دست آمد. همچنین نتایج آنالیز آماری نشان داد که غلظت گلوآرالدهید تأثیر معنی داری روی میزان تثبیت نداشته است. از طرفی، از آنزیمهای تثبیت شده در یک بیوراکتور بستر ثابت برای رنگ زدایی از پساب صنعت نساجی استفاده شد. در نهایت این محققین بیان کردند که از آنزیمهای تثبیت شده روی بیدهای کلسیم آلزینات به خوبی می توان برای تصفیه مداوم پسابهای نساجی استفاده کرد.

نیفار^۳ و همکاران (۲۰۲۰)، در تحقیقی به تثبیت آنزیم گلوکز ایزومراز^۴ برای تولید مداوم شربت با فروکتوز بالا^۵ در یک بیوراکتور بستر ثابت پرداختند. در این تحقیق، آنزیمهای گلوکز ایزومراز به وسیله جذب یونی روی حاملهای پلی متاکریلات^۶ (سپابیدهای^۷ EC-EA و EC-HA) و به وسیله تثبیت کووالانسی روی گلیوکسال آگارز^۸ تثبیت شدند. در میان حاملهای استفاده شده، سپابیدهای EC-EA دارای بالاترین راندمان تثبیت (۸۹ درصد) بودند. همچنین نتایج نشان داد که بهینه شرایط برای فعالیت آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت شده مشابه با آنزیمهای آزاد و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس و پی اچ ۷ بوده است. از طرفی، آنزیمهای تثبیت شده به وسیله جذب یونی نسبت به آنزیمهای آزاد دارای فعالیت نسبی بیشتر در شرایط اسیدی، پایداری دمایی بالاتر و همچنین پایداری نگهداری بالاتر بودند. علاوه بر این، آنزیمهای تثبیت شده دارای یک پایداری عملیاتی بسیار عالی در شرایط غیر مداوم بودند.

¹ Bilal and Iqbal

² Lignin peroxidase

³ Neifar

⁴ Glucose isomerase

⁵ High fructose syrup

⁶ Polymethacrylate

⁷ Sepabeads

⁸ Glyoxal agarose

به‌طوری‌که ۸۳ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۱۵ سیکل ۳ ساعته در دمای ۸۵ درجه سلسیوس حفظ کردند. همچنین از یک بیوراکتور بستر ثابت حاوی آنزیم‌های تثبیت‌شده به روش جذب یونی برای تولید شربت با فروکتوز بالا به مدت ۱۱ روز در دمای ۷۰ درجه سلسیوس استفاده شد که نتایج نشان داد، بیشترین میزان نرخ تبدیل بعد از ۴۸ ساعت به دست آمد که برابر با ۴۹ درصد بود.

هانگ^۱ و همکاران (۲۰۲۰)، در تحقیقی به تثبیت آنزیم اینولیناز^۲ برای تبدیل مداوم اینولین^۳ در یک بیوراکتور بستر متحرک پرداختند. در این تحقیق، آنزیم‌های اینولیناز در ریزکره‌های ژلاتین آلژینات^۴ تثبیت‌شده و از آنزیم‌های تثبیت‌شده برای تبدیل اینولین استفاده شد. نتایج نشان داد که بهترین شرایط فرایند مداوم زمانی به دست آمد که از آنزیم تثبیت‌شده به میزان ۱۸ گرم، غلظت سوبسترای برابر با ۸۰ گرم بر لیتر و نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. در مرحله بعد، با استفاده از شرایط بهینه، از یک بیوراکتور بستر متحرک برای تولید مداوم فروکتوز برای ۱۰ روز استفاده شد که نتایج نشان داد میزان بهره‌وری برابر با ۸۶/۴ گرم بر لیتر در روز بوده است. همچنین، بررسی‌ها نشان داد که استفاده از بیوراکتور بستر متحرک برای تبدیل اینولین مؤثرتر از بیوراکتور بستر ثابت بوده است. درنهایت، این محققین بیان داشتند که روش استفاده شده در این مطالعه قابلیت استفاده صنعتی در مقیاس بسیار بالاتر را نیز دارا می‌باشد.

۲-۳- مروری بر مطالعات در زمینه شفاف‌سازی آبمیوه‌ها

در این بخش به مطالعاتی پرداخته شده است که هدف آن‌ها شفاف‌سازی غیر مداوم و یا مداوم آبمیوه‌ها به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده بوده است.

¹ Hang

² Inulinase

³ Inulin

⁴ Gelatin alginate microspheres

لیو عبدالله^۱ و همکاران (۲۰۰۷)، در تحقیقی به بهینه سازی شرایط برای شفاف سازی آب کارامبولا^۲ با استفاده از آنزیم های پکتیناز تجاری پرداختند. این محققین از روش سطح پاسخ برای بهینه سازی شرایط فرایند شفاف سازی شامل زمان، دما و غلظت آنزیم روی خصوصیات فیزیکی آب کارامبولا استفاده کردند. نتایج نشان داد که غلظت آنزیم مهم ترین فاکتور مؤثر روی کدورت^۳، شفافیت^۴، ویسکوزیته^۵ و رنگ^۶ آبمیوه های شفاف شده بوده است و بهترین نتیجه زمانی حاصل شد که از زمان فرایند ۲۰ دقیقه، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و غلظت آنزیم ۱۰ درصد استفاده شد.

در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۰۸، دیانو^۷ و همکاران به شفاف سازی مداوم آب سیب به وسیله آنزیم های پکتولیتیک تثبیت شده در بیوراکتورهای بستر ثابت و متحرک پرداختند. در این تحقیق، آنزیم های پکتولیتیک به روش کووالانسی روی ساپورت های مختلف شامل ریزکره های شیشه ای، گلوله های نایلونی^۸ و PAN بیدها^۹ با استفاده از گلاتارآلدهید تثبیت شدند. نتایج نشان داد که بهترین ساپورت برای تثبیت آنزیم ها PAN بیدها بودند و بنابراین خصوصیات دو بیوراکتور بستر ثابت و متحرک حاوی آنزیم های تثبیت شده روی PAN بیدها با یکدیگر مقایسه شد. یافته ها نشان داد که بهترین شرایط واکنش شامل پی اچ برابر با ۴، دمای ۵۰ درجه سلسیوس و حجم بیدهای برابر با ۲۰ سانتی متر مکعب بود. همچنین اگرچه در نرخ جریان های پایین تفاوتی بین عملکرد دو بیوراکتور مشاهده نشد، اما در نرخ های بالا به نظر می رسید که عملکرد بیوراکتور بستر متحرک بهتر بوده، به طوری که زمان هیدرولیز کامل پکتین در بیوراکتور بستر ثابت برابر با ۱۳۱ دقیقه و در بیوراکتور بستر متحرک برابر با ۴۱ دقیقه بوده است.

¹ Liew Abdullah

² Carambola

³ Turbidity

⁴ Clarity

⁵ Viscosity

⁶ Color

⁷ Diano

⁸ Nylon pellets

⁹ PAN beads

در تحقیقی دیگر، د سوزا بزرا^۱ و همکاران (۲۰۱۵)، به تثبیت آنزیم لاکاز^۲ در فیبر نارگیل سبز پرداختند و از آنزیم‌های تثبیت‌شده برای شفاف‌سازی آب سیب استفاده کردند. در این تحقیق، از پوست نارگیل سبز برای تولید فیبر استفاده شده و سپس از فیبرهای فعال شده به‌وسیله گلیوکسیل^۳ و گلو تار آلدهید به‌عنوان حامل برای تثبیت آنزیم لاکاز استفاده شد. نتایج نشان داد که آنزیم‌های تثبیت‌شده حدود ۵۹ درصد فعالیت آنزیم آزاد را داشته و حداکثر راندمان تثبیت آن‌ها روی ساپورت برابر با ۹۸ درصد بوده است. همچنین بررسی‌ها نشان داد که استفاده از هر دو اتصال‌دهنده عرضی برای تثبیت آنزیم سبب افزایش پایداری آنزیم‌ها شده و سیستم تثبیت فیبر-گلو تار آلدهید-آنزیم نتایج بسیار خوبی را در شفاف‌سازی آب سیب از خود نشان داد به‌طوری‌که منجر به کاهش ۲۹ درصدی میزان کدورت شد. از طرفی، آنزیم‌های تثبیت‌شده ۱۰۰ درصد فعالیت خود را پس از ۱۰ سیکل واکنش حفظ کرده که نشان‌دهنده کارایی بالای این روش تثبیت بوده است. درنهایت می‌توان بیان داشت که این مطالعه یکی از تحقیقات پیشرو برای استفاده از ضایعات به‌عنوان ساپورت برای تثبیت آنزیم لاکاز به‌منظور شفاف‌سازی آبمیوه‌ها بوده است.

در تحقیقی دیگر، راجدو^۴ و همکاران (۲۰۱۶)، به تثبیت آنزیم پکتیناز روی ساپورت پلیمری قابل استفاده مجدد برای شفاف‌سازی آب سیب پرداختند. در این تحقیق، حامل مورد استفاده از واکنش بین پلی‌اتیلن‌ایمین^۵ با کوپلیمر آکریلات^۶ فعال شده با اپوکسی تولید شد. به‌منظور تثبیت، ابتدا آنزیم پکتیناز روی پلیمر به‌وسیله تبادل یون جذب شده و سپس به‌وسیله دکستران آلدهید^۷ تثبیت شد. نتایج نشان داد، درحالی‌که آنزیم‌های پکتیناز آزاد دارای بهینه فعالیت در پی‌اچ برابر با ۵ بودند، آنزیم‌های تثبیت‌شده در دامنه پی‌اچ بین ۳ تا ۷ دارای فعالیت بالایی بوده‌اند. از طرفی، بررسی امکان استفاده مجدد نشان داد که آنزیم‌های پکتیناز تثبیت‌شده بیش از ۹۵ درصد فعالیت خود را در طول ۱۰ سیکل شفاف‌سازی آب سیب حفظ کردند. همچنین یافته‌های این تحقیق نشان داد که اگر فعالیت آنزیم پکتیناز از دست رفت به‌راحتی می‌توان با استفاده از هیدروکلریک اسید ۱ نرمال برای جداسازی کیتوزان آلدهید و آنزیم متصل

¹ de Souza Bezerra

² Laccase

³ Glyoxyl

⁴ Rajdeo

⁵ Polyethyleneimine

⁶ Acrylate copolymer

⁷ Dextran aldehyde

به آن استفاده کرد و در نتیجه از ساپورت آنزیم زدایی شده برای تثبیت آنزیم های جدید استفاده نمود. نتایج شفاف سازی آب سیب نشان داد که آنزیم های تثبیت شده دارای عملکردی مشابه با آنزیم های آزاد بودند.

در تحقیقی دیگر، بیلال^۱ و همکاران (۲۰۱۶)، به تثبیت آنزیم منگنز پراکسیداز^۲ روی ژلاتین به منظور شفاف سازی آبمیوه پرداختند. در این مطالعه، از هیدروژل ژلاتین فعال شده به وسیله گلو تار آلدهید برای کپسولاسیون منگنز پراکسیداز استفاده شد. نتایج نشان داد که حداکثر راندمان تثبیت (۸۳/۲ درصد) در شرایط بهینه شامل ۲۰ درصد حجمی/وزنی ژلاتین، ۰/۲۵ درصد حجمی/حجمی گلو تار آلدهید و زمان تثبیت ۲ ساعت با استفاده از ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم به دست آمد. همچنین نتایج اندازه گیری پایداری آنزیم ها در طول زمان نشان داد که آنزیم های آزاد حدود ۸۶ درصد فعالیت خود را پس از ۱۲۰ دقیقه از دست دادند، در حالی که آنزیم های تثبیت شده حدود ۷۰ درصد فعالیت اولیه خود را طی این مدت حفظ کردند. برای بررسی قابلیت تجاری سازی، از آنزیم های تثبیت شده برای شفاف سازی مداوم آب سیب و آب پرتقال در یک بیوراکتور بستر ثابت استفاده شد که نتایج نشان داد فرایند شفاف سازی مداوم منجر به کاهش ۳۶ درصدی کدورت آب سیب و ۴۳ درصدی کدورت آب پرتقال شده است. همچنین بررسی قابلیت استفاده مجدد نشان داد که آنزیم های تثبیت شده بیش از ۶۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۶ سیکل واکنش حفظ کردند. در نهایت این محققین بیان داشتند که سیستم تثبیت مورد استفاده در این تحقیق دارای پتانسیل بالقوه ای برای استفاده در تیمارهای مختلف آنزیمی می باشد.

در تحقیقی دیگر، ادیگوزل^۳ و همکاران (۲۰۱۹)، به تولید یک بتا-۱،۴-زایلاناز^۴ جدید از پدیوکوکوس/سیدی-لاکتیسی^۵ پرداخته و از آنزیم تولیدی برای شفاف سازی آبمیوه استفاده کردند. در این تحقیق، یک زایلاناز خارج سلولی از پدیوکوکوس/سیدی-لاکتیسی تولید، خالص سازی و خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آنزیم تولیدی دارای وزن مولکولی برابر با ۴۸/۱۵ کیلودالتون و بهینه دما و پی اچ فعالیت برابر با ۴۰ درجه

¹ Bilal² Manganese peroxidase³ Adiguzel⁴ β -1,4-xylanase⁵ *Pediococcus acidilactici*

سلسیوس و ۷ بوده است. همچنین این آنزیم در دامنه دمایی بین ۲۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس و دامنه پی‌اچ بین ۲ تا ۹ دارای فعالیت قابل قبولی بوده است. بررسی پارامترهای سینتیکی نشان داد که ثابت میکائیلیس-منتن و حداکثر سرعت برای این آنزیم به ترتیب برابر با ۳/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۴/۶۶ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین بود. همچنین بررسی‌ها نشان داد که این آنزیم عملکرد قابل قبولی را برای شفاف‌سازی آبمیوه‌ها از خود نشان می‌دهد به‌طوری‌که میزان افزایش قند احیا^۱ و همچنین کاهش کدورت آب هلو به‌وسیله این آنزیم به ترتیب برابر با ۲۴/۴۷ و ۲۱/۲۲ درصد بوده است. درنهایت این محققین بیان کردند که این آنزیم خالص‌شده می‌تواند پتانسیل گسترده‌ای در فرایندهای بیوتکنولوژیکی صنایع غذایی داشته باشد.

در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱۹، دنگ^۲ و همکاران به تثبیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز روی ریزکره‌های کلسیم آلزینات به‌منظور استفاده در شفاف‌سازی آبمیوه پرداختند. در این مطالعه، از کلسیم آلزینات به‌عنوان ساپورت و از روش امولسیون درون‌زا^۳ برای تثبیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز روی این حامل و نهایتاً از آنزیم‌های تثبیت‌شده برای شفاف‌سازی آب سیب استفاده شد. شرایط آماده‌سازی ریزکره‌های کلسیم آلزینات به‌وسیله امولسیون درون‌زا بهینه‌سازی شد. نتایج نشان داد که آنزیم‌های تثبیت‌شده دارای بهینه دمایی فعالیت برابر با ۶۰ درجه سلسیوس بوده که به میزان ۱۰ درجه سلسیوس بیشتر از آنزیم‌های آزاد بود. همچنین آنزیم‌های تثبیت‌شده بسیار کمتر از آنزیم‌های آزاد تحت تأثیر تغییر پی‌اچ قرار می‌گرفتند که نشان از پایداری بیشتر آنزیم‌های تثبیت‌شده در آب سیب داشته است. از طرفی، نتایج نشان داد که آنزیم‌های تثبیت‌شده ۶۳ درصد فعالیت اولیه خود را پس از سه سیکل غیر مداوم حفظ کردند. نهایتاً این مطالعه نشان داد که با استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده به روش بیان‌شده در این تحقیق می‌توان کدورت آب سیب را تا حد قابل قبولی کاهش داد.

^۱ Reducing sugar

^۲ Deng

^۳ Endogenous emulsification method

سانتانا^۱ و همکاران (۲۰۲۰)، در تحقیقی به شفاف سازی آب نارنگی با استفاده از سلولاز^۲ پرداختند. در این مطالعه از عصاره خام سلولازی به دست آمده از گونه های سودوزیما^۳ برای تیمار آب نارنگی استفاده شد. همچنین به منظور بررسی پایداری آنزیم های تولیدی، عصاره خام به دست آمده در دماها و زمان های مختلف انکوبه شد و سپس میزان کاهش در فعالیت آنزیم ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره سلولازی به دست آمده مقاوم به دما بوده و به ترتیب میزان ۹۸، ۸۸ و ۸۰ درصد فعالیت اولیه خود را در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سلسیوس پس از یک ساعت انکوباسیون حفظ کرد. همچنین نتایج نشان داد که بهینه شرایط شفاف سازی آب نارنگی پس از ۸۰ دقیقه فرایند به وسیله ۱/۲۵ درصد حجمی/حجمی عصاره آنزیمی به دست آمد و در این شرایط میزان ویسکوزیته آبمیوه ۶۵ درصد کاهش یافت. در نهایت، این محققین بیان داشتند که از عصاره آنزیمی به دست آمده در این تحقیق می توان برای شفاف سازی سایر آبمیوه های حاصل از مرکبات نیز استفاده کرد.

احمد و سوهایل^۴ (۲۰۲۰)، در تحقیقی به بررسی خصوصیات آنزیم پکتیناز حاصل از ژئوتریکوم کاندیدوم^۵ به منظور استفاده برای شفاف سازی آب پرتقال پرداختند. در این تحقیق، پی اچ و دمای بهینه آنزیم تولیدی مورد بررسی قرار گرفته و شفاف سازی آب پرتقال به وسیله آنزیم مذکور بهینه شد. نتایج نشان داد که بهینه فعالیت این آنزیم در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، زمان فرایند ۲۵ دقیقه و پی اچ برابر با ۵ به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که این آنزیم در پی اچ های پایین پایداری قابل قبولی داشته و بنابراین می توان از آن برای شفاف سازی آبمیوه های مختلف بخصوص آب مرکبات استفاده کرد. در نهایت، این محققین بیان داشتند که آنزیم مذکور عملکرد قابل قبولی را در شفاف سازی آب پرتقال از خود نشان داده است.

دال ماگرو و همکاران (۲۰۲۰b)، در تحقیقی به مقایسه بیوراکتورهای بستر ثابت و متحرک برای شفاف سازی آنزیمی آب پرتقال پرداختند. در این تحقیق، ابتدا آنزیم های پکتیناز روی بیدهای کیتوزانی فعال شده با گلو تار آلدهید

¹ Santana

² Cellulases

³ *Pseudozyma*

⁴ Ahmed and Sohail

⁵ *Geotrichum candidum*

تثبیت شده و سپس از آنزیم‌های تثبیت شده در بیوراکتورهای بستر ثابت و متحرک برای شفاف سازی مداوم آب پرتقال استفاده شد. نتایج نشان داد که اگرچه فعالیت آنزیم‌ها پس از تثبیت به طوری معنی داری کاهش یافت اما آنزیم‌های تثبیت شده پایداری بسیار بالایی حتی در شرایط شدید فرایند از خود نشان دادند. به عنوان مثال، زمانی که از دمای ۹۰ درجه سلسیوس و پی‌اچ برابر با ۴/۸ استفاده شد، آنزیم‌های تثبیت شده توانستند ۹۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کنند در حالی که آنزیم‌های آزاد تنها ۳۵ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کردند. همچنین بررسی اثر نوع بیوراکتور انتخابی نشان داد که بیوراکتور بستر سیال کارای بهتری را برای شفاف سازی آب پرتقال از خود نشان داده به طوری که پس از ۷۲ ساعت میزان کدورت آبمیوه را ۶۰ درصد کاهش داد. بنابراین این محققین بیان داشتند که بیوراکتور بستر سیال حاوی آنزیم‌های پکتیناز تثبیت شده روی ذرات کیتوزانی می تواند به خوبی برای شفاف سازی آبمیوه‌های مختلف در مقیاس بالا مورد استفاده قرار گیرد.

یاوآسر و کاراکوزلر^۱ (۲۰۲۰)، در تحقیقی به تثبیت کووالانسی آنزیم پاپاین^۲ روی کرایوژل‌های پلی(هیدروکسی-اتیل متاکریلات)-کیتوزان^۳ به منظور استفاده برای شفاف سازی آب سیب پرداختند. در این تحقیق، آنزیم پاپاین به وسیله گلو تار آلدهید روی شبکه نفوذ پذیر تولید شده تثبیت شد. نتایج نشان داد که میزان آنزیم تثبیت شده روی کرایوژل‌ها برابر با ۱۵/۲ میلی گرم بر گرم بوده است. از طرفی برای مقایسه فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده از کازئین به عنوان سوبسترا استفاده شد و نتایج نشان داد که بهینه پی‌اچ و دما برای فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده به ترتیب برابر با ۸ و ۶۵ درجه سلسیوس بوده است. همچنین بررسی‌ها نشان داد که آنزیم‌های تثبیت شده دارای پایداری به مراتب بیشتری از آنزیم‌های آزاد بودند. در نهایت، این محققین بیان داشتند که آنزیم‌های تثبیت شده با این روش قابلیت استفاده صنعتی برای شفاف سازی آب سیب را دارا می باشند.

¹ Yavaser and Karagozler

² Papain

³ Poly(hydroxyethyl methacrylate)-chitosan cryogels

فصل سوم

مواد و روش ها

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش در جدول زیر آورده شده است.

جدول ۳-۱- مواد استفاده شده در این پژوهش

مواد	شرکت تولیدکننده	کشور سازنده
دانک کفیر	دانشگاه تهران	ایران
شیر کم چرب	دانشگاه تهران	ایران
اتانول ۹۶ درصد	رازی	ایران
پولولان	Herbstreith & Fox KG	آلمان
گلوله‌های شیشه‌ای (قطر ۶ میلی‌متر)	ایران بیدز	ایران
سدیم پریدات	Sigma	امریکا
سولفوریک اسید	Sigma	امریکا
هیدروکسیل آمین هیدروکلرید	Sigma	امریکا
سدیم هیدروکسید	Sigma	امریکا
هیدروکلریک اسید	Sigma	امریکا
نیتریک اسید	Sigma	امریکا
۳- آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان	Sigma	امریکا
گلوتار آلدهید	Sigma	امریکا
آنزیم پکتیناز (Pectinex® Ultra Color)	Novozymes	دانمارک
استیک اسید	Sigma	امریکا
آلبومین سرم گاوی	Sigma	امریکا
استیک اسید	Sigma	امریکا
۳، ۵- دی نیتروسالیسیلیک اسید	Sigma	امریکا
پکتین سیب (درجه استریفیکاسیون بین ۷۲ تا ۷۶ درصد)	Herbstreith & Fox KG	آلمان
گالاکتورونیک اسید مونوهیدرات	Sigma	امریکا
پتاسیم کلرید	Sigma	امریکا
پتاسیم فسفات	Sigma	امریکا
فنل-فتالین	Sigma	امریکا
فولین-سیو کالچو	Sigma	امریکا
سدیم کرینات	Sigma	امریکا
گالیک اسید	Sigma	امریکا
DPPH	Sigma	امریکا
ABTS	Sigma	امریکا
پتاسیم پرسولفات	Sigma	امریکا

۲-۳- دستگاه‌ها و تجهیزات

دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش در جدول زیر آورده شده است.

جدول ۲-۳- دستگاه‌ها و تجهیزات استفاده شده در این پژوهش

دستگاه‌ها	شرکت تولیدکننده	کشور سازنده
ترازوی دیجیتال	Sartorius AG	آلمان
سانتریفیوژ	Shimadzu	ایران
آون	Sigma	آلمان
همزن مغناطیسی	Heidolph	ایران
خشک کن انجمادی	دنا	آلمان
ورتکس	Velp	ایران
طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)	Perkin Elmer	آمریکا
میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)	Tescan	جمهوری چک
میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)	NT-MDT	روسیه
اسپکتروفتومتر	Spectrum	چین
کدورت‌سنج	Weilheim	آلمان
پی‌اچ متر	Consort	بلژیک
انکسارسنج	ATAGO	ژاپن
ویسکومتر	Brookfield	آمریکا
رنگ‌سنج	CHROMA METER	ژاپن
بن ماری	TUTTNAUER	آمریکا
پمپ	سوراکو	ایران

۳-۳- روش کار و آزمون‌ها

۳-۳-۱- تولید و خالص سازی کفیران

در این تحقیق، دانک‌های کفیر^۱ به عنوان کشت استارتر مورد استفاده قرار گرفتند. این دانک‌ها در شیر کم‌چرب و در دمای حدود ۲۳ درجه سلسیوس کشت داده شده و این محیط کشت هفته‌ای سه بار به منظور حفظ زنده‌مانی تعویض گردید.

