(مقاله پژوهشی)

بهینه‌سازی تثبیت آنزیم پکتیناز بر سیلیکا آئروژل وکاربرد آن در استخراج ترکیبات فنلی‌تفاله انگور

اسماعیل فرامرزی‌آق گنبد[۱]، لیلا امیرخانی[۲*]، سید مهدی هدایت زاده[۳]، فهیمه درخشان فرد[۲]

۱- دانشجوی دکتری،گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲- استادیار،گروه مهندسی شیمی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۳-استادیار،گروه مهندسی شیمی، واحد ایلخچی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلخچی، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰

چکیده

یکی‌ازکاربردهای تجاری آنزیم پکتیناز، پکتین‌زدایی و شفاف‌سازی آب‌میوه‌ها و استخراج ترکیبات فنلی از میوه‌ها است. تثبیت پکتیناز یکی از روش‌های پایدارسازی آن است که امکان جداسازی آنزیم از واکنش و استفاده مجدد از آن را فراهم ساخته و در نتیجه هزینه استفادهٔ آنزیم در صنعت را کاهش‌می‌دهد. در این تحقیق آنزیم پکتیناز حاصل از *آسپرژیلوس نایجر* بر روی سیلیکا آئروژل آبدوست به‌روش‌جذب‌سطحی‌تثبیت‌گردید. جذب‌سطحی شامل برهمکنش‌های هیدروژنی، آبگریز و واندروالس بین حامل جامد و مولکول‌های جذب شونده‌هستند و به دلیل‌سادگی، باقی ماندن فعالیت کاتالیستی بالا و قابلیت استفادهٔ مجدد حامل‌ها بعد از غیر فعال شدن آنزیم‌های تثبیت شده، پتانسیل اقتصادی بالاتری را در مقایسه با سایر روش‌های تثبیت دارد. پایه‌های سیلیکا آئروژل حاوی پکتیاز توسط آزمونهای طیف‌سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه و میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین خواص شدند. پارامترهای تاثیرگذار در تثبیت آنزیم (زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH) با استفاده از روش سطح پاسخ مطالعه و کاربرد آنزیم تثبیت‌شده در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور بررسی‌گردید. نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های تعیین خواص و اندازه‌گیری بازده تثبیت، نشان از تثبیت موثر آنزیم بر پایه سیلیکا آئروژل داشت. شرایط بهینه برای تثبیت، در pH معادل ۵، نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱ و زمان ۸۹/۲ دقیقه به دست آمد. بازده تثبیت در این شرایط ۷۸/۱ درصد بود. نتایج آزمایشگاهی و مدل‌سازی تفاوت معناداری با هم نداشتند که نشان از کفایت مدل به دست آمده داشت. میزان استخراج ترکیبات فنلی توسط آنزیم پکتیناز تثبیت شده بر پایه سیلیکا آئروژل از تفاله انگور، ٪۷۸/۷ و درصد گیرندگی رادیکال آزاد ٪۵۵/۷، نسبت به حالتی که تیمار آنزیمی انجام نگرفت، افزایش یافت.

واژه های کلیدی: تثبیت آنزیم، پکتیناز، سیلیکا آئروژل، تفاله انگور، ترکیبات فنلی.