برای تولید کفیران، از روش قرقانی^۲ و همکاران (۲۰۲۱) استفاده گردید. بدین منظور، دانک‌های کفیر تا حل شدن کامل در آب مقطر در دما و غلظت ۸۰ درجه سلسیوس و ۱۰ درصد حجمی/وزنی روی یک همزن مغناطیسی مجهز به گرم‌کن به هم زده شده و سپس مخلوط به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ^۳ گردید. در مرحله بعد، با اضافه کردن الکل ۹۶ درصد در نسب یک به یک حجمی/حجمی و نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در یخچال در دمای حدود ۷ درجه سلسیوس، کفیران موجود در محلول رسوب داده شده و از سانتریفیوژ در شرایط مذکور برای جداسازی کفیران استفاده شد. به منظور خالص سازی بیشتر، کفیران به دست آمده دوباره در آب مقطر حل شده و مراحل فوق تکرار شد. فرایند خالص سازی شش مرتبه تکرار شده تا جایی که هیچ گونه پروتئینی با روش لوری^۴ (در بخش‌های بعدی توضیح داده خواهد شد) قابل تشخیص نبود. در نهایت، کفیران به دست آمده در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت در یک آون^۵ خشک شده و در جایی خشک برای استفاده بعدی نگهداری شد.

¹ Kefir grains

² Gharaghani

³ Centrifuge

⁴ Lowry

⁵ Oven

۳-۲-۳- تولید پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی

برای تولید کفیران و پولولان پلی آلدهید از روش اکسیداسیون جزئی با سدیم پریودات استفاده شد (شکل ۳-۱) (گو^۱ و همکاران، ۲۰۱۴). بدین منظور، ۵۰ میلی لیتر از محلول آبی سدیم پریودات (۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر) به ۱۲۵ میلی لیتر از محلول آبی کفیران یا پولولان (۴ درصد حجمی/وزنی) اضافه شده و پی اچ محلول با استفاده از سولفوریک اسید^۲ یک مولار روی ۵ تنظیم گردید. در مرحله بعد، واکنش اکسیداسیون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت با همزدن آرام روی یک همزن مغناطیسی مجهز به گرم کن انجام شده و سپس پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی تولیدشده به افزودن اتانول ۹۶ درصد به نسبت ۲ به ۱ حجمی/حجمی و نگهداری به مدت ۷۲ ساعت در دمای حدود ۷ درجه سلسیوس رسوب داده شدند. درنهایت، رسوبهای تشکیل شده با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه از محلول آب-الکل جدا شده و با استفاده از خشک کن انجمادی^۳ خشک گردیدند.

۳-۳-۳- اندازه گیری محتوای آلدهیدی پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی

برای اندازه گیری محتوای آلدهیدی پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی از روش خولیا^۴ و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد. بدین منظور، ۲۰ میلی لیتر از محلول آبی ۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر هیدروکسیل آمین هیدروکلرید^۵ با پی اچ ۵ به ۲۵ میلی لیتر از محلولهای آبی ۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر کفیران یا پولولان پلی آلدهید در همین پی اچ اضافه شده (تنظیم پی اچ در هر دو محلول با استفاده از سدیم هیدروکسید^۶ ۰/۱ مولار انجام شد) و محلول به دست آمده به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس روی یک همزن مغناطیسی مجهز به گرم کن به هم زده شد. در مرحله بعد، محلول به دست آمده با استفاده از سدیم هیدروکسید یک مولار برای اندازه گیری میزان هیدروکلریک اسید^۷ آزاد شده تیتر گردید (V₁). همچنین تمامی مراحل فوق روی غلظت های مشابه از محلول های کفیران و یا پولولان اصلاح نشده

¹ Guo

² Sulfuric acid

³ Freeze dryer

⁴ Kholiya

⁵ Hydroxylamine hydrochloride

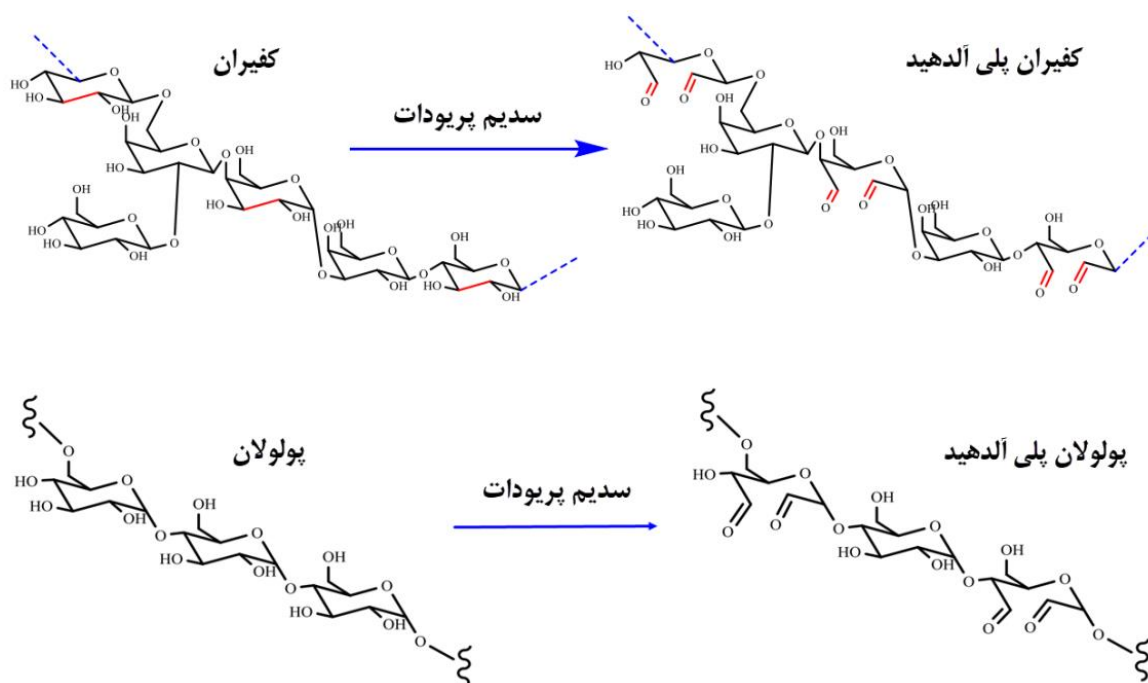
⁶ Sodium hydroxide

⁷ Hydrochloric acid

به عنوان نمونه های شاهد) انجام شده و میزان سدیم هیدروکسید یک مولار مصرف شده برای تیتراسیون آن ها به عنوان V_2 در نظر گرفته شد. در نهایت محتوای آلدهیدی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$AIC (\%) = \frac{(V_1 - V_2) \times C_{NaOH}}{1000 \times m/M} \times 100 \quad (1)$$

در فرمول بالا، ALC محتوای آلدهید پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی بر حسب درصد، C_{NaOH} غلظت مولی سدیم هیدروکسید مصرف شده (۱ مول بر لیتر)، m وزن نمونه خشک شده کفیران و یا پولولان پلی آلدهید بر حسب گرم و M وزن مولکولی تقریبی واحدهای تکرار شوند پولولان و کفیران بوده است.



شکل ۳-۱- مکانیسم اکسیداسیون جزئی کفیران و پولولان به وسیله سدیم پریودات و تبدیل آن به کفیران و پولولان پلی آلدهید

۳-۴- بررسی طیف‌های مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)^۱

برای تأیید آلدهیدی شدن از طیف‌سنجی FTIR برای پلی‌ساکاریدهای اصلاح شده و نشده استفاده شد. بدین منظور، از یک طیف‌سنج^۲ با استفاده از روش دیسک پتاسیم بروماید^۳ در رزولوشن^۴ ۴ بر سانتی‌متر (cm^{-1}) و دامنه عدد موج^۵ بین ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر استفاده شد.

۳-۵- تثبیت آنزیم‌های پکتیناز روی گلوله‌های شیشه‌ای

فرایند تثبیت آنزیم‌های پکتیناز روی سطح گلوله‌های شیشه‌ای با روش دیانو^۶ و همکاران (۲۰۰۸) با کمی تغییر انجام شد. جزئیات فرایند تثبیت به شرح زیر بوده است (شکل ۳-۲):

در مرحله اول، گلوله‌های شیشه‌ای در محلول آبی ۵ درصد نیتریک اسید^۷ در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ دقیقه به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی به هم زده شده و پس از شستشو با آب مقطر در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در یک آون خشک گردیدند.

حدود ۱۴۰ سانتی‌متر مکعب (حدود ۲۱۰ گرم) از گلوله‌های شیشه‌ای خشک‌شده در ۱۴۰ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱۰ درصد حجمی/حجمی^۳ آمینوپروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان به منظور ایجاد گروه‌های آمین آزاد روی سطح به مدت ۳ ساعت در ۶۰ درجه سلسیوس به هم زده شده درحالی‌که پی‌اچ محلول با استفاده از هیدروکلریک اسید ۶ و ۰/۱ مولار روی ۴ تنظیم شده بود. پس از کامل شدن مرحله سیلانی کردن، گلوله‌های شیشه‌ای در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در یک آون خشک شدند.

در مرحله بعد، گلوله‌های شیشه‌ای سیلانی شده در ۱۴۰ میلی‌لیتر محلول آبی گلوکارآلدهید (۲/۵ درصد حجمی/حجمی) و یا کفیران پلی‌آلدهید (۲/۵ درصد حجمی/وزنی) و یا پولولان پلی‌آلدهید (۲/۵ درصد حجمی/وزنی)

¹ Fourier transform infrared spectra

² Spectrometer

³ Potassium bromide

⁴ Resolution

⁵ Wavenumber

⁶ Diano

⁷ Nitric acid

به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق (حدود ۲۳ درجه سلسیوس) به هم زده شد. پس از شستشو با آب مقطر، گلوله‌های شیشه‌ای به منظور تثبیت آنزیم به مدت ۵ ساعت در ۱۴۰ میلی لیتر محلول آنزیم در دمای اتاق (حدود ۲۳ درجه سلسیوس) به آرامی به هم زده شد. لازم به ذکر است که محلول آنزیم با رقیق کردن آنزیم‌های مورد استفاده (Pectinex[®] Ultra Color با غلظت پروتئین ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در محلول بافر سدیم استات^۱ (پی‌اچ برابر با ۴) به نسبت ۱ به ۴ به دست آمد. در نهایت گلوله‌های شیشه‌ای حاوی آنزیم با بافر سدیم استات در پی‌اچ مشابه به منظور حذف آنزیم‌های تثبیت نشده شستشو داده شده و در دمای حدود ۷ درجه سلسیوس تا انجام آزمون‌های بعدی نگهداری شد.

۳-۳-۶- بررسی مورفولوژی سطحی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^۲

به منظور بررسی مورفولوژی سطحی قبل و بعد از فرایند تثبیت آنزیم‌های پکتیناز روی سطح شیشه از یک میکروسکوپ الکترونی روبشی در ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۵ کیلوولت استفاده شد. قبل از عکس‌برداری نمونه‌ها به وسیله لایه نازکی از طلا پوشش داده شدند.

۳-۳-۷- بررسی توپوگرافی سطحی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)^۳

در این بخش، به منظور بررسی تغییر در توپوگرافی سطحی شیشه‌ها قبل و بعد از فرایند تثبیت از یک میکروسکوپ نیروی اتمی در دمای اتاق استفاده شد.

۳-۳-۸- تعیین محتوای پروتئینی گلوله‌های شیشه‌ای حاوی آنزیم

محتوای پروتئینی گلوله‌های شیشه‌ای آنزیمی شده با روش لوری (لوری و همکاران، ۱۹۵۱) و با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

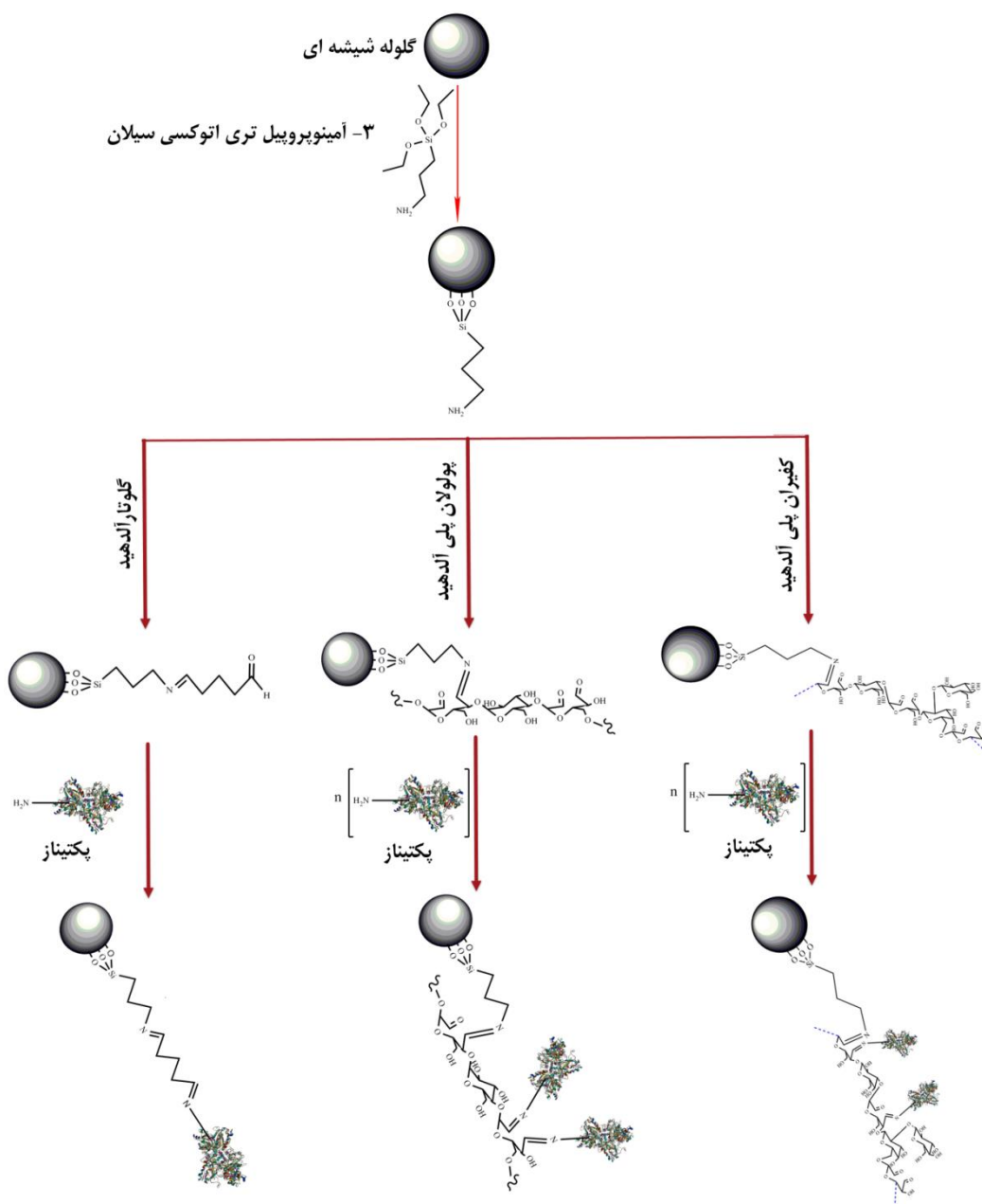
$$\text{Protein content (mg /10 glass beads)} = C_I - (C_R + C_W) \quad (2)$$

¹ Sodium acetate

² Scanning electron microscopy

³ Atomic force microscopy

در معادله فوق، C_I مقدار اولیه پروتئین در محلول استفاده شده برای تثبیت، C_R مقدار پروتئین باقیمانده در محلول پس از فرایند تثبیت و C_W مقدار پروتئین موجود در آب شستشو می باشد. همچنین در این بخش از آلبومین سرم گاوی (۰/۱ تا ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.



شکل ۳-۲ مکانیسم سیلانی شدن و تثبیت آنزیم های پکتیناز به وسیله گلو تار آلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید روی سطح گلوله شیشه ای

۳-۹- اندازه گیری فعالیت آنزیم های پکتیناز آزاد و تثبیت شده

فعالیت آنزیم های پکتیناز تثبیت شده و آزاد با استفاده از روش ۳، ۵- دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS)^۱ بر اساس تخمین میزان قندهای احیا آزاد شده، اندازه گیری شد (میلر،^۲ ۱۹۵۹). یک واحد فعالیت آنزیم برابر با مقدار آنزیم مورد نیاز برای تشکیل یک میکرومول گالاکتورونیک اسید بر دقیقه تحت شرایط واکنش تعیین شده در این واکنش تعریف شد. همچنین، در این تحقیق، فعالیت آنزیم بر اساس فعالیت ویژه (یونیت بر میلی گرم پروتئین) گزارش گردید. لازم به ذکر است که از پکتین سیب به عنوان سوبسترا و از گالاکتورونیک اسید مونوهیدرات^۳ به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

یک میلی لیتر از محلول یک میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم پکتیناز آزاد به دو میلی لیتر محلول یک درصد حجمی/ وزنی از محلول پکتین تهیه شده در بافر استات ۰/۱ مولار (پی اچ برابر با ۵) اضافه شده و واکنش هیدرولیز به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس روی یک همزن مغناطیسی مجهز به گرم کن انجام شد. در مرحله بعد، یک میلی لیتر از محیط واکنش به یک لوله آزمایش حاوی یک میلی لیتر از معرف DNS منتقل گردیده و سپس لوله آزمایش مذکور به مدت ۵ دقیقه در یک حمام آب جوش و به دنبال آن به مدت ۵ دقیقه در یک حمام آب یخ قرار گرفت. پس از افزودن ۳ میلی لیتر آب مقطر به منظور رقیق سازی، جذب نمونه ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله یک اسپکتروفوتومتر^۴ خوانده شده و غلظت قندهای احیا آزاد شده بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید. به منظور اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم های پکتیناز تثبیت شده، روش بالا دقیقاً تکرار شد و تنها به جای آنزیم آزاد از ۱۰ گلوله شیشه ای حاوی آنزیم های تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف استفاده گردید.

¹ 3,5-dinitrosalicylic acid

² Miller

³ Galacturonic acid monohydrate

⁴ Spectrophotometer

۳-۱۰- بررسی اثر پی‌اچ روی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده

برای بررسی اثر پی‌اچ روی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده از بافرهای ۰/۱ مولار مختلف (پی‌اچ‌های ۲ تا ۸) در دمای واکنش ۵۰ درجه سلسیوس استفاده شد. بافرها شامل پتاسیم کلرید^۱ (KCl-HCl) برای پی‌اچ ۲، سدیم استات برای پی‌اچ‌های بین ۳ تا ۵/۵ و پتاسیم فسفات^۲ (KH₂PO₄-NaOH) برای پی‌اچ‌های ۶ تا ۸ بودند. روش آزمون بدین شکل بوده که ابتدا یک محلول یک درصد به‌وسیله حل شدن پکتین در بافرهای مختلف به دست آمد و سپس با روشی که در بخش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها بیان شد برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده استفاده گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌صورت فعالیت نسبی^۳ بیان شد به‌طوری‌که بیشترین فعالیت در پی‌اچ بهینه را ۱۰۰ درصد در نظر گرفته و میزان فعالیت در سایر پی‌اچ‌ها به‌صورت نسبتی از ۱۰۰ بیان گردید.

۳-۱۱- بررسی اثر پی‌اچ روی پایداری آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده

به‌منظور بررسی پایداری آنزیم‌ها در پی‌اچ‌های مختلف، ابتدا آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده به مدت ۳۰ دقیقه در بافرهای ۰/۱ مولار با پی‌اچ‌های بیان شده در آزمون قبلی قرار گرفتند و سپس واکنش هیدرولیز پکتین برای آنزیم‌های آزاد در پی‌اچ ۵ و برای آنزیم‌های تثبیت‌شده در پی‌اچ ۵/۵ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس انجام شد و میزان فعالیت باقیمانده^۴ به‌صورت درصد بیان گردید.

۳-۱۲- بررسی اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده

میزان فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در دماهای مختلف با انجام واکنش هیدرولیز پکتین در دماهای بین ۳۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در پی‌اچ ۵ برای آنزیم‌های آزاد و پی‌اچ ۵/۵ برای آنزیم‌های تثبیت‌شده اندازه‌گیری شد و نتایج به‌صورت فعالیت نسبی بیان گردید.

¹ Potassium chloride

² Potassium phosphate

³ Relative activity

⁴ Residual activity

۳-۳-۱۳- بررسی اثر دما روی پایداری آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده

برای اندازه‌گیری پایداری آنزیم‌ها در دماهای مختلف، ابتدا آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده به مدت صفر تا ۱۲۰ دقیقه در دماهای ۳۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس در داخل محلول‌های بافر با پی‌اچ ۴ قرار گرفته و سپس واکنش هیدرولیز پکتین در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در پی‌اچ ۵ برای آنزیم‌های آزاد و پی‌اچ ۵/۵ برای آنزیم‌های تثبیت شده انجام شد و در نهایت میزان فعالیت باقیمانده گزارش گردید.

۳-۳-۱۴- اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی^۱

ثابت میکائلیس-منتن^۲ (K_m) و حداکثر نرخ واکنش^۳ (V_{max}) برای آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده با استفاده از معادله لینویر-برک^۴ (معادله ۳) که شکل خطی معادله مونود^۵ است، اندازه‌گیری شد:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

در معادله فوق، $[S]$ غلظت پکتین می‌باشد (۲ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). همچنین لازم به ذکر است که واکنش آنزیمی به‌صورت آنچه در قسمت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده گفته شده بود، انجام شد.

۳-۳-۱۵- بررسی امکان استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده

برای بررسی امکان استفاده مجدد آنزیم‌های تثبیت شده به‌وسیله اتصال دهنده‌های عرضی مختلف، از کاربرد مکرر آنزیم‌های تثبیت شده برای هیدرولیز محلول پکتین استفاده شد. در تمام مراحل، واکنش هیدرولیز در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ (ایجاد شده به‌وسیله حل کردن پکتین در بافر سدیم استات ۰/۱ مولار) و زمان ۱۵ دقیقه انجام شد. روش کار بدین صورت بود که پس از هر مرحله واکنش، دانه‌های شیشه‌ای از داخل محیط واکنش خارج و پس

¹ Kinetic parameters

² Michaelis-Menten constant

³ Maximum reaction rate

⁴ Lineweaver-Burk

⁵ Monod equation

از شستشو با بافر سدیم استات در پی‌اچ ۴ دوباره به داخل محیط واکنش جدید وارد می‌شد. واکنش‌های هیدرولیز به تعداد ۱۵ مرتبه تکرار گردید و نتایج هر دوره به صورت فعالیت باقیمانده نسبت به مرتبه اول بیان گردید.

۳-۳-۱۶- تولید آب زرشک و انار

پس از تهیه انار و زرشک به ترتیب از یک باغ در مازندران و یک فروشگاه در کرج، این میوه‌ها به خوبی شستشو داده شده و در دمای محیط خشک گردیدند. سپس میوه انار با چاقو به دو قسمت تقسیم شد، درحالی که از زرشک دست‌نخورده برای آگیری استفاده گردید. در مرحله بعد، از یک دستگاه پرس دستی برای آگیری میوه‌ها استفاده گردید. پس از تولید، ابتدا آبمیوه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن^۱ شماره یک فیلتر شده و سپس تا استفاده بعدی در یخچال نگهداری شدند.

۳-۳-۱۷- طراحی و ساخت بیوراکتور بستر ثابت

برای انجام فرایند مداوم، یک بیوراکتور ساخته شده از استوانه شیشه‌ای دوجداره با قطر داخلی ۱۴ میلی‌متر و ارتفاع ۱۵۰ میلی‌متر مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳-۳). این بیوراکتور به وسیله ۲۳ سانتی‌متر مکعب دانه شیشه‌ای (حدود ۱۰۰ دانه شیشه‌ای) به خوبی پر شده و از آن برای هیدرولیز مداوم محلول پکتین و یا شفاف سازی مداوم آبمیوه‌های مختلف استفاده گردید. در جدار داخلی، محلول پکتین ۱ درصد حجمی/وزنی و یا آب انار یا آب زرشک از پایین به بالا به وسیله یک پمپ جریان یافت، درحالی که در جدار بیرونی آب به منظور تنظیم دما در جریان بوده است (شکل ۳-۴). همچنین، میزان حجم خالی^۲ بیوراکتور به وسیله کم کردن حجم واقعی^۳ ۱۱۰ دانه شیشه‌ای (۱۲/۴۳ سانتی‌متر مکعب) از حجم کل^۴ بیوراکتور (۲۳/۰۸ سانتی‌متر مکعب) برابر با ۱۰/۶۵ سانتی‌متر مکعب به دست آمد. محاسبه حجم خالی برای محاسبه زمان ماند^۵ سوبسترا در بیوراکتور که در بخش بعد توضیح داده خواهد شد، ضروری است.

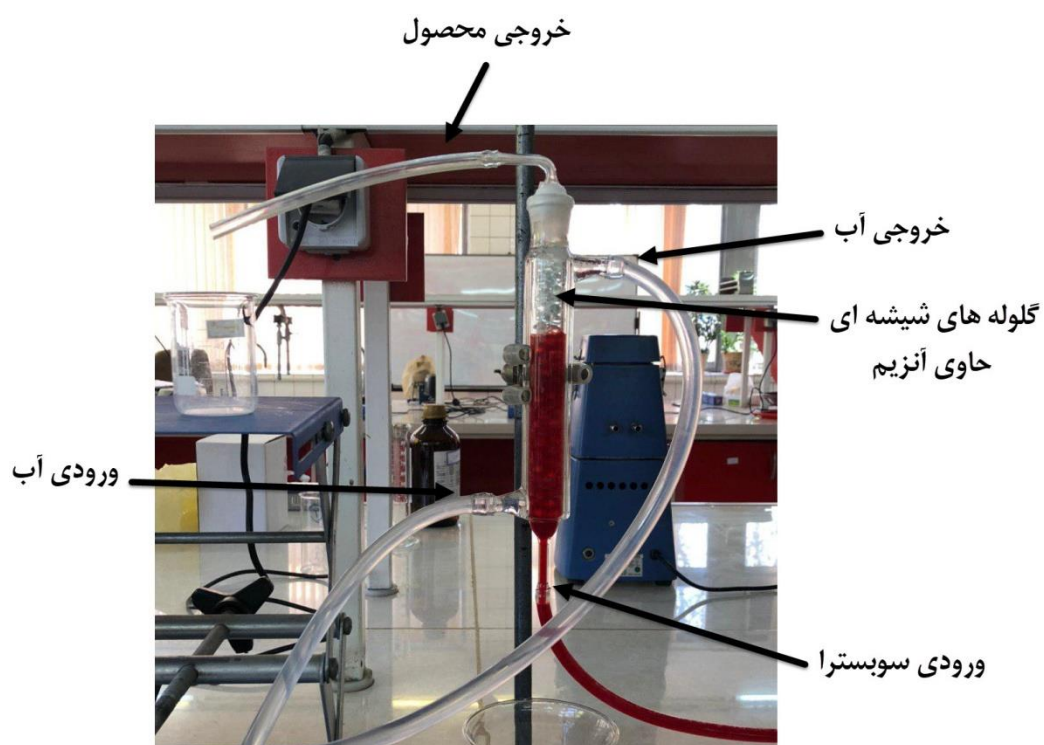
^۱ Whatman filter paper

^۲ Void volume

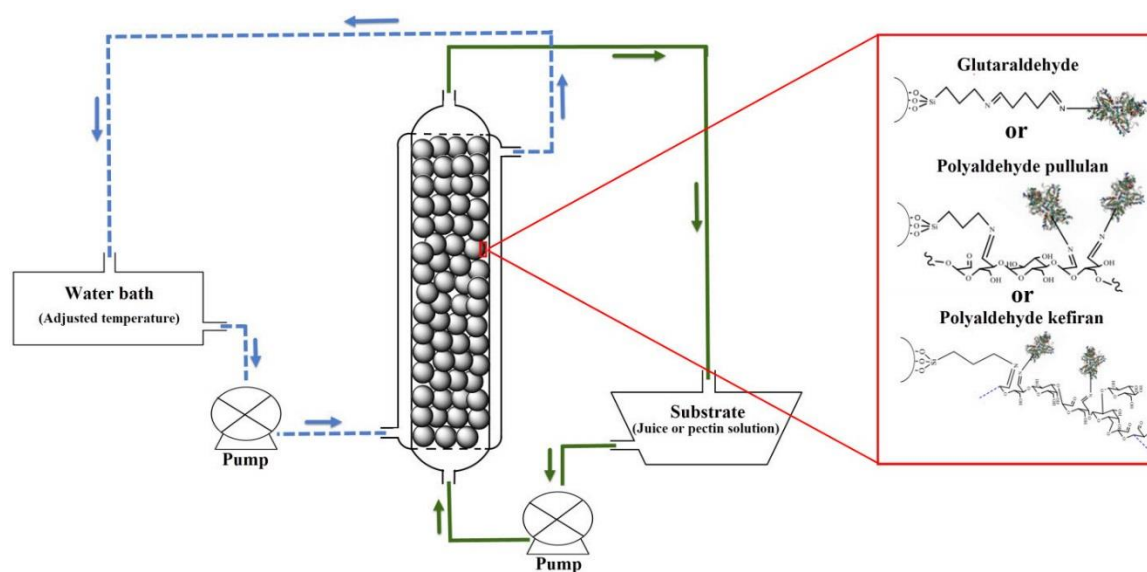
^۳ Actual volume

^۴ Total volume

^۵ Residence time



شکل ۳-۳- بیوراکتور بستر ثابت استفاده شده در این پژوهش



شکل ۳-۴- نمای کلی از بیوراکتور و همچنین نحوه فرایند مداوم مورد استفاده در این پژوهش

۳-۱۸- تأثیر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت

برای بررسی اثر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت، این فاکتور از ۰/۱ تا ۱۰ میلی لیتر بر دقیقه متغیر در نظر گرفته شده درحالی که پی‌اچ محلول یک درصد حجمی/وزنی پکتین و دمای فرایند در ۳ و ۵۰ درجه سلسیوس ثابت در نظر گرفته شد. درنهایت، میزان قند احیا موجود در نمونه‌ها با استفاده از روش DNS همان‌طور که قبلاً بیان شد، اندازه‌گیری شده و به‌صورت میلی گرم بر میلی لیتر گزارش گردید. لازم به ذکر است که مدت‌زمان ماند در هر نرخ جریان با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Residence time (min)} = \frac{V_V}{F} \quad (4)$$

در معادله بالا، V_V حجم خالی بیوراکتور بر حسب میلی لیتر و F نرخ جریان بر حسب میلی لیتر بر دقیقه می‌باشد.

۳-۱۹- بررسی اثر زمان فرایند روی شفاف سازی آبمیوه‌ها در بیوراکتور بستر ثابت

برای تعیین بهترین زمان فرایند، این فاکتور بین صفر تا ۱۰۵ دقیقه ثابت در نظر گرفته شده درحالی که نرخ جریان آب انار و زرشک در ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و دما در ۵۰ درجه سلسیوس ثابت در نظر گرفته شد. در این آزمون، آبمیوه‌ها به‌عنوان سوبسترا در نظر گرفته شدند و کدورت بر حسب واحد کدورت نفلومتریکی (NTU)^۱ به‌عنوان پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، پس از فرایند شفاف سازی آبمیوه‌ها در مدت‌زمان‌های مختلف، کدورت نمونه‌ها به‌وسیله یک دستگاه کدورت‌سنج^۲ اندازه‌گیری شد.

۳-۲۰- بهره‌وری حجمی^۳ آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم

در فرایند غیر مداوم، بهره‌وری حجمی آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف با افزودن ۵۶ میکرولیتر آنزیم آزاد یا ۲۳ سانتی متر مکعب از آنزیم‌های تثبیت‌شده به ۱۰/۶۵ میلی لیتر از محلول پکتین یک درصد حجمی/وزنی و انجام واکنش هیدرولیز در شرایط بهینه محاسبه‌شده در بخش‌های قبلی مورد بررسی قرار

¹ Nephelometric turbidity unit

² Turbidimeter

³ Volumetric productivity

گرفته و نهایتاً میزان این پارامتر بر حسب میلی گرم قند احیا تولیدشده بر میلی لیتر محیط واکنش بر دقیقه گزارش شد ($\text{mg mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$). در شرایط مداوم در بیوراکتور نیز بهره‌وری حجمی بر اساس معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{Volumetric productivity (mg mL}^{-1} \text{ min}^{-1}) = R \times \frac{1}{\text{Residence time}} \quad (5)$$

در معادله فوق، R میلی گرم قند احیا تولیدشده بر میلی لیتر است.

۳-۳-۲۱- شفاف سازی آنزیمی آبمیوه‌ها

برای شفاف سازی آب انار و آب زرشک، آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم مورد استفاده قرار گرفتند. در فرایند غیر مداوم، ۵۶ میکرولیتر از آنزیم‌های آزاد و یا ۲۳ سانتی متر مکعب از آنزیم‌های تثبیت شده روی گلوله‌های شیشه‌ای در ۱۰/۶۵ میلی لیتر آبمیوه شناور شده و فرایند شفاف سازی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای آب انار و ۶۳ دقیقه برای آب زرشک انجام شد. در مورد فرایند مداوم شفاف سازی آبمیوه‌ها نیز دقیقاً همین شرایط به همراه نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت اثر شفاف سازی روی خصوصیات مختلف آبمیوه‌ها بررسی شد. تیمارهای استفاده شده برای آب انار و زرشک در جداول ۳-۳ آورده شده است.



جدول ۳-۳- تیمارهای بکار رفته برای شفاف سازی آب انار و زرشک

شماره تیمار	نوع تیمار	مخفف
<i>آب انار</i>		
۱	تیمار نشده (نمونه کنترل)	UPJ
۲	شفاف شده به وسیله آنزیم های آزاد	PFB
۳	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم	PGB
۴	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم	PGC
۵	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم	PPB
۶	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم	PPC
۷	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم	PKB
۸	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم	PKC
<i>آب زرشک</i>		
۱	تیمار نشده (نمونه کنترل)	UBJ
۲	شفاف شده به وسیله آنزیم های آزاد	BFB
۳	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم	BGB
۴	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم	BGC
۵	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم	BPB
۶	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم	BPC
۷	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم	BKB
۸	شفاف شده با استفاده از آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم	BKC

۳-۲۲- بررسی خصوصیات آبمیوه های شفاف شده و نشده

در این پژوهش، آبمیوه ها شفاف شده و نشده بر اساس آزمون های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

۳-۲۲-۱- کدورت

کدورت نمونه های مختلف با استفاده از یک کدورت سنج در دمای اتاق اندازه گیری شده و نتایج به بر اساس

NTU گزارش گردید.



۳-۲۲-۲- شفافیت

برای بررسی شفافیت، از یک اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر استفاده شد. بدین منظور، ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر ۵ مرتبه رقیق شده و سپس درصد عبور ^۱(%T) بر اساس معادله زیر محاسبه گردید.

$$\%T = 10^{(2-Absorbance)} \quad (6)$$

۳-۲۲-۳- پی‌اچ

پی‌اچ نمونه‌های شفاف شده و نشده به‌وسیله یک پی‌اچ متر در دمای اتاق اندازه‌گیری شد.

۳-۲۲-۴- اسیدیته

اسیدیته کل قابل تیتراسیون (TTA)^۲، با تیتر کردن نمونه‌های آبمیوه با سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال در حضور فنل‌فتالئین^۳ به‌عنوان معرف به دست آمد. درنهایت، نتایج برای آب انار بر حسب درصد حجمی/وزنی سیتریک اسید و برای آب زرشک بر حسب درصد حجمی/وزنی مالیک اسید^۴ گزارش شد.

۳-۲۲-۵- مواد جامد محلول کل

مواد جامد محلول کل (TSS)^۵ به‌وسیله یک انکسارسنج^۶ در دمای اتاق اندازه‌گیری شده و بر حسب درجه بریکس (°Brix) گزارش گردید.

۳-۲۲-۶- محتوای قند احیاء

محتوای قند احیاء با استفاده از روش DNS اندازه‌گیری شده و بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید.

¹ Transmittance percentage

² Total titratable acidity

³ Phenolphthalein

⁴ Malic acid

⁵ Total soluble solids

⁶ Refractometer

۳-۲۲-۷- ویسکوزیته

ویسکوزیته نمونه‌های آبمیوه به وسیله یک ویسکومتر^۱ در دمای اتاق و در نرخ جریان ۵۰ دور بر دقیقه اندازه‌گیری شده و نتایج بر حسب میلی پاسکال ثانیه گزارش گردید.

۳-۲۲-۸- تست حضور پکتین

به منظور بررسی حضور پکتین، اتانول سرد به نسبت ۲ به ۱ حجمی/حجمی به آبمیوه‌ها اضافه شده و نمونه‌های حاوی الکل به مدت ۲۴ ساعت در دمای حدود ۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از این زمان، حضور یا عدم حضور رسوب یا حالت ابری به ترتیب نشان‌دهنده حضور یا عدم حضور پکتین است.

۳-۲۲-۹- محتوای فنول کل

محتوای فنول کل (TPC)^۲ آبمیوه‌ها با روش فولین-سیوکالچو^۳ اندازه‌گیری شد (کازمی^۴ و همکاران، ۲۰۱۹a). بدین منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر آبمیوه با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول معرف فولین-سیوکالچو ۱۰ درصد حجمی/حجمی و ۰/۴ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات^۵ ۱۰ درصد حجمی/وزنی مخلوط شده و محلول به‌دست‌آمده به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. در مرحله بعد، جذب نمونه‌ها به وسیله یک دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شده و محتوای فنول کل با مقایسه جذب به‌دست‌آمده با منحنی استاندارد گالیک اسید (۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) محاسبه گردید. در نهایت، محتوای فنول کل بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والانت بر میلی‌لیتر آبمیوه (mg GAE/mL) گزارش شد.

¹ Viscosity

² Total phenol content

³ Folin-Ciocalteu

⁴ Kazemi

⁵ Sodium carbonate

۳-۲۲-۱۰- مپار رادیکال‌های آزاد ۱، ۱- دی فنیل-۲-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)^۱

برای محاسبه قدرت مپار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق‌شده آب انار (۵۰ برابر با آب مقطر) و آب زرشک (۲۰۰ برابر با آب مقطر) به ۱/۹ میلی‌لیتر از محلول اتانولیک DPPH ۰/۱ میلی‌مولار اضافه شده و مخلوط به‌دست‌آمده ورتکس گردید. در مرحله بعد، نمونه‌های به‌دست‌آمده به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و سپس جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درنهایت، درصد مپار رادیکال‌های آزاد (DPPH-RSA) (%) بر اساس معادله زیر محاسبه گردید (حسینی^۲ و همکاران، ۲۰۲۰):

$$\text{DPPH} - \text{RSA} (\%) = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (7)$$

۳-۲۲-۱۱- مپار رادیکال‌های آزاد ۲، ۲-آزینوبیس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-۶-سلفونیک اسید) (ABTS)^۳

برای بررسی قدرت مپار رادیکال‌های آزاد ABTS، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های رقیق‌شده آب انار (۵۰ برابر با آب مقطر) و آب زرشک (۲۰۰ برابر با آب مقطر) به ۱/۹ میلی‌لیتر از محلول ABTS اضافه و پس از ۴۵ دقیقه نگهداری در محیط تاریک، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر خواند شد. برای تولید محلول رادیکال‌های آزاد ABTS، ۷/۴ میلی‌مولار از محلول ABTS با ۲/۶ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات مخلوط شده و پس از ۱۸ ساعت نگهداری در تاریکی، جذب آن در ۷۳۴ نانومتر با استفاده از آب مقطر روی 0.02 ± 0.07 تنظیم گردید. درنهایت، درصد مپار رادیکال‌های آزاد ABTS (ABTS-RSA (%)) بر اساس معادله زیر محاسبه شد (حسینی و همکاران، ۲۰۲۰):

$$\text{ABTS} - \text{RSA} (\%) = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (8)$$

¹ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

² Hosseini

³ 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid



۳-۳-۲۲-۱۲- پارامترهای رنگی

پارامترهای رنگی L (شاخص روشنایی)، a (شاخص سبز - قرمز) و b (شاخص آبی - زرد) با استفاده از یک رنگ سنج^۱ در دمای اتاق اندازه گیری شدند.

۳-۳-۲۳- آنالیز آماری

تحلیل و ارزیابی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. همچنین برای تعیین معنی دار بودن اختلاف موجود بین میانگین ها (حداقل سه تکرار) از آنالیز یک طرفه واریانس (one-way ANOVA) به روش دانکن استفاده گردید.

¹ Color reader

فصل چہارم

نتیجہ و بحث

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- اندازه گیری محتوای آلدهیدی پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی

اکسیداسیون به وسیله سدیم پریودات یک از روش های صنعتی معروف برای تولید سلولز و نشاسته اصلاح شده می باشد (گو^۱ و همکاران، ۲۰۱۴). در این روش، یون های پریودات به مونوساکاریدهای سازنده یک پلی ساکارید حمله کرده و سبب شکستن پیوندهای کربن - کربن و باز شدن حلقه های مونوساکاریدی و ایجاد گروه های آلدهیدی آزاد می شوند که می توانند برای تثبیت آنزیم ها روی سطوح مختلف استفاده شوند (خولیا^۲ و همکاران، ۲۰۱۶؛ مو^۳ و همکاران، ۲۰۱۲). در طول این فرایند، بسته به نوع پلی ساکارید، وزن مولکولی، غلظت سدیم پریودات مورد استفاده و شرایط واکنش تعداد متفاوتی از گروه های آلدهیدی آزاد تشکیل می شود (بورجسون و همکاران، ۲۰۱۸؛ گو و همکاران، ۲۰۱۴). به هر حال، همیشه رابطه مستقیمی بین مقدار یون پریودات مصرف شده و محتوای آلدهیدی وجود ندارد که این به خاطر تشکیل همی استال در اثر واکنش بین گروه های آلدهیدی آزاد و گروه های هیدروکسیل مجاور می باشد (گوپتا^۴ و همکاران، ۲۰۱۳؛ کیم^۵ و همکاران، ۲۰۰۴). در این پژوهش، از روش اکسیداسیون برای ایجاد گروه های آلدهیدی آزاد روی پلی ساکاریدهای پولولان و کفیران استفاده شد. همان طور که در جدول ۴-۱ نشان داده شده است، پس از پایان فرایند اکسیداسیون و تشکیل پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی، میزان محتوای آلدهیدی پولولان و کفیران پلی آلدهید به ترتیب برابر با $1/3 \pm 19/9$ و $23/6 \pm 0/9$ درصد بوده است. به نظر می رسد که بیشتر بودن محتوای آلدهیدی کفیران پلی آلدهید مربوط به بالاتر بودن وزن مولکولی آن می باشد، زیرا که شرایط استفاده شده برای فرایند اکسیداسیون در مورد هر دو پلی ساکارید ثابت بوده است. لازم به ذکر است که با توجه به فرمول اندازه گیری محتوای آلدهیدی (همان طور که در بخش مواد و روش ها بیان شد)، وزن مولکولی پلی ساکاریدها رابطه مستقیم با محتوای آلدهیدی دارد. در تحقیقی مشابه، گو و همکاران (۲۰۱۴) از روش مذکور برای اصلاح صمغ

¹ Guo

² Kholiya

³ Mu

⁴ Gupta

⁵ Kim

زانتان استفاده کردند و گزارش کردند که پس از فرایند اکسیداسیون، محتوای آلدهیدی این صمغ برابر با حدود ۲۲/۵۲ درصد بوده که از پولولان پلی آلدهید بیشتر و از کفیران پلی آلدهید کمتر بوده است.

جدول ۴-۱- محتوای آلدهیدی پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی مورد استفاده در این تحقیق

نوع پلی ساکارید پلی آلدهیدی	محتوای آلدهیدی (درصد)
پولولان پلی آلدهید	19.9 ± 1.3^b
کفیران پلی آلدهید	23.6 ± 0.9^a

*حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0.05$).

۴-۲- برای طیف های FTIR پلی ساکاریدها قبل و بعد از اکسیداسیون

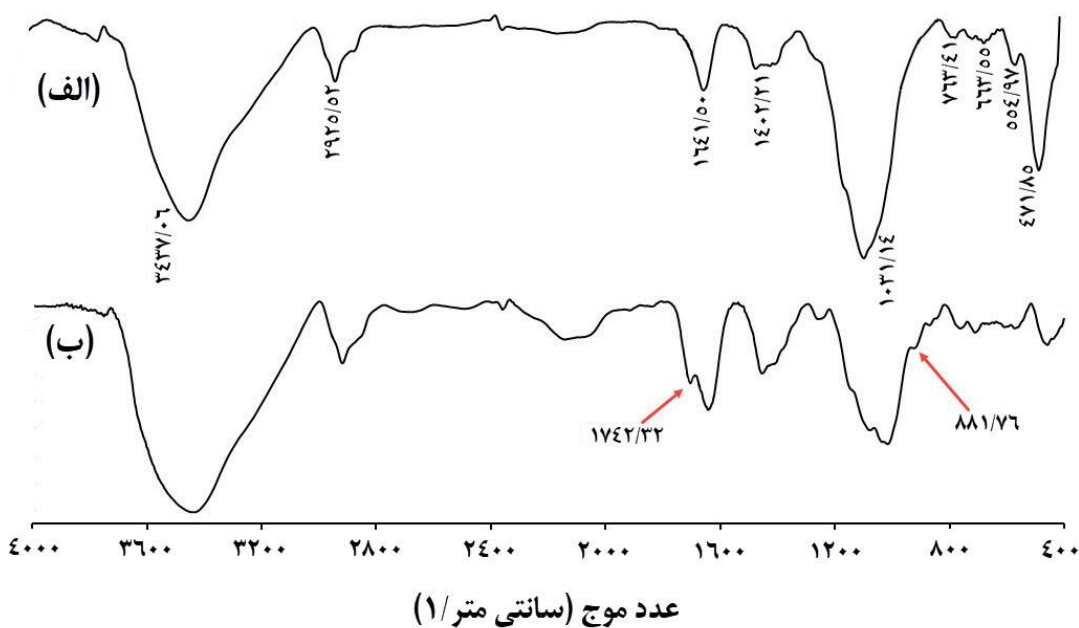
شکل ۴-۱، طیف FTIR اگزوپلی ساکارید پولولان را قبل و بعد از اکسیداسیون نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، چندین پیک عمومی در هر دو طیف وجود دارد که شامل سیگنال های موجود در عدد موج های ۳۴۳۷/۰۶، ۲۹۲۵/۵۲، ۱۶۴۱/۵۰، ۱۴۰۲/۲۱، ۱۰۳۱/۱۴ و ۶۶۳/۵۵ بر سانتی متر بوده که به ترتیب مربوط به گروه های O-H، O-C-O، C-O-H، C-O و آلفا-گلیکوپیرانوزهای موجود در ساختار پولولان می باشند (چادوری^۱ و همکاران، ۲۰۱۱؛ حقیقت پناه^۲ و همکاران، ۲۰۲۰، کاظمی و همکاران، ۲۰۱۹b؛ سوگوماران^۳ و همکاران، ۲۰۱۴). همان طور که در شکل ۴-۱(ب) مشاهده می شود، بعد از فرایند اکسیداسیون دو پیک جدید در نواحی ۱۷۴۲/۳۲ و ۸۸۱/۷۶ بر سانتی متر ایجاد شد که به ترتیب مربوط به گروه های آلدهیدی آزاد و پیوندهای همی استال می باشند (فان^۴ و همکاران، ۲۰۰۱؛ خولیا و همکاران، ۲۰۱۶).

¹ Choudhury

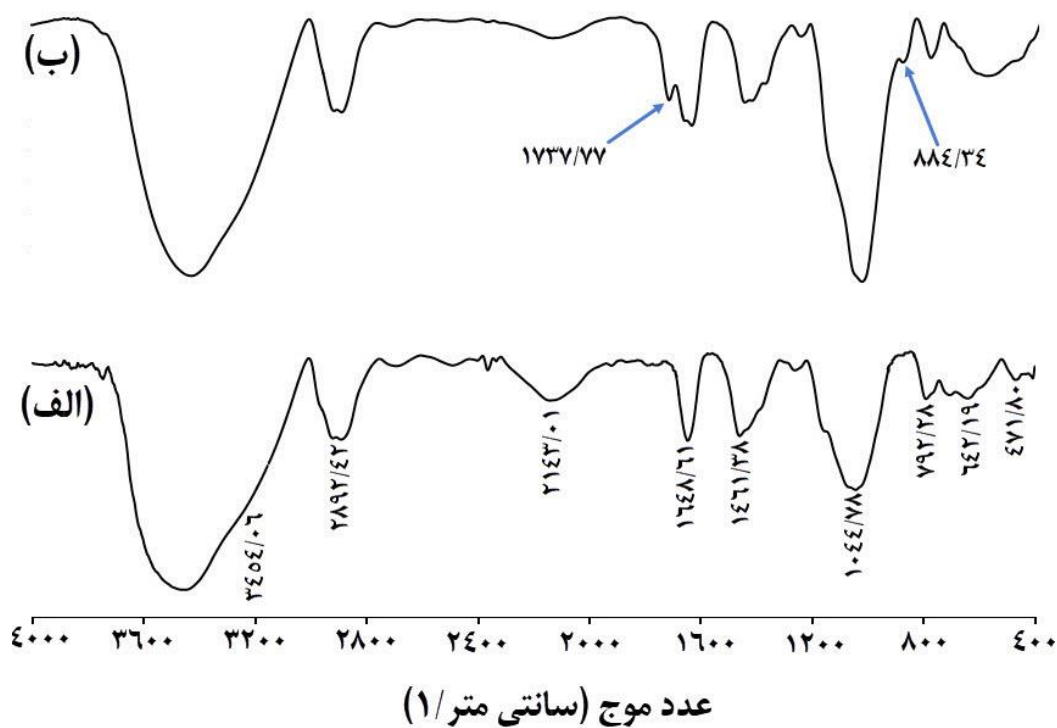
² Haghighatpanah

³ Sugumaran

⁴ Fan



شکل ۴-۱- طیف‌های FTIR پولولان (الف) قبل و (ب) بعد از فرایند اکسیداسیون



شکل ۴-۲- طیف‌های FTIR کفیران (الف) قبل و (ب) بعد از فرایند اکسیداسیون

شکل ۴-۲، مربوط به طیف FTIR کفیران قبل و بعد از فرایند اکسیداسیون می باشد. در این دو طیف نیز تعدادی پیک مشابه مشاهده می شود که مربوط به ساختار پلی ساکارید کفیران است. سیگنال بزرگ در دامنه ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ بر سانتی متر مربوط به ارتعاشات گروه های هیدروکسیل در ساختار پلی ساکارید است (کاظمی^۱ و همکاران، ۲۰۱۹). پیک موجود در ۲۸۹۲/۴۲ بر سانتی متر مربوط به گروه های C-H موجود در ساختار CH، CH₂ و CH₃ می باشد (پسندیده^۲ و همکاران، ۲۰۱۸). پیک موجود در ۱۶۴۸/۶۱ بر سانتی متر مربوط به باندهای O-H مولکول های آب است. سرانجام پیک های موجود در دامنه ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ بر سانتی متر، به عنوان ناحیه اثر انگشت، مربوط به حلقه های کربوهیدراتی و گروه های جانبی شامل C-O-C و C-OH می باشند (قاسملو^۳ و همکاران، ۲۰۱۱). در این شکل نیز، دو پیک جدید در صمغ اصلاح شده مشاهده می شود که مربوط به گروه های آلدهیدی آزاد (حدود ۱۷۳۷ بر سانتی متر) و باندهای همی استال (حدود ۸۸۴ بر سانتی متر) است (لی^۴ و همکاران، ۲۰۱۱). در نهایت، هر دو شکل (۴-۱ و ۴-۲) تأیید کردند که پس از فرایند اکسیداسیون به وسیله سدیم پریدات گروه های آلدهیدی آزاد در ساختار پولولان و کفیران ایجاد شده است.

۴-۳- بررسی مورفولوژی سطحی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی

در این بخش، از عکس های SEM برای بررسی مورفولوژی سطحی گلوله های شیشه ای قبل و بعد از تثبیت آنزیم به وسیله پولولان و کفیران پلی آلدهید استفاده شد (شکل ۴-۳ و ۴-۴). همان طور که مشاهده می شود، قبل از فرایند تثبیت، سطح شیشه کاملاً صاف و بدون هیچ گونه بی نظمی می باشد، در حالی که پس از تثبیت، حضور رشته های پلیمری پولولان و کفیران پلی آلدهید روی سطح شیشه ها به وضوح مشخص می باشد که تأیید کننده تثبیت موفقیت آمیز آنزیم های پکتیناز می باشد. این نتایج همچنین در تطابق با گزارشات قبلی به وسیله سایر محققین بوده است (رهمان و همکاران، ۲۰۱۶؛ بیلال^۵ و همکاران، ۲۰۱۷). در تحقیقی مشابه، مارچیس^۶ و همکاران (۲۰۱۲) بیان

¹ Kazemi

² Pasandide

³ Ghasemlou

⁴ Li

⁵ Bilal

⁶ Marchis

داشتند که تثبیت پروکسیداز به وسیله گلو تار آلدهید منجر به ایجاد بی نظمی گسترده ای روی سطح گلوله های شیشه ای شده است.

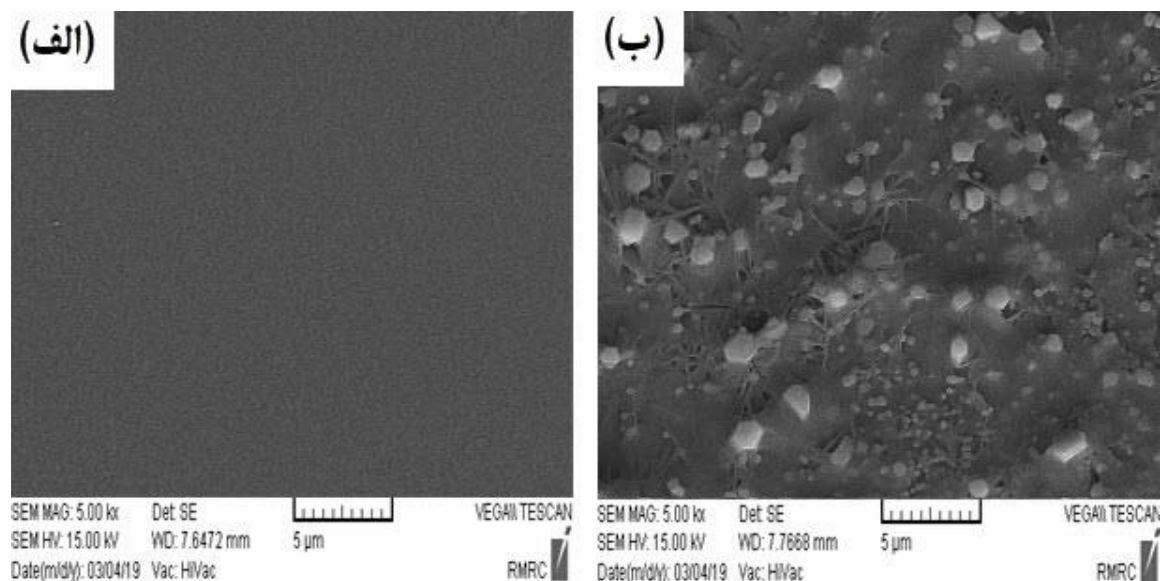
۴-۴- بررسی توپوگرافی سطحی به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی

شکل های ۴-۵ و ۴-۶ به ترتیب تصاویر AFM مربوط به سطح شیشه ها قبل و بعد از تثبیت آنزیم های پکتیناز به وسیله پولولان و کفیران پلی آلدهید می باشند. همان طور که مشاهده می شود، در اثر فرایند تثبیت، سطح یکنواخت گلوله های شیشه ای کاملاً غیر یکنواخت شده که مربوط به حضور شبکه پلیمری و آنزیم های پکتیناز روی سطح شیشه ها است. این نتایج همچنین در تطابق با مشاهدات مربوط به تصاویر SEM نیز بوده است. بعلاوه، نتایج به دست آمده در این بخش مشابه با گزارشات مربوط به تصاویر AFM به دست آمده از سلولاز تثبیت شده روی فیلم پلی استایرن^۱ (هایرش^۲ و همکاران، ۲۰۱۰) و گلوکز اکسیداز تثبیت شده روی سطح سیلیکون دی اکسید (لیبرتینو^۳ و همکاران، ۲۰۰۸) بوده است.

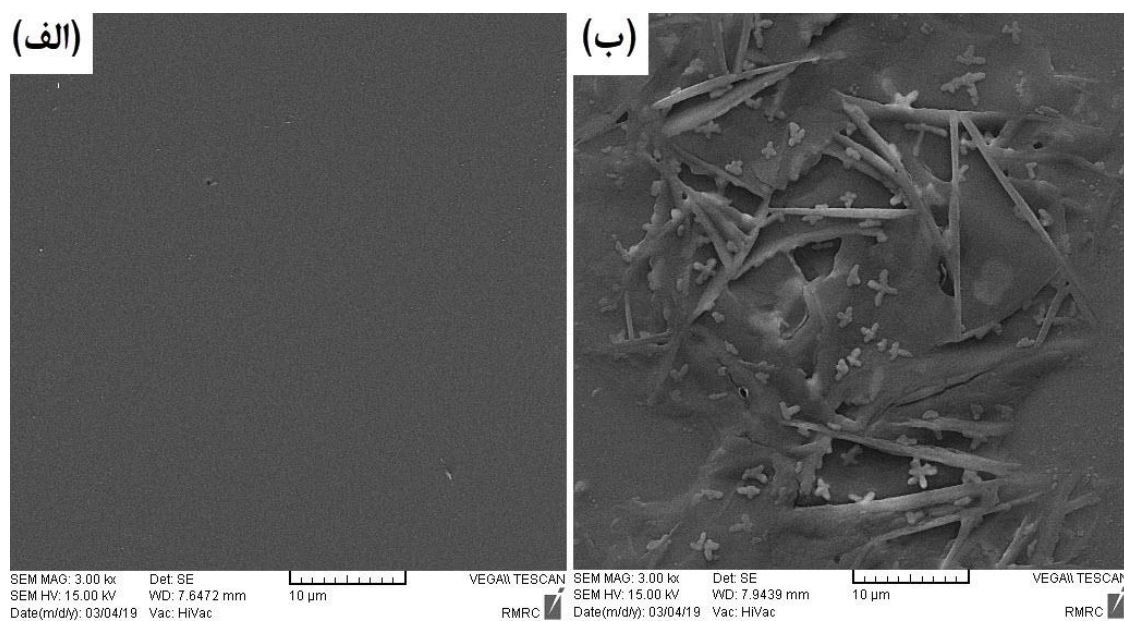
¹ Polystyrene

² Hirsh

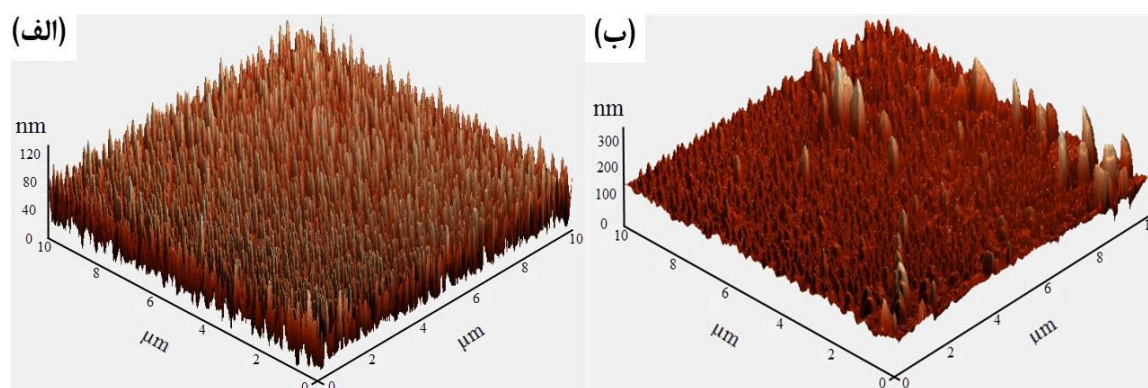
³ Libertino



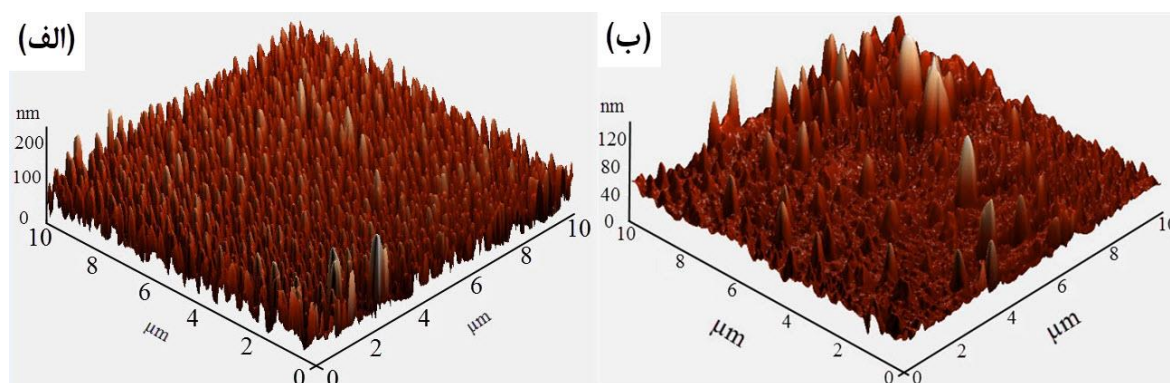
شکل ۴-۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله پولولان پلی آلدهید



شکل ۴-۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله کفیران پلی آلدهید



شکل ۴-۵- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله پولولان پلی آلدهید



شکل ۴-۶- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی از سطح شیشه (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم به وسیله کفیران پلی آلدهید

۴-۵- محتوای پروتئینی گلوله های شیشه ای حاوی آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف

در جدول ۴-۲، محتوای پروتئینی گلوله های شیشه ای حاوی آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، محتوای پروتئینی گلوله های شیشه ای حاوی آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید به ترتیب برابر با

0.05 ± 0.41 ، 0.21 ± 1.83 و 0.86 ± 5.25 میلی گرم بر ده گلوله شیشه‌ای بوده است. بیشتر بودن محتوای پروتئینی گلوله‌های شیشه‌ای حاوی پولولان پلی‌آلدهید و کفیران پلی‌آلدهید نسبت به گلوله‌های شیشه‌ای حاوی گلوکارآلدهید قابل پیش‌بینی بوده است، زیرا که این اتصال‌دهنده‌های عرضی حاوی گروه‌های آلدهیدی آزاد بیشتری نسبت به گلوکارآلدهید می‌باشند. از طرفی، همان‌طور که مشاهده می‌شود محتوای پروتئینی گلوله‌های حاوی کفیران پلی‌آلدهید به‌طور معنی‌داری بیشتر از گلوله‌های حاوی پولولان پلی‌آلدهید است که این نتیجه را می‌توان به دو عامل نسبت داد: اول اینکه همان‌طور که در جدول ۴-۱ نشان داده شد، محتوای آلدهیدی کفیران پلی‌آلدهید به‌مراتب بیشتر از پولولان پلی‌آلدهید است که نشان می‌دهد این اتصال‌دهنده ظرفیت بالاتری در تثبیت آنزیم دارد و دوم اینکه با توجه به شاخه‌دار بودن پلی‌ساکارید کفیران و ایجاد دافعه استریک^۱ امکان چسبیدن رشته‌های آن به یکدیگر کمتر بوده و این باعث می‌شود که فضای کافی برای حرکت آنزیم‌ها در طول رشته‌های اتصال‌دهنده عرضی و در نتیجه اتصال آن با گروه‌های آلدهیدی آزاد بیشتر فراهم باشد و این در حالی است که پولولان یک پلیمر خطی بوده و دارای چنین ویژگی نمی‌باشد.

جدول ۴-۲- محتوای پروتئینی گلوله‌های شیشه‌ای حاوی آنزیم‌های پکتیناز تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف

نوع اتصال‌دهنده عرضی	محتوای پروتئینی (میلی گرم بر ده گلوله شیشه‌ای)
گلوکارآلدهید	0.41 ± 0.05^c
پولولان پلی‌آلدهید	1.83 ± 0.21^b
کفیران پلی‌آلدهید	5.25 ± 0.86^a

*حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).

¹ Steric repulsion

۴-۶- اثر پی‌اچ روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده

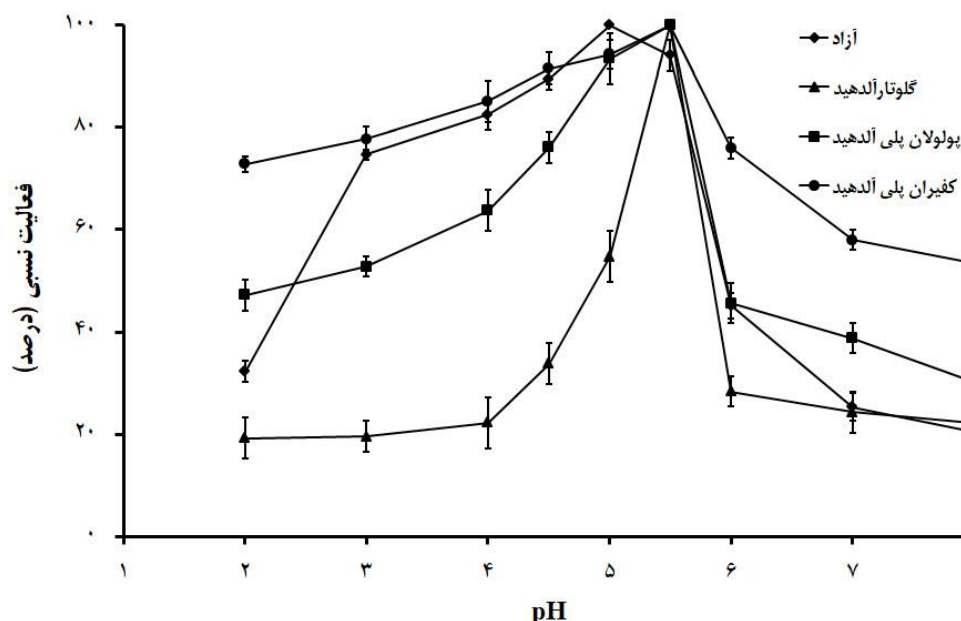
بهینه‌سازی پی‌اچ یکی از مهم‌ترین مراحل برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های تثبیت‌شده می‌باشد. در این بخش، فعالیت پکتینازهای آزاد و تثبیت‌شده در پی‌اچ‌های مختلف بر اساس فعالیت نسبی بیان گردید، به‌طوری‌که حداکثر فعالیت در پی‌اچ بهینه ۱۰۰ درصد و فعالیت در سایر پی‌اچ‌ها به‌عنوان نسبتی از ۱۰۰ بیان گردید (د الیورا^۱ و همکاران، ۲۰۱۸b). در شکل ۴-۷، فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در پی‌اچ‌های مختلف و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۱۵ دقیقه نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، حداکثر فعالیت پکتیناز آزاد در پی‌اچ ۵ به دست آمد، درحالی‌که این پارامتر برای آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف برابر با ۵/۵ بوده است. تغییر پی‌اچ بهینه آنزیم‌ها پس از تثبیت به نوع آنزیم و ساختار اتصال‌دهنده عرضی مورد استفاده بستگی دارد. به‌هرحال، گزارش شده است که تغییر در پی‌اچ بهینه آنزیم پکتیناز می‌تواند به افزایش پایداری ساختار فضایی آنزیم‌ها در اثر فرایند تثبیت مربوط باشد (رهمان و همکاران، ۲۰۱۴b). این نتایج در تطابق با گزارشات د الیورا و همکاران (۲۰۱۸) بوده است. این محققین بیان داشتند که پی‌اچ بهینه آنزیم‌های پکتیناز با تثبیت آن‌ها در بیده‌های آلزینات تغییر کرده است. همچنین مطالعات نشان دادند که نوع آنزیم پکتیناز، اتصال‌دهنده عرضی و ساپورت مورد استفاده می‌تواند روی پی‌اچ بهینه بسیار مؤثر باشد، برای مثال، لی و جیانگ^۲ (۲۰۱۱) گزارش کردند که پی‌اچ بهینه برای آنزیم‌های پکتیناز تثبیت‌شده روی ریزکره‌های پلی‌اکریل‌امیدی برابر با ۳/۵ بوده است، درحالی‌که، این پارامتر برای پکتیناز تثبیت‌شده روی دلبید دی دابلیو آر^۳ به‌وسیله دکستران آلدهید برابر با ۵ بوده است (راجدو^۴ و همکاران، ۲۰۱۶).

¹ de Oliveira

² Lei and Jiang

³ Dilbead VWR

⁴ Rajdeo

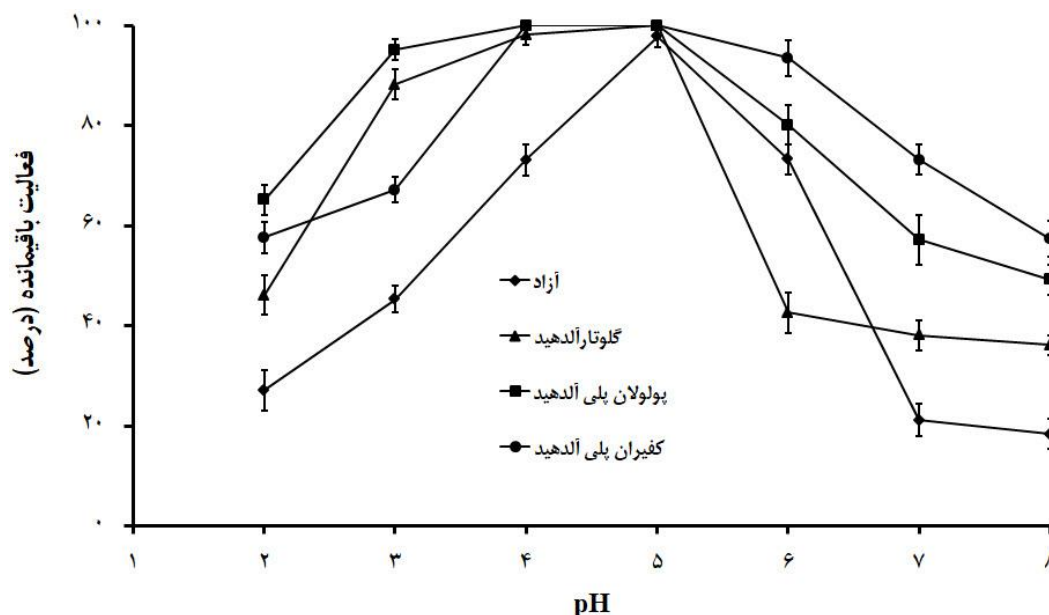


شکل ۴-۷- اثر پی‌اچ روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوآرآلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه انجام شد)

۴-۷- اثر پی‌اچ روی پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده

یکی از مهم‌ترین دلایل تثبیت آنزیم‌ها افزایش پایداری آن‌ها می‌باشد. شکل ۴-۸، اثر پی‌اچ روی پایداری آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده را نشان می‌دهد. در این بخش نتایج بر اساس فعالیت باقیمانده گزارش شده است به طوری که میزان فعالیت اولیه آنزیم‌ها در هر پی‌اچ ۱۰۰ درصد و میزان باقیمانده فعالیت آن‌ها پس از زمان انکوباسیون بر اساس روش بیان شده در بخش مواد و روش‌ها به عنوان کسری از ۱۰۰ بیان گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پس از تثبیت، پایداری آنزیم‌ها در پی‌اچ‌های مختلف به طور معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین در بین آنزیم‌های تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده عرضی مختلف، بیشترین پایداری مربوط به پکتینازهای تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدئید بوده است. اینکه فرایند تثبیت سبب افزایش پایداری آنزیم‌ها می‌شود توسط تحقیقات مختلفی گزارش شده است (لی^۱ و همکاران، ۲۰۰۷؛ رهمان و همکاران، ۲۰۱۴a).

¹ Li

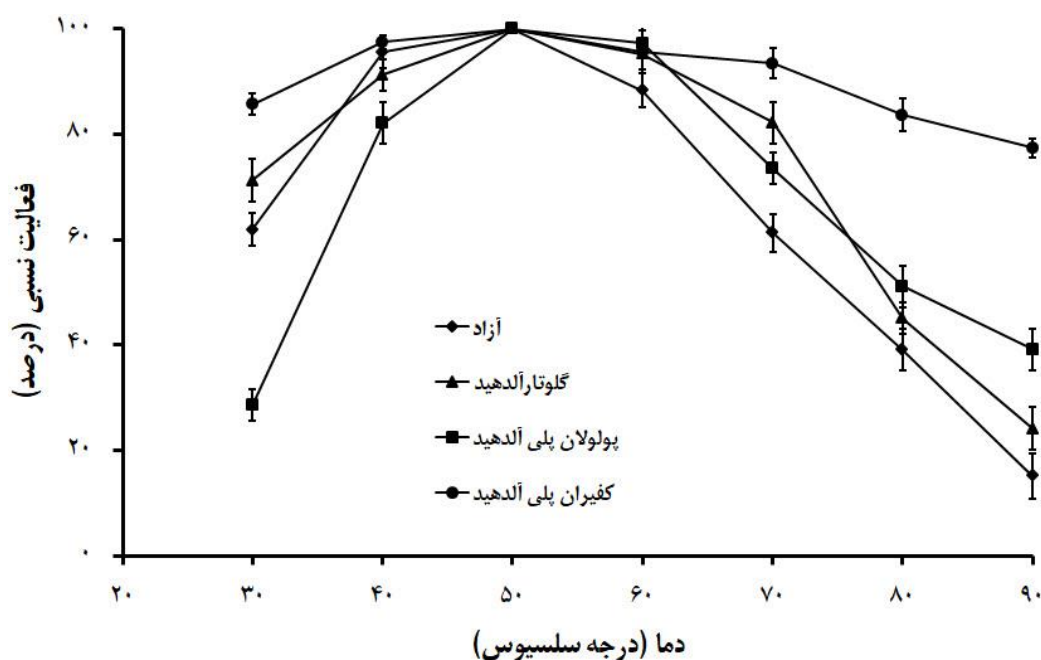


شکل ۴-۸- پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوتار آلانید، پولولان پلی آلانید و کفیران پلی آلانید در پی‌اچ‌های مختلف (پس از انکوبه کردن در پی‌اچ‌های مختلف، از دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای انجام واکنش هیدرولیز به وسیله آنزیم‌های آزاد و از دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای انجام واکنش هیدرولیز به وسیله آنزیم‌های تثبیت شده استفاده شد)

۴-۸- اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده

شکل ۴-۹، اثر دماهای ۳۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس را روی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش دما از ۳۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم‌ها افزایش و سپس با ادامه افزایش دما تا ۹۰ درجه سلسیوس کاهش یافت. بنابراین می‌توان بیان داشت که بهترین دما برای فعالیت آنزیم‌های پکتیناز مورد استفاده در این تحقیق برابر با ۵۰ درجه سلسیوس می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که نوع آنزیم پکتیناز، روش تثبیت مورد استفاده و همچنین نوع حامل اثر معنی‌داری روی بهینه‌دمای فعالیت آنزیم‌ها دارد. دیویورا و همکاران (۲۰۱۸)، گزارش نمودند که بهینه‌دمای فعالیت آنزیم‌های پکتیناز تثبیت شده روی بیدهای آلژینات برابر با ۴۰ درجه سلسیوس بوده، در حالی که این فاکتور برای پکتینازهای تثبیت شده روی حامل ژل - آگار برابر با ۵۰ درجه سلسیوس بوده است (لی و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین، همان‌طور که در شکل ۴-۹ نشان داده شده است،

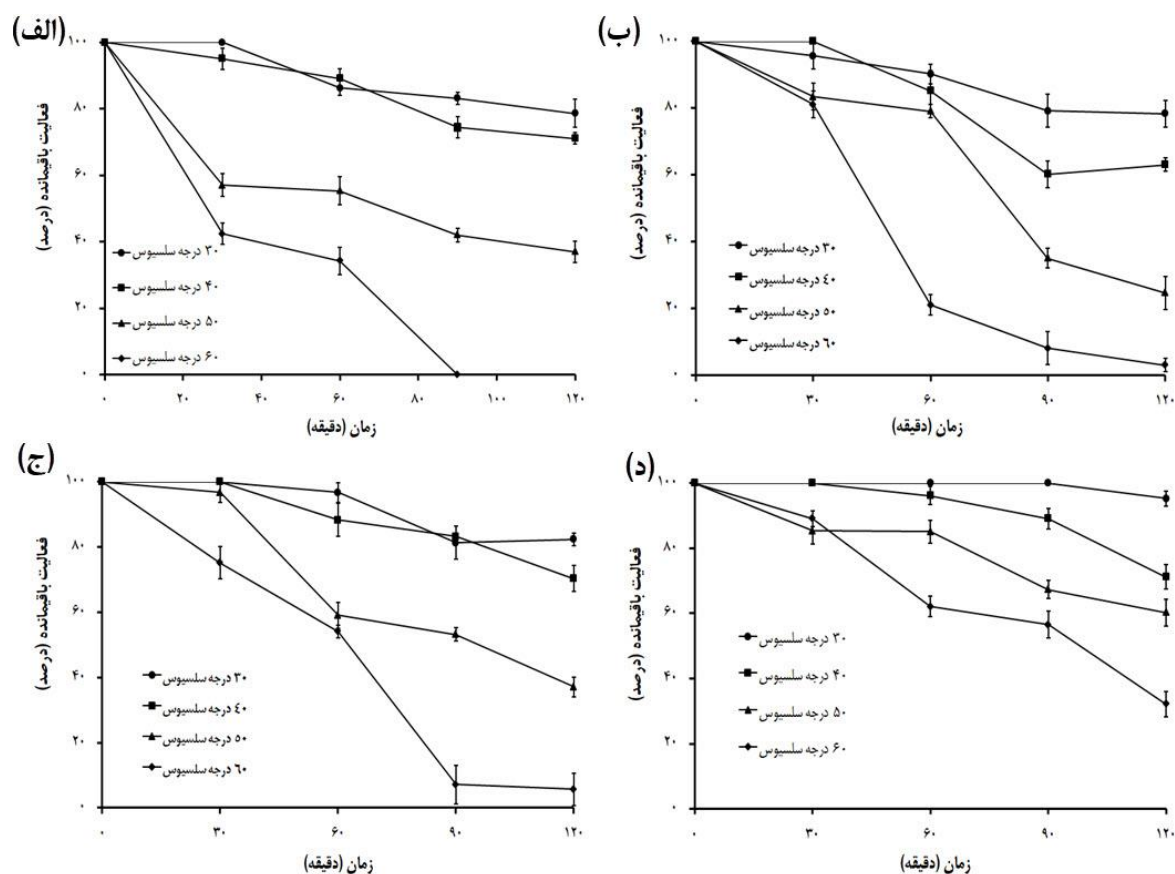
فرایند تثبیت اثری روی بهینه دمای فعالیت آنزیم‌ها نداشته است. به نظر می‌رسد که تغییر یا عدم تغییر دمای بهینه آنزیم‌ها در اثر فرایند تثبیت وابسته به طبیعت آنزیم، نوع روش تثبیت استفاده شده و همچنین نوع اتصال‌دهنده عرضی می‌باشد. برای مثال، درحالی‌که، رهمان و همکاران (۲۰۱۴b) گزارش کردند که دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های پکتیناز پس از تثبیت روی بیدهای کیتوزانی تغییر نکرده است، همین محققین بیان نمودند که تثبیت آنزیم‌های پکتیناز روی ژل آگار - آگار موجب تغییر دمای بهینه آن‌ها از ۴۵ به ۵۰ درجه سلسیوس شده است (رهمان و همکاران، ۲۰۱۴a).



شکل ۴-۹- اثر دما روی فعالیت آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوتارآلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید (فرایند در پی‌اچ ۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های آزاد و در پی‌اچ ۵/۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های تثبیت شده انجام شد)

۴-۹- اثر دما روی پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده

پایداری دمایی آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در شکل ۴-۱۰ نشان داده شده است. شکل مذکور نشان می‌دهد که اگرچه در دماهای پایین، پایداری هر دو حالت استفاده از آنزیم‌های پکتیناز (آزاد و تثبیت‌شده) بالا بوده است، اما در دماهای بالاتر تفاوت‌ها کاملاً معنی‌دار بوده و آنزیم‌های تثبیت‌شده پایداری بسیار بالاتری را از خود نشان دادند. همان‌طور که مشاهده می‌شود فعالیت باقیمانده آنزیم‌های آزاد پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس برابر با صفر شد، درحالی‌که در هیچ‌کدام از آنزیم‌های تثبیت‌شده این اتفاق رخ نداده و همه آن‌ها مقداری از فعالیت اولیه خود را حتی پس از ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حفظ کردند. در بین آنزیم‌های تثبیت‌شده نیز نتایج نشان می‌دهد که استفاده از اتصال‌دهنده کفیران پلی‌آلدهید در افزایش پایداری دمایی آنزیم‌ها مؤثرتر بوده است، زیرا آنزیم‌های متصل شده به‌وسیله این اتصال‌دهنده عرضی هم در دماهای پایین و هم در دماهای بالا پایدارتر بوده‌اند. تاکنون در تحقیقات مختلفی از فرایند تثبیت برای افزایش پایداری آنزیم‌ها استفاده شده است که در تمامی آن‌ها نتایج به‌دست‌آمده مطابق با تحقیق حاضر بوده است (لی و همکاران، ۲۰۰۸؛ دینانو و همکاران، ۲۰۰۸؛ رهمان و همکاران، ۲۰۱۶؛ راجدو و همکاران، ۲۰۱۶).



شکل ۴-۱۰-۱ پایداری (الف) آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده‌های عرضی مختلف شامل (ب) گلو تار آلدهید، (ج) پولولان پلی آلدهید و (د) کفیران پلی آلدهید در دماهای مختلف (پس از انکوبه کردن در دماها و زمان‌های مختلف، فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های آزاد و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای آنزیم‌های تثبیت شده انجام شد)

۴-۱۰- فعالیت ویژه آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده

فعالیت ویژه آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت شده در شرایط بهینه (پی‌اچ ۵ و دمای ۵۰ درجه سلسیوس برای آنزیم‌های آزاد و پی‌اچ ۵/۵ و دمای ۵۰ درجه سلسیوس برای آنزیم‌های تثبیت شده) در جدول ۴-۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، این پارامتر برای آنزیم‌های پکتیناز آزاد و همچنین پکتینازهای تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید به ترتیب برابر با 0.13 ± 0.093 ، 0.12 ± 0.056 ، 0.18 ± 0.056 و 0.18 ± 0.056 می‌باشد.

$\pm 2/21$ و $0/24 \pm 1/87$ یونیت بر میلی گرم پروتئین بوده که نشان می دهد فرایند تثبیت سبب کاهش فعالیت ویژه آنزیم ها شده است. جدول ۳-۴ نشان می دهد که فعالیت ویژه آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید تقریباً مشابه با آنزیم آزاد بوده و این در حالی است که فعالیت ویژه آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان و کفیران پلی آلدهید به مراتب کمتر از آنزیم آزاد بوده است. به نظر می رسد که کاهش فعالیت ویژه آنزیم های تثبیت شده به محدودیت انتشار در شبکه پلیمری ایجاد شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مربوط باشد (لی و جیانگ، ۲۰۱۱)، و هر چه این شبکه پلیمری پیچیده تر باشد تأثیر این اثر روی کاهش فعالیت ویژه بیشتر خواهد بود و این دلیل کمتر بودن فعالیت ویژه آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید نسبت به پولولان پلی آلدهید است. همچنین، فعالیت ویژه آنزیم های تثبیت شده در این تحقیق به طور معنی داری بیشتر از داده های گزارش شده برای پکتینازهای تثبیت شده در ریزکره های پلی آکریل آمید (۱/۳۴۹ یونیت بر میلی گرم) و پکتینازهای تثبیت شده روی ذرات سیلیکای پوشش داده شده با کیتوزان (۱/۰۲۸ یونیت بر میلی گرم) بوده است (لی و جیانگ، ۲۰۱۱؛ لی و بای،^۱ ۲۰۰۷).

جدول ۴-۳- فعالیت ویژه آنزیم های پکتیناز آزاد و تثبیت شده در شرایط بهینه فرایند (دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی اچ ۵ برای آنزیم های آزاد و دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پی اچ ۵/۵ برای آنزیم های تثبیت شده)

نوع آنزیم	فعالیت ویژه (یونیت بر میلی گرم پروتئین)
آزاد	$2/93 \pm 0/13^a$
تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید	$2/56 \pm 0/12^a$
تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید	$2/21 \pm 0/18^b$
تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید	$1/87 \pm 0/24^b$

*حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0/05$).

¹ Lei and Bi

۴-۱۱- پارامترهای سینتیکی مربوط به آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده

در این بخش، پارامترهای سینتیکی آنزیم‌های پکتیناز آزاد و تثبیت‌شده در شرایط بهینه واکنش اندازه‌گیری و نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۴-۴ نشان داده شده است. بدین منظور، ثابت میکائیلیس - منتن (K_m) و حداکثر نرخ واکنش (V_{max}) به‌وسیله رسم منحنی لینویر-برک محاسبه گردید. K_m غلظتی از پکتین بوده که در آن سرعت واکنش نصف سرعت بیشینه باشد و V_{max} نشان‌دهنده حداکثر سرعت واکنش در زمانی است که همه آنزیم‌ها با پکتین اشباع هستند. همان‌طور که در جدول ۴-۴ مشاهده می‌شود، اگرچه بین ثابت میکائیلیس - منتن و حداکثر نرخ واکنش پکتیناز آزاد با آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله گلاتارآلدئید اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، اما به‌طور کلی این پارامترهای برای آنزیم‌های تثبیت‌شده به ترتیب بیشتر و کمتر از آنزیم‌های پکتیناز آزاد بوده است. این نتایج می‌تواند مربوط به اثرات محدودیت انتشار ایجادشده به‌وسیله شبکه پلیمری و ساختار سه‌بعدی اتصال‌دهنده‌های عرضی باشد (رهمان و همکاران، ۲۰۱۴b)، به‌طوری‌که هر چه ساختار اتصال‌دهنده‌های عرضی پیچیده‌تر باشد، اثر روی این پارامترها بیشتر خواهد بود. همچنین تاکنون نتایج مشابه با تحقیق حاضر برای آنزیم‌های پکتیناز تثبیت‌شده به روش‌های مختلف گزارش شده است (لی و بای، ۲۰۰۷؛ رهمان و همکاران، ۲۰۱۳؛ رهمان و همکاران، ۲۰۱۶).

جدول ۴-۴- پارامترهای سینتیکی شامل ثابت میکائیلیس-منتن (K_m ؛ میلی گرم بر میلی لیتر) و حداکثر نرخ سرعت (V_{max} ؛ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم) آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در شرایط بهینه فرایند (دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵ برای آنزیم‌های آزاد و دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پی‌اچ ۵/۵ برای آنزیم‌های تثبیت‌شده)

نوع آنزیم	K_m	V_{max}
آزاد	9.71 ± 0.22^b	3.07 ± 0.13^b
تثبیت‌شده به‌وسیله گلاتارآلدئید	10.07 ± 0.37^b	2.93 ± 0.29^b
تثبیت‌شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدئید	11.21 ± 0.24^a	2.24 ± 0.18^a
تثبیت‌شده به‌وسیله کفیران پلی‌آلدئید	11.58 ± 0.31^a	2.17 ± 0.14^a

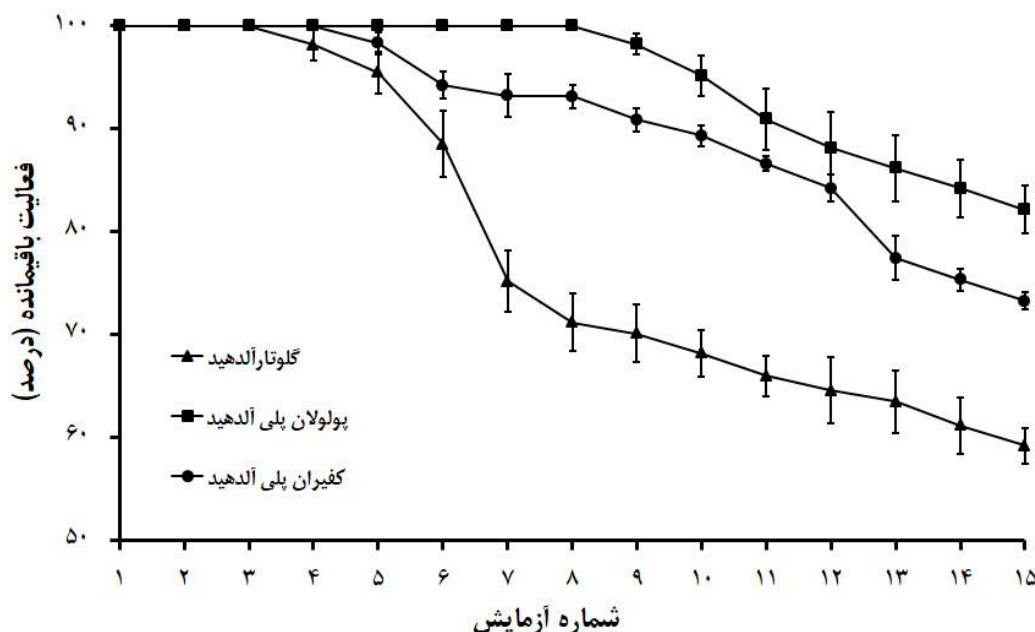
*حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).

۴-۱۲- قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده

قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کاربرد تجاری این آنزیم‌ها بوده، زیرا که بر روی هزینه فرایندهای صنعتی بسیار مؤثر می‌باشد. به‌طور کلی، هرچه قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌ها بیشتر باشد هزینه فرایندها کمتر خواهد بود زیرا که این قابلیت رابطه عکس با میزان مصرف آنزیم دارد. شکل ۴-۱۱، قابلیت استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده در این پژوهش را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پکتیناز تثبیت شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدهید دارای قابلیت استفاده مجدد بیشتری از نوع تثبیت شده با کفیران پلی‌آلدهید و گلوآرآلدهید بوده است. شکل ۴-۱۱، نشان می‌دهد که آنزیم‌های پکتیناز تثبیت شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدهید ۱۰۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۸ سیکل واکنش حفظ کردند، درحالی‌که این پارامتر برای آنزیم‌های تثبیت شده به‌وسیله کفیران پلی‌آلدهید و گلوآرآلدهید برابر با حدود ۹۴ و ۷۲ درصد بوده است. همچنین شکل مذکور نشان می‌دهد که پس از ۱۵ سیکل واکنش، آنزیم‌های تثبیت شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدهید، کفیران پلی‌آلدهید و گلوآرآلدهید به ترتیب میزان حدود ۸۳، ۷۴ و ۶۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کردند. با مطالعه سایر پژوهش‌ها در زمینه مشابه می‌توان دریافت که استراتژی مورد استفاده در این تحقیق بسیار کارآمد بوده و کمتر مطالعاتی وجود دارد که قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌های پکتیناز تثبیت شده را با روش‌های مختلف تا این حد گزارش کرده باشند. برای مثال، لی و جیانگ (۲۰۱۱) گزارش کردند که آنزیم‌های پکتیناز تثبیت شده در ریزکره‌های پلی‌آکریل آمیدی حدود ۷۵ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۷ سیکل واکنشی حفظ کردند. همچنین، بررسی‌ها نشان داده است که پکتینازهای تثبیت شده روی بیدهای کیتوزانی ۲۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۷ سیکل از دست دادند (رهمان و همکاران، ۲۰۱۴b). در تحقیقی دیگر، گزارش شده است که پکتینازهای تثبیت شده روی بیدهای آلژیناتی حدود ۷۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۸ سیکل واکنشی از دست دادند (د الویرا و همکاران، ۲۰۱۸). حتی در تحقیقاتی، قابلیت استفاده مجدد بسیار پایین‌تر از این حد بوده، درحالی‌که محققین بیان داشتند که روش استفاده شده به‌وسیله آن‌ها توجیه اقتصادی قابل قبولی دارد. برای مثال، آندریانی^۱ و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشتند که سلولازهای تثبیت شده در

¹ Andriani

بیدهای کلسیم آلزینات حدود ۹۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۴ سیکل واکنشی از دست دادند و انوار^۱ و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که پروتئازهای تثبیت شده روی بیدهای کلسیم آلزینات ۱۰۰ درصد فعالیت اولیه خود را پس از ۳ سیکل از دست دادند.



شکل ۴-۱۱- قابلیت استفاده مجدد از آنزیم‌های تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوتارآلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی‌اچ ۵/۵ و مدت زمان واکنش ۱۵ دقیقه برای هر سیکل واکنش انجام شد)

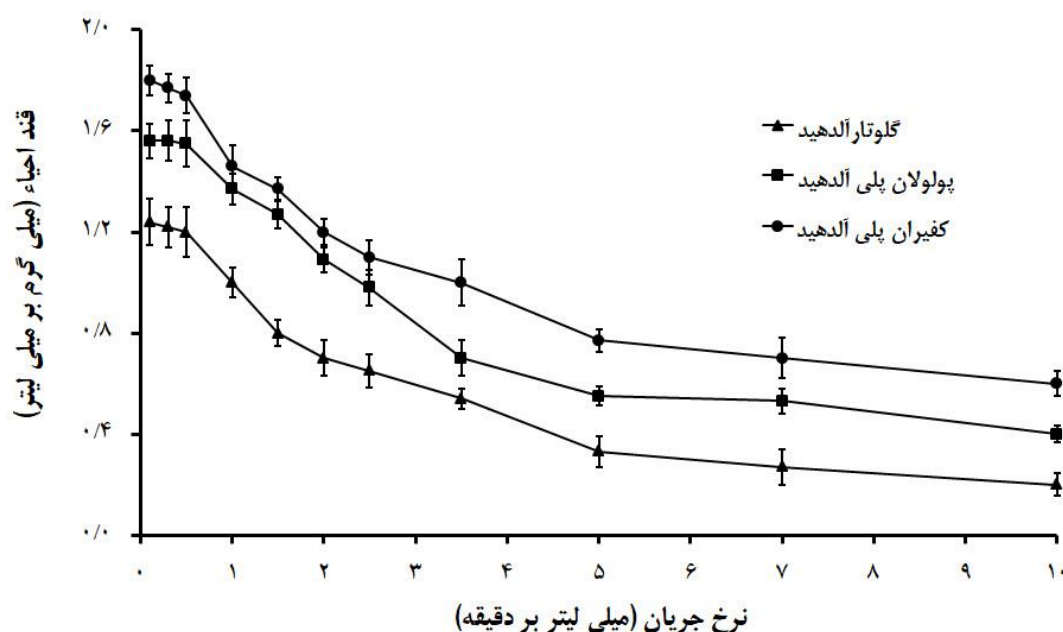
۴-۱۳- اثر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت

شکل ۴-۱۲، اثر نرخ جریان را روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم‌های پکتیناز تثبیت شده روی گلوله‌های شیشه‌ای نشان می‌دهد. در این بخش، محلول یک درصد حجمی/وزنی از پکتین در پی‌اچ ۳ (پی‌اچ تقریبی آب انار و زرشک) به عنوان سوبسترا و دمای ۵۰ درجه سلسیوس به عنوان دمای بهینه فرایند استفاده شد. همان‌طور

¹ Anwar

که مشاهده می شود، میزان قند احیاء تولید شده به وسیله بیوراکتور حاوی پکتیناز تثبیت شده با کفیران پلی آلدهید در همه نرخ جریان ها بیشتر از بیوراکتور حاوی پکتیناز تثبیت شده با پولولان پلی آلدهید و آن نیز بیشتر از بیوراکتور پر شده با پکتینازهای تثبیت شده با گلو تار آلدهید بوده است. دلیل این امر به میزان آنزیم های تثبیت شده به وسیله این اتصال دهنده های عرضی بر می گردد، زیرا که بیوراکتور حاوی آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید حاوی حدود ۵۷/۷۵ میلی گرم پروتئین بوده، در حالی که این فاکتور برای بیوراکتورهای پر شده با آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید و گلو تار آلدهید به ترتیب برابر با حدود ۲۰/۱۳ و ۴/۵۱ میلی گرم بوده است و بالاتر بودن محتوای پروتئینی در بیوراکتور می تواند عامل اصلی افزایش تولید قند احیاء باشد. از طرفی، همان طور که مشاهده می شود با افزایش نرخ جریان از ۰/۱ به ۱۰ میلی لیتر بر دقیقه، میزان تولید قند احیا به طور معنی داری کاهش یافته است که این می تواند مربوط به کاهش زمان ماند سوبسترا در بیوراکتور و در نتیجه کاهش مدت زمان تماس بین آنزیم و سوبسترا باشد (انصاری و هوسین،^۱ ۲۰۱۰). به هر حال، همان طور که مشاهده می شود با افزایش نرخ جریان از ۰/۱ با ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه کاهش معنی داری در میزان تولید قند احیا مشاهده نشده است و بنابراین به دلیل صرف جویی در زمان و هزینه، تمامی آزمون های بعدی در نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه (زمان ماند ۲۱ دقیقه) انجام شد.

¹ Ansari and Husain

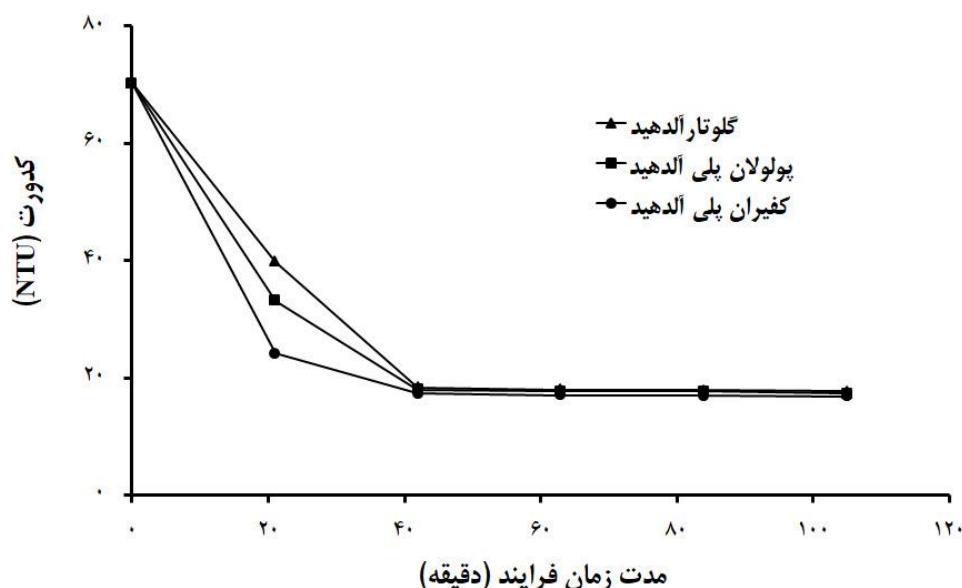


شکل ۴-۱۲- اثر نرخ جریان روی عملکرد بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم های تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف شامل گلوکز آلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و پی اچ ۳ انجام شد)

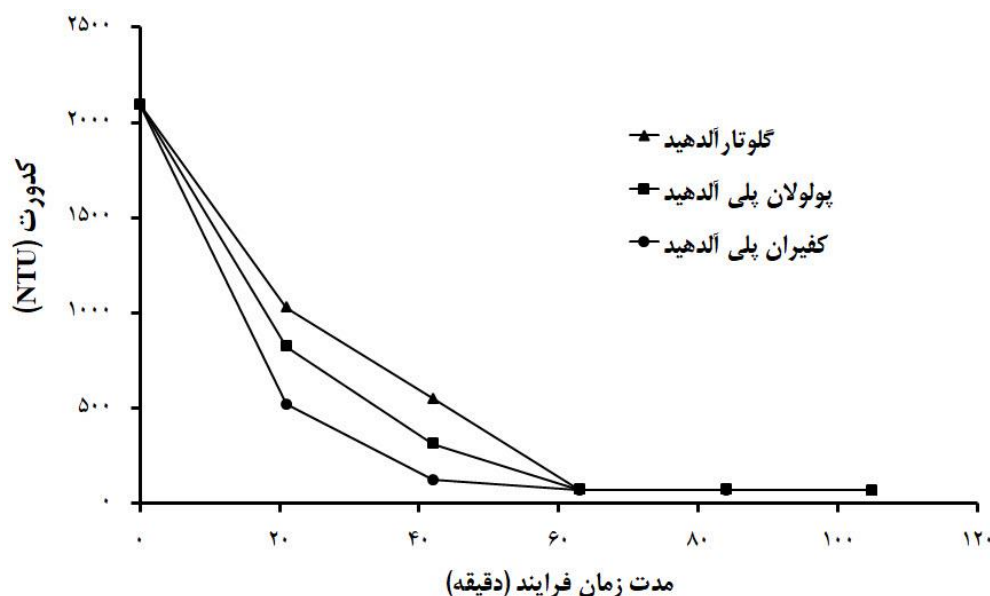
۴-۱۴- بررسی اثر زمان فرایند روی شفاف سازی آب انار و زرشک در بیوراکتور بستر ثابت

در این بخش، به منظور ارزیابی اثر زمان فرایند روی شفاف سازی آب انار و آب زرشک در بیوراکتور پر شده با آنزیم های پکتیناز تثبیت شده روی گلوله های شیشه ای، کدورت آبمیوه های مذکور طی زمان فرایند صفر تا ۱۰۵ دقیقه اندازه گیری شد (شکل های ۴-۱۳ و ۴-۱۴). در این فرایند از شرایط بهینه، یعنی دمای ۵۰ درجه سلسیوس و نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه، استفاده گردید. همان طور که در شکل ۴-۱۳ مشاهده می شود، کدورت نمونه های آب انار پس از ۴۲ دقیقه به حداقل میزان ممکن رسیده و افزایش زمان اثر معنی داری روی کاهش کدورت نداشته است، در حالی که در مورد آب زرشک این اتفاق پس از ۶۳ دقیقه رخ داده است (شکل ۴-۱۴). نکته قابل توجه دیگر این است که با توجه به شکل های مذکور می توان دریافت که شیب کاهش کدورت در مورد آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید به مراتب بیشتر از پولولان پلی آلدهید و این اتصال دهنده عرضی بیشتر از گلوکز آلدهید بوده

است که این به دلیل ظرفیت بالاتر کفیران پلی آلدئید در تثبیت آنزیم‌های پکتیناز می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این بخش، تمامی آزمون‌های بعدی روی آب انار شفاف شده به‌صورت مداوم و غیر مداوم انجام شد به‌طوری‌که در روش مداوم، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه و در روش غیر مداوم، دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در مورد آب زرشک نیز از نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای حالت مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای حالت غیر مداوم استفاده شد.



شکل ۴-۱۳- اثر مدت زمان شفاف‌سازی مداوم آب انار در بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله اتصال‌دهنده‌های عرضی مختلف شامل گلوتار آلدئید، پولولان پلی آلدئید و کفیران پلی آلدئید (فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد)



شکل ۴-۱۴- اثر مدت زمان شفاف سازی مداوم آب زرشک در بیوراکتور بستر ثابت پر شده با آنزیم های تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف شامل گلوتارآلدهید، پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید فرایند در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و نرخ جریان ۵/۰ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد

۴-۱۵- بهره وری حجمی آنزیم های آزاد و تثبیت شده

جدول ۴-۵، بهره وری حجمی آنزیم های پکتیناز آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف را در فرایندهای غیر مداوم و مداوم نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، حداکثر بهره وری حجمی مربوط به پکتینازهای تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم بوده و پس از آنزیم های تثبیت شده به وسیله همین اتصال دهنده عرضی در فرایند غیر مداوم در جایگاه دوم قرار داشته است. بالاتر بودن این پارامتر برای آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید به ظرفیت بالاتر این اتصال دهنده عرضی در تثبیت آنزیم ها مربوط می باشد. همچنین بالاتر بودن بهره وری حجمی در فرایندهای مداوم نسبت به نوع غیر مداوم می تواند مربوط به تماس بهتر و بیشتر آنزیم های تثبیت شده با سوبسترا در این نوع فرایندها می باشد. همچنین با توجه به جدول ۴-۵ می توان دریافت که بهره وری حجمی آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید بین آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید و گلوتارآلدهید قرار داشته که با ظرفیت این اتصال دهنده عرضی در تثبیت پروتئین مطابقت داشت، زیرا که

ظرفیت اتصال پروتئین به وسیله این اتصال دهنده نیز در بین دو اتصال دهنده دیگر بوده است. جدول مذکور نشان می دهد که بهره وری حجمی آنزیم های آزاد بیشتر از آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلاتارآلدهید بوده است که با توجه به برابر بودن محتوای پروتئینی در این دو تیمار، کاهش این پارامتر را می توان به کاهش فعالیت ویژه آنزیم ها در اثر تثبیت نسبت داد (لی و جیانگ، ۲۰۱۱؛ رهمان و همکاران، ۲۰۱۶).

جدول ۴-۵- بهره وری حجمی (میلی گرم بر میلی لیتر بر دقیقه) آنزیم های پکتیناز آزاد و تثبیت شده در شرایط فرایند غیر مداوم و مداوم (دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی اچ ۵ و زمان ۲۱ دقیقه برای آنزیم آزاد، دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی اچ ۵/۵ و زمان ۲۱ دقیقه برای آنزیم های تثبیت شده در شرایط فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، پی اچ ۵/۵، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۲۱ دقیقه برای آنزیم های تثبیت شده در شرایط فرایند مداوم)

نوع آنزیم	نوع فرایند	بهره وری حجمی
آزاد	غیر مداوم	0.001 ± 0.076^c
تثبیت شده به وسیله گلاتارآلدهید	غیر مداوم	0.002 ± 0.068^d
	مداوم	0.003 ± 0.070^d
تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید	غیر مداوم	0.003 ± 0.078^c
	مداوم	0.003 ± 0.079^c
تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید	غیر مداوم	0.003 ± 0.085^b
	مداوم	0.001 ± 0.089^a

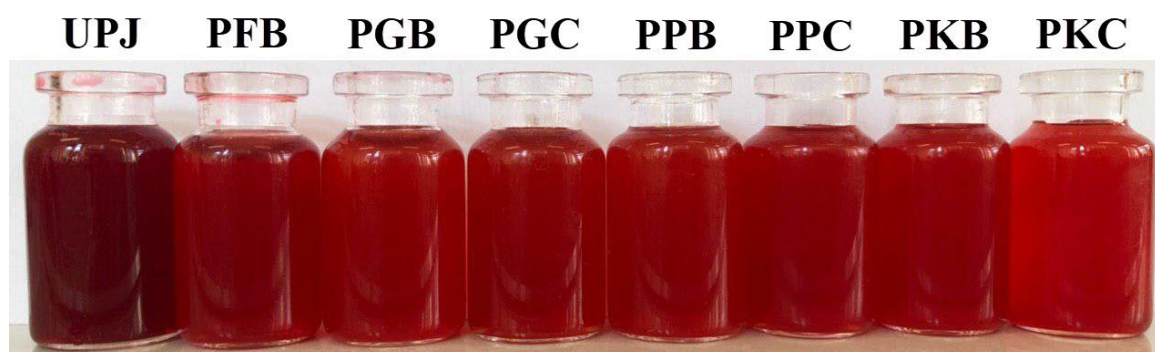
*حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0.05$).

۴-۱۶- اثر فرایند شفاف سازی روی خصوصیات آبمیوه ها

۴-۱۶-۱- کدورت و شفافیت

مهم ترین هدف این پژوهش، شفاف سازی آب انار و زرشک برای کاهش کدورت و افزایش شفافیت این آبمیوه ها بوده است. همان طور که بیان شد، عامل اصلی این کدورت نیز پکتین موجود در آبمیوه ها بوده و بنابراین هیدرولیز و

یا جداسازی آن امری ضروری است (شارما^۱ و همکاران، ۲۰۱۴). جدول ۴-۶ نشان می‌دهد که کدورت نمونه‌های آب انار شفاف شده به‌طور معنی‌داری پایین‌تر نمونه تیمار نشده بوده و این پارامتر برای نمونه‌های شفاف شده از حدود ۷۰/۲ به ۱۷/۴ NTU کاهش یافت و این در حالی است که با توجه به شکل ۴-۱۵، میزان شفافیت نمونه‌ها نیز پس از شفاف‌سازی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (از ۸۱/۱۵ به ۹۶/۱۳ درصد). جدول ۴-۷ نشان می‌دهد که روند مشابهی نیز برای آب زرشک مشاهده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان کدورت آب زرشک پس از شفاف‌سازی از حدود ۲۰۶۸/۸ به ۶۹/۳ NTU کاهش یافت و متعاقباً میزان شفافیت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۱۶). آنچه در نتایج به‌دست‌آمده از شفاف‌سازی هر دو آبمیوه مشهود است، عملکرد بهتر اتصال‌دهنده‌های عرضی پولولان و کفیران پلی‌آلدهید نسبت به گلو تار آلدهید بوده است که می‌تواند مربوط به ظرفیت بالاتر این دو اتصال‌دهنده عرضی در تثبیت آنزیم‌ها باشد. لازم به ذکر است که نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با داده‌های گزارش‌شده برای آب سیب شفاف‌شده و آب بلوبری^۲ شفاف‌شده به‌وسیله دنگ^۳ و همکاران (۲۰۱۹) و ساندري^۴ و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت.



شکل ۴-۱۵- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و مدت‌زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

¹ Sharma

² Blueberry

³ Deng

⁴ Sandri



شکل ۴-۱۶- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و مدت زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

جدول ۴-۶- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی کدورت و شفافیت آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیما	کدورت (NTU)	شفافیت (درصد)
UPJ	$70/2 \pm 0/3^a$	$81/15 \pm 0/13^c$
PFB	$18/1 \pm 0/3^b$	$92/13 \pm 0/16^b$
PGB	$18/3 \pm 0/1^b$	$92/07 \pm 0/14^b$
PGC	$18/3 \pm 0/2^b$	$92/11 \pm 0/12^b$
PPB	$18/1 \pm 0/2^b$	$92/11 \pm 0/13^b$
PPC	$18/2 \pm 0/1^b$	$92/14 \pm 0/10^b$
PKB	$17/6 \pm 0/3^c$	$96/21 \pm 0/16^a$
PKC	$17/4 \pm 0/2^c$	$96/13 \pm 0/12^a$

* UPJ, PFB, PGB, PGC, PPB, PPC, PKB و PKC به ترتیب نمونه های آب انار شفاف نشده و آب انار شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0/05$).

جدول ۴-۷- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی کدورت و شفافیت آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیما	کدورت (NTU)	شفافیت (درصد)
UBJ	$20.68/8 \pm 0.0^a$	$28/38 \pm 0.16^h$
BFB	$72/6 \pm 0.4^d$	$61/72 \pm 0.18^e$
BGB	$75/1 \pm 0.8^b$	$54/13 \pm 0.10^g$
BGC	$73/8 \pm 0.3^c$	$60/32 \pm 0.14^f$
BPB	$73/0 \pm 0.4^d$	$63/00 \pm 0.11^d$
BPC	$72/7 \pm 0.3^d$	$65/13 \pm 0.09^c$
BKB	$71/7 \pm 0.4^e$	$68/21 \pm 0.10^b$
BKC	$69/3 \pm 0.6^f$	$73/63 \pm 0.13^a$

* UBJ, BFB, BGB, BGC, BPB, BPC, BKB و BKC به ترتیب نمونه های آب زرشک شفاف نشده و آب زرشک شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلاتارآلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلاتارآلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0.05$).

۴-۱۶-۲- پی اچ و اسیدیت

جداول ۴-۸ و ۴-۹، اثر شفاف سازی آب انار و زرشک به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در شرایط غیر مداوم و مداوم را روی پی اچ و اسیدیت نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، پی اچ آبمیوه ها پس از شفاف سازی به طور معنی داری کاهش یافته و در مقابل اسیدیت قابل تیر افزایش یافت. این کاهش در پی اچ و افزایش در اسیدیت را می توان به هیدرولیز پکتین و آزاد سازی گالاتورونیک اسید نسبت داد (شارما و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین این نتایج در تطابق با داده های گزارش شده برای آب گلابی و آب سیب شفاف شده به وسیله آنزیم بوده که به ترتیب به وسیله جوشی^۱ و همکاران (۲۰۱۱) و دنگ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش شد. همچنین این جداول نشان می دهند که در هر دو آبمیوه، استفاده از کفیران پلی آلدهید و شرایط مداوم اثر بیشتری روی این خصوصیات داشته است که به

¹ Joshi

ترتیب می‌تواند مربوط به ظرفیت بالاتر این اتصال‌دهنده عرضی در تثبیت آنزیم و تماس بهتر آنزیم‌های تثبیت‌شده با سوبسترا در شرایط مداوم باشد.

جدول ۴-۸- اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پی-اچ و اسیدیته قابل تیتر (TTA؛ درصد حجمی/وزنی اسید سیتریک) آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیما	پی‌اچ	اسیدیته قابل تیتر
UPJ	$3/35 \pm 0/01^a$	$1/08 \pm 0/03^f$
PFB	$2/99 \pm 0/02^d$	$1/24 \pm 0/03^d$
PGB	$3/17 \pm 0/04^b$	$1/14 \pm 0/03^e$
PGC	$3/08 \pm 0/01^c$	$1/17 \pm 0/04^e$
PPB	$2/97 \pm 0/03^d$	$1/22 \pm 0/01^d$
PPC	$2/90 \pm 0/02^e$	$1/29 \pm 0/03^c$
PKB	$2/87 \pm 0/01^f$	$1/37 \pm 0/03^b$
PKC	$2/81 \pm 0/02^g$	$1/43 \pm 0/01^a$

* UPJ، PFB، PGB، PGC، PPB، PPC، PKB و PKC به ترتیب نمونه‌های آب انار شفاف نشده و آب انار شفاف شده با استفاده از آنزیم‌های آزاد، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله گلاتارآلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله گلاتارآلدهید در فرایند مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله کفیران پلی‌آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله کفیران پلی‌آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

جدول ۴-۹- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پی-اچ و اسیدیته قابل تیتر (TTA؛ درصد حجمی/وزنی اسید مالیک) آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیما	پی اچ	اسیدیته قابل تیتر
UBJ	3.21 ± 0.02^a	0.75 ± 0.03^g
BFB	2.99 ± 0.02^e	1.04 ± 0.02^d
BGB	3.18 ± 0.01^b	0.91 ± 0.03^f
BGC	3.14 ± 0.02^c	0.97 ± 0.01^e
BPB	3.09 ± 0.02^d	1.13 ± 0.01^c
BPC	2.98 ± 0.04^e	1.14 ± 0.02^c
BKB	2.77 ± 0.01^f	1.21 ± 0.02^b
BKC	2.70 ± 0.03^g	1.29 ± 0.03^a

* UBJ, BFB, BGB, BGC, BPB, BPC, BKB و BKC به ترتیب نمونه های آب زرشک شفاف نشده و آب زرشک شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0.05$).

۴-۱۶-۳- مواد جامد محلول کل و محتوای قند احیاء

جداول ۴-۱۰ و ۴-۱۱، اثر فرایند شفاف سازی روی مواد جامد کل و محتوای قند احیاء آب انار و آب زرشک را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، فرایند شفاف سازی به طور معنی داری سبب کاهش مواد جامد محلول شده که این می تواند مربوط به هیدرولیز شبکه پلیمری پکتین و رسوب برخی از این مواد جامد باشد که در تطابق با نتایج گزارش شده برای آب سیب شفاف شده با آنزیم های پکتیناز تثبیت شده می باشد (دیانو و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین جداول مذکور نشان می دهند که فرایند شفاف سازی هر دو آبمیوه سبب افزایش محتوای قند احیاء شده که این نتایج به دلیل هیدرولیز زنجیره های پکتین و آزاد شدن قندهای احیاء می باشد.

جدول ۴-۱۰- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی مواد جامد محلول کل (TSS؛ °Brix) و محتوای قند احیاء (میلی لیتر/میلی گرم) آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	مواد جامد محلول کل	محتوای قند احیاء
UPJ	$18/5 \pm 0/0^a$	$56/31 \pm 0/08^d$
PFB	$16/0 \pm 0/0^d$	$61/27 \pm 0/11^c$
PGB	$18/0 \pm 0/0^b$	$61/00 \pm 0/26^c$
PGC	$17/5 \pm 0/0^c$	$61/21 \pm 0/23^c$
PPB	$16/0 \pm 0/0^d$	$62/98 \pm 0/13^b$
PPC	$16/0 \pm 0/0^d$	$63/13 \pm 0/32^b$
PKB	$15/0 \pm 0/0^e$	$67/21 \pm 0/12^a$
PKC	$14/5 \pm 0/0^f$	$67/14 \pm 0/06^a$

* UPJ، PFB، PGB، PGC، PPB، PPC، PKB و PKC به ترتیب نمونه های آب انار شفاف نشده و آب انار شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلاتارآلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلاتارآلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0/05$).

جدول ۴-۱۱- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی مواد جامد محلول کل (°Brix؛ TSS) و محتوای قند احیاء (میلی لیتر/میلی گرم) آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	مواد جامد محلول کل	محتوای قند احیاء
UBJ	30.5 ± 0.1^a	53.17 ± 0.16^d
BFB	25.5 ± 0.1^d	63.36 ± 0.21^c
BGB	29.0 ± 0.1^b	60.32 ± 0.16^c
BGC	29.0 ± 0.1^b	62.80 ± 0.13^c
BPB	26.0 ± 0.1^c	64.12 ± 0.10^b
BPC	25.5 ± 0.1^d	66.16 ± 0.13^b
BKB	21.5 ± 0.1^e	69.10 ± 0.13^a
BKC	21.0 ± 0.1^f	69.57 ± 0.09^a

* UBJ, BFB, BGB, BGC, BPB, BPC, BKB و BKC به ترتیب نمونه های آب زرشک شفاف نشده و آب زرشک شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0.05$).

۴-۱۶-۴- ویسکوزیته و تست حضور پکتین

پکتین پلی ساکاریدی با ظرفیت بالای نگهداری آب می باشد که می تواند شبکه ای در داخل آبمیوه تشکیل داده و سبب افزایش ویسکوزیته شود. بنابراین، هیدرولیز آن منجر به رها شدن آب در محیط آبمیوه و در نتیجه کاهش ویسکوزیته می گردد (سین^۱ و همکاران، ۲۰۰۶). جداول ۴-۱۲ و ۴-۱۳ نشان می دهند که فرایند شفاف سازی منجر به کاهش معنی دار ویسکوزیته در هر دو آبمیوه شده و بیشترین اثر روی این پارامتر را آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در شرایط مداوم فرایند داشته است. این نتایج در تطابق با داده های گزارش شده به وسیله دیانو و همکاران (۲۰۰۸) و دیویرا و همکاران (۲۰۱۸b) برای آب سیب و آب آلبو^۲ شفاف شده با آنزیم های پکتیناز

¹ Sin

² Umbu

تثبیت شده می باشد. جداول مذکور همچنین نشان می دهند که تست حضور پکتین در تمام آبمیوه های شفاف شده با آنزیم های آزاد و تثبیت شده منفی و در مقابل، برای آبمیوه خام یا تیمار نشده مثبت بوده است. این نتایج نشان می دهد که واکنش هیدرولیز پکتین در هر دو روش استفاده از آنزیم های آزاد و تثبیت شده به وسیله اتصال دهنده های عرضی مختلف کامل بوده است.

جدول ۴-۱۲- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی ویسکوزیته (میلی پاسکال ثانیه) و تست حضور پکتین آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	ویسکوزیته	تست حضور پکتین
UPJ	$2/14 \pm 0/08^a$	مثبت
PFB	$1/90 \pm 0/04^b$	منفی
PGB	$1/92 \pm 0/07^b$	منفی
PGC	$1/92 \pm 0/06^b$	منفی
PPB	$1/90 \pm 0/07^b$	منفی
PPC	$1/88 \pm 0/04^b$	منفی
PKB	$1/73 \pm 0/05^c$	منفی
PKC	$1/67 \pm 0/06^c$	منفی

* UPJ, PFB, PGB, PGC, PPB, PPC, PKB و PKC به ترتیب نمونه های آب انار شفاف نشده و آب انار شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0/05$).

جدول ۴-۱۳- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی ویسکوزیته (میلی پاسکال ثانیه) و تست حضور پکتین آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	ویسکوزیته	تست حضور پکتین
UBJ	$4/59 \pm 0/18^a$	مثبت
BFB	$4/07 \pm 0/04^b$	منفی
BGB	$4/21 \pm 0/17^b$	منفی
BGC	$4/18 \pm 0/12^b$	منفی
BPB	$4/01 \pm 0/13^{bc}$	منفی
BPC	$3/91 \pm 0/07^c$	منفی
BKB	$3/57 \pm 0/11^d$	منفی
BKC	$3/31 \pm 0/12^e$	منفی

* UBJ, BFB, BGB, BGC, BPB, BPC, BKB و BKC به ترتیب نمونه های آب زرشک شفاف نشده و آب زرشک شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلوآلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلوآلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدھید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدھید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدھید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدھید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0/05$).

۴-۱۶-۵- محتوای فنول کل و خصوصیات آنتی اکسیدانی

جداول ۴-۱۴ و ۴-۱۵ محتوای فنول کل نمونه های آب انار و آب زرشک شفاف شده و شفاف نشده را نشان می دهند. همان طور که مشاهده می شود، فرایند شفاف سازی تأثیر منفی روی این پارامتر داشته و سبب کاهش معنی دار آن شده است که در تطابق با گزارشات منتشر شده برای شفاف سازی آب توت سیاه و آب سیب به وسیله لندبو^۱ و همکاران (۲۰۰۶) و دیانو و همکاران (۲۰۰۸) بوده است. به طور کلی، هیدرولیز پکتین می تواند منجر به رسوب ترکیبات مختلف شامل برخی ترکیبات فنولی شده و در نتیجه سبب کاهش محتوایشان در آبمیوه گردد. همچنین،

¹ Landbo

فعالیت‌های ثانویه آنزیمی می‌تواند پروفایل ترکیبات فنولی را تغییر داده و مجموع این دو اتفاق احتمالاً عامل اصلی کاهش محتوای فنولی آبمیوه‌ها در اثر شفاف‌سازی می‌باشد (پینلو^۱ و همکاران، ۲۰۰۶).

از طرف دیگر، جداول مذکور نشان می‌دهند که ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد آبمیوه‌ها به‌طور معنی‌داری پس از شفاف‌سازی کاهش پیدا کرده است. می‌توان بیان داشت که عامل اصلی کاهش خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آبمیوه‌ها در اثر فرایند شفاف‌سازی مربوط به کاهش محتوای فنولی آن‌ها (همان‌طور که قبل‌تر بیان شد) و همچنین رسوب برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در اثر هیدرولیز پکتین می‌باشد (سو و سیلوا^۲؛ دالیورا و همکاران، ۲۰۱۸b).

جدول ۴-۱۴ اثر شفاف‌سازی به‌وسیله آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی محتوای فنول کل (TPC؛ میلی‌گرم گالیک اسید اکی‌والانت بر میلی‌لیتر) و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (DPPH-RSA؛ درصد) و ABTS (ABTS-RSA؛ درصد) آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	TPC	DPPH-RSA	ABTS-RSA
UPJ	$2/48 \pm 0/03^a$	$91/37 \pm 0/13^a$	$90/43 \pm 0/14^a$
PFB	$2/14 \pm 0/02^b$	$85/27 \pm 0/19^b$	$85/16 \pm 0/10^c$
PGB	$2/19 \pm 0/06^b$	$85/62 \pm 0/17^b$	$86/32 \pm 0/11^b$
PGC	$2/13 \pm 0/04^b$	$85/47 \pm 0/18^b$	$86/18 \pm 0/13^b$
PPB	$2/11 \pm 0/06^b$	$85/32 \pm 0/15^b$	$85/32 \pm 0/18^c$
PPC	$2/00 \pm 0/03^c$	$84/28 \pm 0/13^c$	$85/12 \pm 0/10^c$
PKB	$1/96 \pm 0/06^c$	$84/12 \pm 0/09^c$	$83/27 \pm 0/16^d$
PKC	$1/93 \pm 0/09^c$	$83/14 \pm 0/10^d$	$83/11 \pm 0/08^d$

* UPJ, PFB, PGB, PGC, PPB, PPC, PKB و PKC به ترتیب نمونه‌های آب انار شفاف نشده و آب انار شفاف شده با استفاده از آنزیم‌های آزاد، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله گلوکارآلدئید در فرایند غیر مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله گلوکارآلدئید در فرایند مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله پولولان پلی‌آلدئید در فرایند مداوم، آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله کفیران پلی‌آلدئید در فرایند غیر مداوم و آنزیم‌های تثبیت‌شده به‌وسیله کفیران پلی‌آلدئید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

¹ Pinelo

² Su and Silva

جدول ۴-۱۵- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی محتوای فنول کل (TPC؛ میلی گرم گالیک اسید اکی والانت بر میلی لیتر) و قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH (DPPH-RSA؛ درصد) و ABTS (ABTS-RSA؛ درصد) آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	TPC	DPPH-RSA	ABTS-RSA
UBJ	$20/31 \pm 0/08^a$	$94/21 \pm 0/08^a$	$95/21 \pm 0/11^a$
BFB	$19/31 \pm 0/14^b$	$85/30 \pm 0/13^e$	$86/28 \pm 0/54^c$
BGB	$19/60 \pm 0/17^b$	$88/22 \pm 0/08^b$	$89/23 \pm 0/10^b$
BGC	$19/47 \pm 0/11^b$	$87/33 \pm 0/14^c$	$89/21 \pm 0/14^b$
BPB	$19/40 \pm 0/09^b$	$86/00 \pm 0/19^d$	$86/41 \pm 0/48^c$
BPC	$18/91 \pm 0/10^c$	$85/27 \pm 0/09^e$	$86/11 \pm 0/57^c$
BKB	$18/81 \pm 0/15^c$	$84/17 \pm 0/12^f$	$85/24 \pm 0/55^{cd}$
BKC	$18/54 \pm 0/04^d$	$84/14 \pm 0/10^f$	$85/17 \pm 0/18^d$

* UBJ, BFB, BGB, BGC, BPB, BPC, BKB, BKC به ترتیب نمونه های آب زرشک شفاف نشده و آب زرشک شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ($p < 0/05$).

۴-۱۶-۶- پارامترهای رنگی

در این بخش، پارامترهای رنگی شامل شاخص روشنایی (L)، شاخص سبز - قرمز (a) و شاخص آبی - زرد (b) آب انار و آب زرشک های شفاف نشده و شفاف شده به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده با اتصال دهنده های عرضی مختلف در فرایندهای غیر مداوم و مداوم مورد بررسی قرار گرفته و نتایج به دست آمده در جداول ۴-۱۶ و ۴-۱۷ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، فرایند شفاف سازی موجب افزایش شاخص روشنایی شده است. این نتیجه می تواند به دلیل کاهش در کدورت و افزایش در شفافیت آبمیوه ها در اثر فرایند شفاف سازی باشد که در تطابق با گزارشات دیویرا و همکاران (۲۰۱۸b) و سین^۱ و همکاران (۲۰۰۶) برای آب سیب و

¹ Sin

آب اسپودیلا^۱ شفاف شده می باشد. همچنین نتایج نشان می دهد که فرایند شفاف سازی سبب کاهش در شاخص سبز - قرمز و افزایش در شاخص آبی - زرد شده است. کاهش در شاخص قرمزی آبمیوه ها می تواند مربوط به هیدرولیز پکتین و رسوب برخی ترکیبات آنتی اکسیدانی باشد که در محیط اسیدی آبمیوه قرمز رنگ می باشند.

جدول ۴-۱۶- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پارامترهای رنگی آب انار (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۴۲ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۴۲ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیمار	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
UPJ	۳۰/۳۱ ± ۰/۱۱ ^f	۱۶/۱۲ ± ۰/۱۰ ^a	۸/۱۹ ± ۰/۱۰ ^d
PFB	۳۵/۸۱ ± ۰/۰۹ ^d	۱۵/۲۶ ± ۰/۰۷ ^b	۹/۲۱ ± ۰/۱۴ ^c
PGB	۳۴/۹۸ ± ۰/۱۳ ^e	۱۵/۲۸ ± ۰/۱۴ ^b	۹/۱۵ ± ۰/۱۱ ^c
PGC	۳۵/۰۴ ± ۰/۱۶ ^e	۱۵/۲۲ ± ۰/۱۱ ^b	۹/۳۱ ± ۰/۱۰ ^c
PPB	۳۷/۰۸ ± ۰/۱۲ ^c	۱۵/۱۳ ± ۰/۱۳ ^b	۹/۳۱ ± ۰/۰۸ ^c
PPC	۳۷/۱۴ ± ۰/۱۰ ^c	۱۵/۱۰ ± ۰/۱۰ ^b	۹/۳۸ ± ۰/۱۳ ^c
PKB	۴۰/۴۱ ± ۰/۱۲ ^b	۱۳/۸۱ ± ۰/۱۸ ^c	۹/۸۵ ± ۰/۱۲ ^b
PKC	۴۱/۰۹ ± ۰/۰۸ ^a	۱۳/۴۱ ± ۰/۰۸ ^d	۱۰/۲۰ ± ۰/۱۶ ^a

* UPJ, PFB, PGB, PGC, PPB, PPC, PKB و PKC به ترتیب نمونه های آب انار شفاف نشده و آب انار شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد (p < ۰/۰۵).

¹ Sapodilla

جدول ۴-۱۷- اثر شفاف سازی به وسیله آنزیم های آزاد و تثبیت شده در فرایندهای غیر مداوم و مداوم روی پارامترهای رنگی آب زرشک (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان فرایند ۶۳ دقیقه برای فرایند غیر مداوم و دمای ۵۰ درجه سلسیوس، نرخ جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه و زمان ۶۳ دقیقه برای فرایند مداوم)

تیما	L	a	b
UBJ	۱۰/۲۱ ± ۰/۰۳ ^e	۲۲/۲۱ ± ۰/۱۱ ^a	۴/۱۳ ± ۰/۱۳ ^c
BFB	۱۸/۱۰ ± ۰/۱۵ ^c	۱۹/۱۸ ± ۰/۱۳ ^c	۵/۰۳ ± ۰/۱۶ ^b
BGB	۱۷/۱۴ ± ۰/۱۸ ^d	۲۰/۳۳ ± ۰/۱۱ ^b	۵/۰۰ ± ۰/۱۶ ^b
BGC	۱۷/۲۰ ± ۰/۱۳ ^d	۲۰/۲۱ ± ۰/۰۸ ^b	۵/۰۹ ± ۰/۱۰ ^b
BPB	۱۷/۴۶ ± ۰/۱۶ ^d	۱۸/۴۴ ± ۰/۱۱ ^d	۵/۱۳ ± ۰/۱۰ ^b
BPC	۱۸/۳۲ ± ۰/۰۹ ^c	۱۸/۲۶ ± ۰/۱۷ ^d	۵/۱۷ ± ۰/۱۴ ^b
BKB	۲۰/۴۱ ± ۰/۱۶ ^b	۱۷/۲۱ ± ۰/۱۰ ^e	۵/۵۱ ± ۰/۰۸ ^a
BKC	۲۱/۱۴ ± ۰/۱۳ ^a	۱۷/۱۴ ± ۰/۰۷ ^e	۵/۶۶ ± ۰/۱۰ ^a

* UBJ, BFB, BGB, BGC, BPB, BPC, BKB و BKC به ترتیب نمونه های آب زرشک شفاف نشده و آب زرشک شفاف شده با استفاده از آنزیم های آزاد، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله گلو تار آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله پولولان پلی آلدهید در فرایند مداوم، آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند غیر مداوم و آنزیم های تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید در فرایند مداوم.

** حروف بالانویس متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد (p < ۰/۰۵).

با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی اثر فرایند شفاف سازی روی خصوصیات آب انار و آب زرشک می توان بیان داشت که بیشترین اثر روی خصوصیات آبمیوه ها مربوط به زمانی است که از اتصال دهنده عرضی کفیران پلی آلدهید برای تثبیت آنزیم های پکتیناز استفاده شده است، که این می تواند مربوط به بالاتر بودن ظرفیت این اتصال دهنده در تثبیت آنزیم ها باشد. همچنین با دقت در جداول مربوط به این بخش می توان دریافت که شرایط مداوم اثر بیشتری روی خصوصیات آبمیوه ها داشته است که این می تواند مربوط به تماس بهتر و بیشتر آنزیم ها با سوبسترا در شرایط فرایند مداوم نسبت به فرایند غیر مداوم باشد.

فصل پنجم

نتیجہ گیری و پیشہ دات

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱- نتیجه گیری کلی

در این تحقیق، به منظور تولید اتصال دهنده های عرضی ایمن و جایگزین برای نوع متداول و سمی آن (گلو تار آلدهید) از اکسیداسیون جزئی پولولان و کفیران استفاده شد. در این واکنش، گروه های آلدهیدی آزاد روی سطح این پلی ساکاریدها ایجاد شده که قابلیت استفاده از آن ها به عنوان اتصال دهنده عرضی را فراهم می کند. در مرحله بعد، این اتصال دهنده های عرضی برای تثبیت آنزیم های پکتیناز روی سطح گلوله های شیشه ای بکار رفته و در نهایت از این گلوله های حاوی آنزیم برای شفاف سازی غیر مداوم و مداوم (در بیوراکتور بستر ثابت) آب انار و آب زرشک استفاده شد. نتایج نشان داد که فرایند تثبیت سبب کاهش فعالیت آنزیم های پکتیناز و همچنین حداکثر سرعت واکنش و افزایش ثابت میکائیلیس - منتن گردید. همچنین، بهینه سازی شرایط واکنش نشان داد که فرایند تثبیت اثری روی بهینه دمای آنزیم ها (۵۰ درجه سلسیوس) نداشته اما منجر به افزایش پی اچ از ۵ به ۵/۵ گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که فرایند تثبیت به طور معنی داری سبب افزایش پایداری آنزیم ها در دماها و پی اچ های مختلف گردید. از طرفی، بررسی قابلیت استفاده مجدد از آنزیم های تثبیت شده نشان داد که پکتینازهای تثبیت شده با پولولان پلی آلدهید بهترین عملکرد را داشته و پس از آن پکتیناز تثبیت شده به وسیله کفیران پلی آلدهید و گلو تار آلدهید در جایگاه های بعدی قرار داشتند. در مرحله بعدی، از آنزیم های تثبیت شده برای شفاف سازی غیر مداوم و مداوم آب انار و زرشک استفاده شد و نتایج نشان داد که این فرایند موجب کاهش پی اچ، مواد جامد محلول کل، ویسکوزیته، محتوای فنولی کل، قابلیت مهار رادیکال های آزاد و پارامتر رنگی سبز - قرمز و افزایش اسیدیته قابل تیتراژ، محتوای قند احیاء، شاخص روشنایی و شاخص آبی - زرد آبمیوه های مذکور گردید. همچنین با بررسی نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان بیان داشت که استفاده از روش تثبیت آنزیم ها به وسیله کفیران پلی آلدهید بیشترین اثر را روی خصوصیات آبمیوه ها داشته که می تواند مربوط به ظرفیت بالاتر این اتصال دهنده در تثبیت آنزیم باشد، زیرا که محتوای پروتئینی گلوله های حاوی کفیران پلی آلدهید (0.186 ± 0.25) میلی گرم بر ده گلوله شیشه ای به مراتب بیشتر



از پولولان پلی آلدئید ($0/21 \pm 1/83$ میلی گرم بر ده گلوله شیشه‌ای) و گلو تار آلدئید ($0/05 \pm 0/41$ میلی گرم بر ده گلوله شیشه‌ای) بوده است. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از روش مداوم اثر بیشتری روی خصوصیات آبمیوه‌ها داشته که می‌تواند به تماس بهتر و بیشتر جایگاه فعال آنزیم با سوبسترا در روش مداوم مربوط باشد. در نهایت به نظر می‌رسد که استراتژی بکار رفته در این پژوهش می‌تواند جایگزین بالقوه‌ای برای روش متداول استفاده غیر مداوم از آنزیم‌های آزاد باشد.

۵-۲- پیشنهادات

با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، پیشنهادات زیر برای تحقیقات آتی ارائه می گردد:

- استفاده از پولولان پلی آلدهید و کفیران پلی آلدهید برای تثبیت سایر آنزیم ها مانند گلوکز ایزومراز.
- استفاده از سایر پلی ساکارید پلی آلدهیدها مانند سلولز پلی آلدهید برای تثبیت پکتیناز روی گلوله های شیشه ای.
- استفاده از گلوله های شیشه ای حاوی آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی در بیوراکتور بستر سیال و مقایسه نتایج به دست آمده با بیوراکتور بستر ثابت.
- استفاده از روش مداوم برای تثبیت آنزیم های پکتیناز روی گلوله های شیشه ای.
- جداسازی آنزیم های تثبیت شده روی گلوله های شیشه ای و بررسی امکان استفاده مجدد از گلوله ها به عنوان حامل آنزیم.
- استفاده از آنزیم های پکتیناز تثبیت شده به وسیله پلی ساکاریدهای پلی آلدهیدی برای شفاف سازی سایر آبمیوه ها مانند آب سیب.
- استفاده از روش بکار رفته در این تحقیق در مقیاس بالاتر برای کاربردهای صنعتی.



منابع

- Abdullah, A. G. L., Sulaiman, N. M., Aroua, M. K., & Noor, M. J. M. M. (2007). Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 65–71.
- Acres, R. G., Ellis, A. V, Alvino, J., Lenahan, C. E., Khodakov, D. A., Metha, G. F., & Andersson, G. G. (2012). Molecular structure of 3-aminopropyltriethoxysilane layers formed on silanol-terminated silicon surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(10), 6289–6297.
- Adiguzel, G., Faiz, O., Sisecioglu, M., Sari, B., Baltaci, O., Akbulut, S., Genc, B., & Adiguzel, A. (2019). A novel endo- β -1, 4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 571–578.
- Ahmad, R., & Sardar, M. (2015). Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(2), 1–8.
- Ahmed, A., & Sohail, M. (2020). Characterization of pectinase from *Geotrichum candidum* AA15 and its potential application in orange juice clarification. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 955–961.
- Ahn, M., Dec, J., Kim, J., & Bollag, J. (2002). Treatment of 2, 4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *Journal of Environmental Quality*, 31(5), 1509–1515.
- Akpan, E., Akande, A., Aboudheir, A., Ibrahim, H., & Idem, R. (2007). Experimental, kinetic and 2-D reactor modeling for simulation of the production of hydrogen by the catalytic reforming of concentrated crude ethanol (CRCCE) over a Ni-based commercial catalyst in a packed-bed tubular reactor. *Chemical Engineering Science*, 62(12), 3112–3126.
- Alberti, K., Davey, R. E., Onishi, K., George, S., Salchert, K., Seib, F. P., Bornhäuser, M., Pompe, T., Nagy, A., & Werner, C. (2008). Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate. *Nature Methods*, 5(7), 645–650.



- Alizadeh, H.-R., Morteza pour, H., Akhavan, H.-R., & Balvardi, M. (2019). Performance of a liquid desiccant-assisted solar juice concentration system for barberry juice. *Solar Energy*, 184, 1–10.
- Alvarez-Icaza, M., Kalisz, H. M., Hecht, H. J., Aumann, K.-D., Schomburg, D., & Schmid, R. D. (1995). The design of enzyme sensors based on the enzyme structure. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(8), 735–742.
- Amarant, T., & Bohak, Z. (1981). Immobilization of proteins as a tool for studying primary structure around their cysteinyl residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 6(3), 237–250.
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017). Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 974–984.
- Andriani, D., Sunwoo, C., Ryu, H.-W., Prasetya, B., & Park, D.-H. (2012). Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 29–33.
- Ansari, S. A., & Husain, Q. (2010). Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(1–2), 68–74.
- Anwar, A., Qader, S. A. U., Raiz, A., Iqbal, S., & Azhar, A. (2009). Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal*, 7(10), 1281–1286.
- Aragon, C. C., Santos, A. F., Ruiz-Matute, A. I., Corzo, N., Guisan, J. M., Monti, R., & Mateo, C. (2013). Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized–stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98, 8–14.
- Asgari, K., Labbafi, M., Khodaiyan, F., Kazemi, M., & Hosseini, S. S. (2020). High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource: Ultrasound assisted extraction and physicochemical, structural and functional analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 1274–1282.



- Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., & Lilly, M. D. (1972). The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 276(1), 250–256.
- Barker, S. A., Somers, P. J., & Epton, R. (1968). Preparation and properties of α -amylase chemically coupled to microcrystalline cellulose. *Carbohydrate Research*, 8(4), 491–497.
- Barnett, L. B., & Bull, H. B. (1959). The optimum pH of adsorbed ribonuclease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 36(1), 244–246.
- Bayramoğlu, G., & Arica, M. Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1–3), 148–155.
- Bayramoglu, G., Tunali, Y., & Arica, M. Y. (2007). Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8(7), 1094–1101.
- Belchetz, P., Crawley, J. C. W., Braidman, I., & Gregoriadis, G. (1977). Treatment of Gaucher's disease with liposome-entrapped glucocerebroside: β -glucosidase. *The Lancet*, 310(8029), 116–117.
- Bernstein, H., Yang, V. C., Lund, D., Randhawa, M., Harmon, W., & Langer, R. (1987). Extracorporeal enzymatic heparin removal: Use in a sheep dialysis model. *Kidney International*, 32(4), 452–463.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. In *Immobilization of enzymes and cells* (pp. 1–11). Springer.
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H. M. N., Hu, H., & Zhang, X. (2017). Delignification and fruit juice clarification properties of alginate-chitosan-immobilized ligninolytic cocktail. *LWT*, 80, 348–354.
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H. M. N., Hu, H., & Zhang, X. (2016). Gelatin-immobilized manganese peroxidase with novel catalytic characteristics and its industrial exploitation for fruit juice clarification purposes. *Catalysis Letters*, 146(11), 2221–2228.



- Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2019). Lignin peroxidase immobilization on Ca-alginate beads and its dye degradation performance in a packed bed reactor system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101205.
- Börjesson, M., Larsson, A., Westman, G., & Ström, A. (2018). Periodate oxidation of xylan-based hemicelluloses and its effect on their thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 202, 280–287.
- Bready, D., & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology Letters*, 31, 1639–1650.
- Brown, H. D., Patel, A. B., & Chattopadhyay, S. K. (1968). Enzyme entrapment within hydrophobic and hydrophilic matrices. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2(2), 231–235.
- Bruckner, V., Kovacs, J., & Denes, G. (1953). Structure of poly-D-glutamic acid isolated from capsulated strains of *B. anthracis*. *Nature*, 172(4376), 508.
- Buchholz, K., & Klein, J. (1987). Characterization of immobilized biocatalysts. In *Methods in enzymology* (Vol. 135, pp. 3–30). Elsevier.
- Cabral, J. M., & Kennedy, J. F. (1991). Covalent and coordination immobilization of proteins. *Bioprocess Technology*, 14, 73–138.
- Caldwell, K. D., Axén, R., Bergwall, M., & Porath, J. (1976a). Immobilization of enzymes based on hydrophobic interaction. II. Preparation and properties of an amyloglucosidase adsorbate. *Biotechnology and Bioengineering*, 18(11), 1589–1604.
- Caldwell, K. D., Axén, R., Wall, M. B., & Porath, J. (1976b). Immobilization of enzymes based on hydrophobic interaction. I. Preparation and properties of a β -amylase adsorbate. *Biotechnology and Bioengineering*, 18(11), 1573–1588.
- Cao, L., van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2000). Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*, 2(10), 1361–1364.
- Cerreti, M., Liburdi, K., Benucci, I., Spinelli, S. E., Lombardelli, C., & Esti, M. (2017). Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice. *LWT-Food Science and Technology*, 82, 58–65.



- Chase Jr, T., & Shaw, E. (1967). p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate HCl: a new active site titrant for trypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29(4), 508–514.
- Chen, X., Wang, Q.-Q., Liu, N.-N., Liu, G.-L., Chi, Z., & Chi, Z.-M. (2017). A glycosyltransferase gene responsible for pullulan biosynthesis in *Aureobasidium melanogenum* P16. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 539–549.
- Chen, Y., Xiao, B., Chang, J., Fu, Y., Lv, P., & Wang, X. (2009). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, 50(3), 668–673.
- Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 438–443.
- Choudhury, A. R., Saluja, P., & Prasad, G. S. (2011). Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1547–1552.
- Costa, S. A., Tzanov, T., Paar, A., Gudelj, M., Gübitz, G. M., & Cavaco-Paulo, A. (2001). Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9–10), 815–819.
- Creighton, T. E. (1984). *Proteins*, Freeman, Oxford, UK.
- Cui, J. D., & Jia, S. R. (2015). Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 15–28.
- Dai, X.-Y., Kong, L.-M., Wang, X.-L., Zhu, Q., Chen, K., & Zhou, T. (2018). Preparation, characterization and catalytic behavior of pectinase covalently immobilized onto sodium alginate/graphene oxide composite beads. *Food Chemistry*, 253, 185–193.
- Dal Magro, L., de Moura, K. S., Backes, B. E., de Menezes, E. W., Benvenutti, E. V., Nicolodi, S., Klein, M. P., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2019). Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnology Reports*, 24, e00373.



- Dal Magro, L., Kornecki, J. F., Klein, M. P., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2020a). Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. *Enzyme and Microbial Technology*, 132, 184–191.
- Dal Magro, L., Pessoa, J. P. S., Klein, M. P., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2020b). Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. *Catalysis Today*, 362, 109397.
- Dal Magro, L., Silveira, V. C. C., de Menezes, E. W., Benvenuti, E. V., Nicolodi, S., Hertz, P. F., Klein, M. P., & Rodrigues, R. C. (2018). Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 35–44.
- de Oliveira, R. L., da Silva, O. S., Converti, A., & Porto, T. S. (2018a). Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1088–1093.
- de Oliveira, R. L., Dias, J. L., da Silva, O. S., & Porto, T. S. (2018b). Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 9–18.
- de Souza Bezerra, T. M., Bassan, J. C., de Oliveira Santos, V. T., Ferraz, A., & Monti, R. (2015). Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, 50(3), 417–423.
- Denčić, I., de Vaan, S., Noël, T., Meuldijk, J., de Croon, M., & Hessel, V. (2013). Lipase-based biocatalytic flow process in a packed-bed microreactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52(32), 10951–10960.
- Deng, Z., Wang, F., Zhou, B., Li, J., Li, B., & Liang, H. (2019). Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. *Food Hydrocolloids*, 89, 691–699.
- Diano, N., Grimaldi, T., Bianco, M., Rossi, S., Gabrovskaa, K., Yordanova, G., Godjevargova, T., Grano, V., Nicolucci, C., & Mita, L. (2008). Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11471–11477.



- Dickey, F. H. (1955). Specific adsorption. *The Journal of Physical Chemistry*, 59(8), 695–707.
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., & Keskinler, B. (2009). Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, 100(6), 1983–1991.
- Dulik, D. M., & Fenselau, C. (1988). Use of immobilized enzymes in drug metabolism studies. *The FASEB Journal*, 2(7), 2235–2240.
- Elnashar, M. (2011). *Biotechnology of biopolymers*. BoD–Books on Demand.
- Eskandarloo, H., & Abbaspourrad, A. (2018). Production of galacto-oligosaccharides from whey permeate using β -galactosidase immobilized on functionalized glass beads. *Food Chemistry*, 251, 115–124.
- Fan, Q. G., Lewis, D. M., & Tapley, K. N. (2001). Characterization of cellulose aldehyde using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 82(5), 1195–1202.
- Fersht, A. (1998). Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: W. H. Freeman & Company, p. 615.
- Gabel, D., Katchalski, E., & Steinberg, I. Z. (1971). Changes in conformation of insolubilized trypsin and chymotrypsin, followed by fluorescence. *Biochemistry*, 10(25), 4661–4669.
- Garcia III, A., Oh, S., & Engler, C. R. (1989). Cellulase immobilization on Fe_3O_4 and characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(3), 321–326.
- Gemeiner, P. (1992). *Materials for enzyme engineering*. In: Gemeiner P (Ed) *Enzyme engineering*. Ellis Horwood, New York.
- Gennari, A., Mobayed, F. H., Catto, A. L., Benvenuti, E. V., Volpato, G., & de Souza, C. F. V. (2019). *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilized on collagen: catalytic stability on batch and packed-bed reactor hydrolysis. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 127(2), 583–599.



- Gharaghani, M., Mousavi, M., Khodaiyan, F., Yarmand, M. S., Omar-Aziz, M., & Hosseini, S. S. (2021). Octenyl succinylation of kefiran: Preparation, characterization and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1197–1209.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzahedi, S. M. T., & Taheri, S. (2012). Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 133(2), 383–389.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127(4), 1496–1502.
- Gisby, P. E., & Hall, D. O. (1980). Biophotolytic H₂ production using alginate-immobilized chloroplasts, enzymes and synthetic catalysts. *Nature*, 287(5779), 251–253.
- Goh, W. J., Makam, V. S., Hu, J., Kang, L., Zheng, M., Yoong, S. L., Udalagama, C. N. B., & Pastorin, G. (2012). Iron oxide filled magnetic carbon nanotube–enzyme conjugates for recycling of amyloglucosidase: toward useful applications in biofuel production process. *Langmuir*, 28(49), 16864–16873.
- Goldstein, L. (1972). Microenvironmental effects on enzyme catalysis. Kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry*, 11(22), 4072–4084.
- Gomez, J. L., Bodalo, A., Gomez, E., Bastida, J., Hidalgo, A. M., & Gomez, M. (2006). Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1016–1022.
- Grosova, Z., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2008). Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry-A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 1–14.
- Guerrero, C., Valdivia, F., Ubilla, C., Ramírez, N., Gómez, M., Aburto, C., Vera, C., & Illanes, A. (2019). Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Bioresource Technology*, 278, 296–302.



- Guo, J., Ge, L., Li, X., Mu, C., & Li, D. (2014). Periodate oxidation of xanthan gum and its crosslinking effects on gelatin-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 39, 243–250.
- Gupta, B., Tummalapalli, M., Deopura, B. L., & Alam, M. S. (2013). Functionalization of pectin by periodate oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1160–1165.
- Gür, S. D., İdil, N., & Aksöz, N. (2018). Optimization of enzyme co-immobilization with sodium alginate and glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 538–552.
- Haghighatpanah, N., Mirzaee, H., Khodaiyan, F., Kennedy, J. F., Aghakhani, A., Hosseini, S. S., & Jahanbin, K. (2020). Optimization and characterization of pullulan produced by a newly identified strain of *Aureobasidium pullulans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 305–313.
- Hamidi, M., Kennedy, J. F., Khodaiyan, F., Mousavi, Z., & Hosseini, S. S. (2019). Production optimization, characterization and gene expression of pullulan from a new strain of *Aureobasidium pullulans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 725–735.
- Hang, H., Cheng, X., Yan, F., Wang, C., & Sun, K. (2020). Immobilized inulinase for the continuous conversion of inulin in the fluidized-bed reactor. *Catalysis Letters*, 1–7.
- Harkins, W. D., Fourt, L., & Fourt, P. C. (1940). Immunochemistry of catalase II. Activity in multilayers. *Journal of Biological Chemistry*, 132(1), 111–118.
- Hartmeier, W. (1988). Immobilized biocatalysts. Berlin: Springer. p. 206.
- Haynes, R., & Walsh, K. A. (1969). Enzyme envelopes on colloidal particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 36(2), 235–242.
- Hirsh, S. L., Bilek, M. M. M., Nosworthy, N. J., Kondyurin, A., Dos Remedios, C. G., & McKenzie, D. R. (2010). A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir*, 26(17), 14380–14388.
- Holyavka, M. G., Kondratyev, M. S., Samchenko, A. A., Kabanov, A. V, Komarov, V. M., & Artyukhov, V. G. (2016). In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase. *Computers in Biology and Medicine*, 71, 198–204.



- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Kazemi, M., & Najari, Z. (2019). Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 621–629.
- Hosseini, S., Parastouei, K., & Khodaiyan, F. (2020). Simultaneous extraction optimization and characterization of pectin and phenolics from sour cherry pomace. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 911–921.
- Johnsson, B., Löfås, S., & Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry*, 198(2), 268–277.
- Joshi, V. K., Parmar, M., & Rana, N. (2011). Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(2), 189–197.
- Kaetsu, I., Kumakura, M., Asano, M., Yamada, A., & Sakurai, Y. (1980). Immobilization of enzymes for medical uses on plastic surfaces by radiation-induced polymerization at low temperatures. *Journal of Biomedical Materials Research*, 14(3), 199–210.
- Kahraman, M. V., Bayramoğlu, G., Kayaman-Apohan, N., & Güngör, A. (2007). α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. *Food Chemistry*, 104(4), 1385–1392.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., & Hosseini, S. S. (2019a). Utilization of food processing wastes of eggplant as a high potential pectin source and characterization of extracted pectin. *Food Chemistry*, 294, 339–346.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., & Hosseini, S. S. (2019b). Eggplant peel as a high potential source of high methylated pectin: Ultrasonic extraction optimization and characterization. *LWT*, 105, 182–189.
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., Hosseini, S. S., & Najari, Z. (2019c). An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. *Waste Management*, 100, 101–111.



- Kazemi, M., Khodaiyan, F., Labbafi, M., & Hosseini, S. S. (2020). Ultrasonic and heating extraction of pistachio by-product pectin: physicochemical, structural characterization and functional measurement. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 679–693.
- Khan, A. A., & Alzohairy, M. A. (2010). Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. *Res J Biol Sci*, 5(8), 565–575.
- Kholiya, F., Chaudhary, J. P., Vadodariya, N., & Meena, R. (2016). Synthesis of bio-based aldehyde from seaweed polysaccharide and its interaction with bovine serum albumin. *Carbohydrate Polymers*, 150, 278–285.
- Kim, J., Cho, J., Seidler, P. M., Kurland, N. E., & Yadavalli, V. K. (2010). Investigations of chemical modifications of amino-terminated organic films on silicon substrates and controlled protein immobilization. *Langmuir*, 26(4), 2599–2608.
- Kim, J., Jia, H., & Wang, P. (2006). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, 24(3), 296–308.
- Kim, U.-J., Wada, M., & Kuga, S. (2004). Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 7–10.
- Koch-Schmidt, A. C., & Mosbach, K. (1977). Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 2. Specific activity and thermal stability of enzymes bound weakly and strongly to Sepharose CL 4B. *Biochemistry*, 16(10), 2105–2109.
- Koch-Schmidt, A. C., & Mosbach, K. (1977). Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 1. Thermal stability of nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenases. *Biochemistry*, 16(10), 2101–2105.
- Kumar, K., Kataria, M., & Verma, N. (2013). Plant asparaginase-based asparagine biosensor for leukemia. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41(3), 184–188.



- Kyeong, J. S., & Yeom, S. H. (2014). Preparation of immobilized whole cell biocatalyst and biodiesel production using a packed-bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(11), 2189–2198.
- Ladole, M. R., Muley, A. B., Patil, I. D., Talib, M., & Parate, V. R. (2015). Immobilization of tropizyme-P on amino-functionalized magnetic nanoparticles for fruit juice clarification. *Journal of Biochemical Technology*, 5(4), 838–845.
- Landbo, A.-K. R., Pinelo, M., Vikbjerg, A. F., Let, M. B., & Meyer, A. S. (2006). Protease-assisted clarification of black currant juice: synergy with other clarifying agents and effects on the phenol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6554–6563.
- Langmuir, I., & Schaefer, V. J. (1938). Activities of urease and pepsin monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(6), 1351–1360.
- Lei, Z., & Bi, S. (2007). The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1442–1447.
- Lei, Z., & Jiang, Q. (2011). Synthesis and properties of immobilized pectinase onto the macroporous polyacrylamide microspheres. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2592–2599.
- Li, H., Wu, B., Mu, C., & Lin, W. (2011). Concomitant degradation in periodate oxidation of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 881–886.
- Li, T., Li, S., Wang, N., & Tain, L. (2008). Immobilization and stabilization of pectinase by multipoint attachment onto an activated agar-gel support. *Food Chemistry*, 109(4), 703–708.
- Li, T., Wang, N., Li, S., Zhao, Q., Guo, M., & Zhang, C. (2007). Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnology Letters*, 29(9), 1413–1416.
- Libertino, S., Giannazzo, F., Aiello, V., Scandurra, A., Sinatra, F., Renis, M., & Fichera, M. (2008). XPS and AFM characterization of the enzyme glucose oxidase immobilized on SiO₂ surfaces. *Langmuir*, 24(5), 1965–1972.



- Lodish, H., Darnell, J., Beck, A., Zipursky, L., Mitsudira, P., & Baltimore, D. (1999). *Molecular cell biology*, W.H. Freeman, New York.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Mahmoud, K. F., Abo-Elmagd, H. I., & Housseiny, M. M. (2018). Micro-and nano-capsulated fungal pectinase with outstanding capabilities of eliminating turbidity in freshly produced juice. *Food Science and Technology International*, 24(4), 330–340.
- Marchis, T., Cerrato, G., Magnacca, G., Crocellà, V., & Laurenti, E. (2012). Immobilization of soybean peroxidase on aminopropyl glass beads: structural and kinetic studies. *Biochemical Engineering Journal*, 67, 28–34.
- Mayer, J., Kranz, B., & Fischer, L. (2010). Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β -glycosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biotechnology*, 145(4), 387–393.
- Mazzini, F., Nuti, E., Petri, A., & Rossello, A. (2011). Immobilization of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) for online drug screening. *Journal of Chromatography B*, 879(11–12), 756–762.
- McLaren, A. D. (1957). Concerning the pH dependence of enzyme reactions on cells, particulates and in solution. *Science*, 125(3250), 697.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205–220.
- Mosbach, K., & Brodelius, P. (1987). Immobilized enzymes and cells. B. II: Immobilization technique for cells/organelles. *Methods in Enzymology*, 135, 171–472.



- Mosbach, K., & Mosbach, R. (1966). Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques. *Acta Chem. Scand*, 20(10), 2807–2810.
- Mousazadeh, F., van Den Akker, H. E. A., & Mudde, R. F. (2013). Direct numerical simulation of an exothermic gas-phase reaction in a packed bed with random particle distribution. *Chemical Engineering Science*, 100, 259–265.
- Mu, C., Guo, J., Li, X., Lin, W., & Li, D. (2012). Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 22–29.
- Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2019). A co-immobilization of pectinase and cellulase onto magnetic nanoparticles for antioxidant extraction from waste fruit peels. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 470–479.
- Nakanishi, K., Kamikubo, T., & Matsuno, R. (1985). Continuous synthesis of N-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester with immobilized thermolysin in an organic solvent. *Bio/Technology*, 3(5), 459–464.
- Nazarov, N. M., Bezborodov, A. M., Solomon, Z. G., Biber, B. L., & Malykh, Ei. (1998). Immobilized catalase in water purification systems. *Aviakosmicheskaja i Ekologicheskaja Meditsina= Aerospace and Environmental Medicine*, 32(4), 28–33.
- Neifar, S., Cervantes, F. V, Bouanane-Darenfed, A., BenHlima, H., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., & Bejar, S. (2020). Immobilization of the glucose isomerase from *Caldicoprobacter algeriensis* on Sepabeads EC-HA and its efficient application in continuous High Fructose Syrup production using packed bed reactor. *Food Chemistry*, 309, 125710.
- Nelson, J. M., & Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38(5), 1109–1115.
- Nelson, J. M., & Hitchcock, D. I. (1921). The activity of adsorbed invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 43(8), 1956–1961.



- Nouri, M. (2020). Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly-aldehyde kefiran cross-linker to immobilize pectinase enzyme. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101681.
- Pasandide, B., Khodaiyan, F., Mousavi, Z., & Hosseini, S. S. (2018). Pectin extraction from citron peel: optimization by Box–Behnken response surface design. *Food Science and Biotechnology*, 27(4), 997–1005.
- Pasternack, R. M., Rivillon Amy, S., & Chabal, Y. J. (2008). Attachment of 3-(aminopropyl) triethoxysilane on silicon oxide surfaces: dependence on solution temperature. *Langmuir*, 24(22), 12963–12971.
- Pauliukaite, R., Ghica, M. E., Fatibello-Filho, O., & Brett, C. M. A. (2009). Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite– epoxy composite electrode. *Analytical Chemistry*, 81(13), 5364–5372.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579–590.
- Powers, R., Copeland, J. C., Germer, K., Mercier, K. A., Ramanathan, V., & Revesz, P. (2006). Comparison of protein active site structures for functional annotation of proteins and drug design. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(1), 124–135.
- Qi, D., Gao, M., Li, X., & Lin, J. (2020). Immobilization of pectinase onto porous hydroxyapatite/calcium alginate composite beads for improved performance of recycle. *ACS Omega*, 5(32), 20062–20069.
- Quiocho, F. A., & Richards, F. M. (1964). Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52(3), 833–839.
- Rajdeo, K., Harini, T., Lavanya, K., & Fadnavis, N. W. (2016). Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 12–19.



- Rehman, H. U., Aman, A., Nawaz, M. A., Karim, A., Ghani, M., Baloch, A. H., & Qader, S. A. U. (2016). Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 127–133.
- Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., Molinaro, A., & Ansari, A. (2013). Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, 139(1–4), 1081–1086.
- Rehman, H. U., Aman, A., Zohra, R. R., & Qader, S. A. U. (2014a). Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. *Carbohydrate Polymers*, 102, 622–626.
- Rehman, H. U., Nawaz, M. A., Aman, A., Baloch, A. H., & Qader, S. A. U. (2014b). Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 282–287.
- Robinson, J. E., Holton, D., Liu, J., McMurdo, H., Murciano, A., & Gohd, R. (1990). A novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to HIV-1 envelope glycoproteins based on immobilization of rival glycoproteins in microtiter wells coated with concanavalin A. *Journal of Immunological Methods*, 132(1), 63–71.
- Rolim, T., Cancino, J., & Zucolotto, V. (2015). A nanostructured genosensor for the early diagnosis of systemic arterial hypertension. *Biomedical Microdevices*, 17(1), 2–10.
- Salmanian, H., Khodaiyan, F., & Hosseini, S. S. (2019). Biodegradable kefiran-chitosan-nanocellulose blend film: Production and physical, barrier, mechanical, thermal, and structural properties. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 2(2), 101–106.
- Sandri, I. G., Lorenzoni, C. M. T., Fontana, R. C., & da Silveira, M. M. (2013). Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT-Food Science and Technology*, 51(2), 469–475.



- Sangeetha, K., & Abraham, T. E. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 314–319.
- Santana, M. L., Bispo, J. A. C., de Sena, A. R., Teshima, E., de Brito, A. R., Costa, F. S., Franco, M., & de Assis, S. A. (2020). Clarification of tangerine juice using cellulases from *Pseudomyces* sp. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*. In press.
- Sarraf, M., Beig Babaei, A., & Naji-Tabasi, S. (2019). Investigating functional properties of barberry species: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5255–5269.
- Shahrestani, H., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., & Tavakoli, O. (2016). Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1, 3, 5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 51–58.
- Sharma, H. P., Patel, H., & Sharma, S. (2014). Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits—a review. *Trends Post Harvest Technol*, 2(1), 1–14.
- Shelby, J. E. (2020). *Introduction to glass science and technology*. Royal society of chemistry.
- Sheldon, R., & Pelt, S. (2013). Van Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Soc. Rev*, 42, 6223–6235.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289–1307.
- Sin, H. N., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Rahman, R. A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 73(4), 313–319.
- Singh, R. S., Kaur, N., & Kennedy, J. F. (2019). Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. *Carbohydrate Polymers*, 217, 46–57.
- Singh, R. S., Kaur, N., Rana, V., & Kennedy, J. F. (2017). Pullulan: a novel molecule for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 171, 102–121.



- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*, Freeman, New York.
- Su, M.-S., & Silva, J. L. (2006). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 97(3), 447–451.
- Sugumaran, K. R., Jothi, P., & Ponnusami, V. (2014). Bioconversion of industrial solid waste-Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. *Carbohydrate Polymers*, 99, 22–30.
- Sykes, B. D. (1968). A NMR study of the interaction of N-trifluoroacetyl-D-phenylalanine with α -chymotrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 33(5), 727–732.
- Tatsumi, K., Wada, S., & Ichikawa, H. (1996). Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(1), 126–130.
- Thangaraj, B., Muniyandi, B., Ranganathan, S., & Xin, H. (2015). Functionalized magnetic nanoparticles for catalytic application—a review. *Reviews in Advanced Sciences and Engineering*, 4(2), 106–119.
- Thangaraj, B., & Solomon, P. R. (2019). Immobilization of lipases—A review. Part I: Enzyme immobilization. *ChemBioEng Reviews*, 6(5), 157–166.
- Torchilin, V. P., Papisov, M. I., & Smirnov, V. N. (1985). Magnetic Sephadex as a carrier for enzyme immobilization and drug targeting. *Journal of Biomedical Materials Research*, 19(4), 461–466.
- Trevan, M. (1980). Techniques of immobilization. In *Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology* (pp. 1–9). Wiley, Chichester-New York.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its many functional components as related to human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 635–654.
- Wahab, W. A. A., Karam, E. A., Hassan, M. E., Kansoh, A. L., Esawy, M. A., & Awad, G. E. A. (2018). Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 24 full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of



- operational covalent immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 159–170.
- Waldmann, H., & Drauz, K. (2002). *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook, Vols. I-III*. Wiley-VCH.
 - Wang, Y., & Caruso, F. (2005). Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chemistry of Materials*, 17(5), 953–961.
 - Wood, L. L., & Calton, G. J. (1984). A novel method of immobilization and its use in aspartic acid production. *Bio/Technology*, 2(12), 1081–1084.
 - Wu, R., Wang, Q., & Wang, G. (2019). Immobilized enzyme on pulp fiber through layer-by-layer technique using cationic polyacrylamide for whitewater treatment from papermaking. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(10), 1583–1589.
 - Xu, F., Wang, W.-H., Tan, Y.-J., & Bruening, M. L. (2010). Facile trypsin immobilization in polymeric membranes for rapid, efficient protein digestion. *Analytical Chemistry*, 82(24), 10045–10051.
 - Yang, S., Dai, X., Wei, X., Zhu, Q., & Zhou, T. (2019). Co-immobilization of pectinase and glucoamylase onto sodium alginate/graphene oxide composite beads and its application in the preparation of pumpkin–hawthorn juice. *Journal of Food Biochemistry*, 43(3), e12741.
 - Yavaşer, R., & Karagözler, A. A. (2020). Covalent immobilization of papain onto poly (hydroxyethyl methacrylate)-chitosan cryogels for apple juice clarification. *Food Science and Technology International*, 26(7), 629–641.
 - Yokote, Y., Kimura, K., & Samejima, H. (1975). Production of high fructose syrup by glucose isomerase immobilized on phenol-formaldehyde resin. *Starch-Stärke*, 27(9), 302–306.
 - Zhang, F., Zheng, B., Zhang, J., Huang, X., Liu, H., Guo, S., & Zhang, J. (2010). Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: physical properties and applications in phenolic compound removal. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(18), 8469–8473.



- Zheng, M.-M., Dong, L., Lu, Y., Guo, P.-M., Deng, Q.-C., Li, W.-L., Feng, Y.-Q., & Huang, F.-H. (2012). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic poly (allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) polymer microsphere for synthesis of phytosterol esters of unsaturated fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1–2), 16–23.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO₂ nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 340–345.

- ❖ Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Mousavi, S. M. E., Azimi, S. Z., & Gharaghani, M. (2020). Immobilization of pectinase on the glass bead using polyaldehyde kefiran as a new safe cross-linker and its effect on the activity and kinetic parameters. *Food Chemistry*, 309, 125777.
- ❖ Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Mousavi, S. M. E., Kennedy, J. F., & Azimi, S. Z. (2021). A health-friendly strategy for covalent-bonded immobilization of pectinase on the functionalized glass beads. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 177–186.
- ❖ Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Mousavi, S. M., & Azimi, S. Z. (2021). Clarification of the pomegranate juice in a bioreactor packed by pectinase enzymes immobilized on the glass bead activated with polyaldehyde polysaccharides. *LWT*, 137, 110500.
- ❖ Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Mousavi, S. M., & Azimi, S. Z. (2021). Continuous clarification of barberry juice with pectinase immobilized by oxidized polysaccharides. *Food Technology and Biotechnology*, 59. In press.

Abstract

In this study, polyaldehyde polysaccharides were used to immobilize the pectinase enzymes on glass beads and then these enzyme-containing glass beads were applied for batch and continuous clarification of pomegranate and barberry juice samples in a packed bed bioreactor. For this purpose and for formation of free aldehyde groups, pullulan and kefiran were first partially oxidized by sodium periodate and 19.9 ± 1.3 and $23.6 \pm 0.9\%$ of free aldehyde groups were formed on them, respectively, that confirmed by FTIR spectra. Afterward, the mentioned cross-linkers and also glutaraldehyde were used to immobilize pectinase enzymes on glass beads. The obtained results showed that kefiran polyaldehyde had the highest capacity in enzyme immobilization so that protein content of the beads containing glutaraldehyde, pullulan polyaldehyde and kefiran polyaldehyde was 0.41 ± 0.05 , 1.83 ± 0.21 and 5.25 ± 0.86 mg/10 glass beads, respectively. Also, the presence of polymer network on the glass beads was confirmed by SEM and AFM. The findings indicated that the maximum activity of the free pectinase and enzymes immobilized by glutaraldehyde, pullulan polyaldehyde and kefiran polyaldehyde in optimum conditions (temperature of 50°C , and pH of 5 and 5.5 for free and immobilized enzymes, respectively) was 2.93 ± 0.13 , 2.56 ± 0.12 , 2.21 ± 0.18 and 1.87 ± 0.24 unit/mg protein, respectively. Also, in these conditions, kinetic parameters including K_m (mg/mL) and V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$) were 9.71 ± 0.22 and 3.07 ± 0.13 for free enzymes, 10.07 ± 0.37 and 2.93 ± 0.29 for enzymes immobilized by glutaraldehyde, 11.21 ± 0.24 and 2.24 ± 0.18 for enzymes immobilized by pullulan polyaldehyde and 11.58 ± 0.31 and 2.17 ± 0.14 for enzymes immobilized by kefiran polyaldehyde. In addition, the enzymes immobilized by pullulan polyaldehyde had the highest reusability and then the enzymes immobilized by kefiran polyaldehyde and glutaraldehyde were in second and third place. The obtained results showed that the method used in the present study was well able to clarify pomegranate and barberry juice samples and led to a significant decrease in turbidity and a significant increase in clarity of both fruit juice samples. The study of fruit juice properties also showed that the clarification process led to a decrease in pH, total soluble solids, viscosity, total phenol content, free radical scavenging activity and green – red value and an increase in total titratable acidity, reducing sugar content, lightness value and blue – yellow value. The obtained results showed that the polyaldehyde kefiran-immobilized pectinase in continuous operation had the greatest effect on the juice properties which was probably due to the greater capacity of this cross-linker in enzyme immobilization and also the more and better contact between the active site of the immobilized pectinase and substrate in continuous process. Finally, it can be stated that the method used in the current study could be a potential alternative to conventional industrial methods involving the use of free enzymes in batch operation.

Keywords: Pectinase; Glass beads; Polyaldehyde polysaccharides; Covalent immobilization; Packed bed bioreactor; Fruit juice clarification



College of Agriculture and Natural Resources
Faculty of Agricultural Engineering and Technology
Department of Food Science, Engineering and Technology

**Continuous clarification of fruit juice in pecked bed reactor by covalent
immobilization of pectinase enzyme on the glass beads with aldehyde
polysaccharides**

By
Seyed Saeid Hosseini

Under Supervision of
Dr. Faramarz Khodaiyan

Advised by
Dr. Seyed Mohammad Mousavi

A Thesis
For fulfillment of the Requirements for Ph.D. Degree in
Food Science and Engineering-Food Microbiology

May 2021