[*] مسئول‌مکاتبات: l-amirkhani@iau-ahar.ac.ir

۱- مقدمه

پکتینازها(E.C.3.2.1.15)،کاربردهای‌مهمی‌درصنایع نساجی، کاغذسازی، دارویی، تصفیه پساب و همچنین شفاف‌سازی و کاهش‌کدورت آب میوه‌ها و در نتیجه بهبود کیفیت، بازده و قابلیت فیلتراسیون آن‌ها دارند. این آنزیم‌ها، ترکیبات پکتیکی را از طریق شکستن باند α-۱و۴ گلیکوزیدی بین دو باقیمانده گالاکتورونیک، تجزیه می‌کنند (۲۳،۲۱،۱۰). همچنین تیمار میوه‌ها با پکتیناز به‌آزادسازی ترکیبات فنلی از پوست میوه کمک می‌کند. این ترکیبات، می‌توانند نقش مهمی به عنوان آنتی‌اکسیدان جهت حفظ سلامتی و پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی و انواع سرطان‌ها داشته باشند (۱۴). از آنجا که دیواره سلولی میوه‌ها، از سلولز، همی‌سلولز، پکتین، پروتئین و همچنین ترکیبات فنولی متصل به پلی‌ساکاریدها از طریق باندهای هیدروژنی و آب‌گریز، تشکیل شده است، آنزیم‌های مختلفی مثل سلولاز، پکتیناز، و همی سلولاز می‌توانند به عنوان عوامل هیدرولیزکننده برای تخریب دیواره سلولی و سهولت آزادسازی‌ترکیبات‌فنولی مورد استفاده قرار بگیرند. این‌آنزیمها همچنین می‌توانند برای افزایش نفوذ دیواره سلولی‌که منجر به آزادسازی ترکیبات فنولی و افزایش بازده استخراج ترکیبات بیواکتیومی‌شود، مورداستفاده‌قرارگیرند. مکانیسم دیگر احتمالا اثرمستقیم‌آنزیم درشکستن پیوندهای استری و اتری بین فنول‌ها ودیواره‌سلولی‌پلیمری‌گیاه است. آنزیم‌ها در تحقیقات مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی ازگیاهان و میوه‌ها مثل انگور، گوجه‌فرنگی و سیب و... مورد استفاده قرارگرفته‌اند (۱۶). در تحقیقی‌که توسط فرناندز[1] و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی تاثیرآنزیم‌های‌پکتیناز،سلولازوتاننار بر روی استخراج ترکیبات فنولی‌ازپوست‌ودانه‌انگور صورت گرفته است، پکتیناز بیشترین تاثیر بر استخراج ترکیبات فنولی داشته و ۲/۵ برابر افزایش در بازده استخراج را در مقایسه با نمونه کنترل نشان داد (۱۳). با این‌حال‌کاربرد این‌آنزیم‌ها در صنعت، به دلیل پایداری‌کم آنها در شرایط عملیاتی مختلف و نیز مشکلات مربوط به بازیابی و استفاده‌مجددشان، محدودشده است. تثبیت آنزیم بر روی یک پایه، می‌تواند روش‌مناسبی برای تهیه بیوکاتالیست مناسب در کاربردهای‌خاص‌باشد(۹)روش‌های‌مختلفی مانند به دام اندازی درآلژینات،جذب‌سطحی‌روی‌پایه‌های‌رزینی،آلومیناو نانوذرات سیلیکایی و پیوندهای کووالانسی با پایه‌هایی چون شیشه‌های متخلخل و نایلون برای تثبیت آنزیم پکتیناز مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال یافتن پایه‌ها و روش‌های‌جدید برای تثبیت‌آنزیم‌ها، اهمیت زیادی درتکنولوژی‌آنزیم دارد (۵، ۲۵). پایه‌مناسب برای‌تثبیت‌آنزیم باید دارای تخلخل، مساحت سطح و ظرفیت بالا بوده و علاوه بر پایداری مکانیکی و شیمیایی مناسب، طول‌عمرزیادی نیز داشته باشد (۱۹،۱). آئروژل‌ها جزء پیشرفته‌ترین مواد در زمینه علم مواد بوده و به دلیل خواص منحصر به فردشان، کاربردهای‌تکنولوژیکی متعددی در صنایع مختلف دارند. آئروژل‌های سیلیکایی از شبکه‌ای با پیوندهای عرضی‌ذرات‌سیلیکاساخته شده‌اند (۲، ۴). این ساختارها موادی با خواص غیر عادی مثل مساحت سطح ویژه بالا (۵۰۰ تا ۱۲۰۰ مترمربع‌برگرم)، تخلخل بالا (۸۰ تا ۹۹/۸ درصد)، چگالی پایین (تا۰/۰۰۵گرم‌برسانتی‌مترمکعب)،هدایت حرارتی پایین (۰/۰۰۲ وات بر متر برکلوین)، سرعت صوت پایین (۱۰۰ متر بر ثانیه)، شفافیت فوق العاده زیاد (تقریبا ۹۰٪) در ناحیه مرئی، ثابت دی الکتریک بسیار پایین (۱/۰ تا ۲/۰= k) و ضریب شکست پایین (تقریبا ۱/۰۵) هستند. سنتز آئروژل‌های سیلیکایی از سال ۱۹۳۰ که اولین‌بارتوسط‌آقای‌کیسلرانجام شد تا کنون به تفضیل مورد توجه و بررسی قرارگرفته است (۱۱، ۱۵ ،۱۷). تولید تجاری آئروژل‌های‌سیلیکایی‌وبهره‌برداری‌گسترده‌ازآنهادرکاربردهای مختلف‌به‌دلیل‌دومشکل‌عمده‌استفاده‌ازپیش‌ماده‌های‌گران‌قیمت وخطرناک‌آلکوکسیدهای سیلیکونی و نیز روش خشک‌کردن فوق بحرانی‌محدودمی‌شود. خشک کردن فوق بحرانی به دلیل استفاده از اتوکلاوهای گران‌قیمت، خطرناک بوده و مصرف انرژی‌بالانیاز داشته و امکان تولید این مواد را به صورت پیوسته محدودمی‌کند. استفاده ازمادهاولیه ارزان‌قیمت و بی‌خطر سدیم سیلیکات و روش‌خشک‌کردن در دما و فشار محیط تحت

1 -Fernández

شرایط خاص، هزینه‌های مربوط به سنتز این مواد تا حد قابل توجهی پایین می‌آورد (۲۰). در سال‌های اخیر تحقیقاتی در خصوص تثبیت آنزیم‌ها بر پایه سیلیکا آئروژل انجام‌شده است. دراین‌تحقیقات،آنزیم لیپاز با منابع مختلف بر روی‌آئروژل های سیلیکایی‌وکامپوزیت‌های‌آن‌هابه روش‌کپسوله‌کردن تثبیت‌شده است. آئروژل‌های مورد استفاده با مواد اولیه مختلف سنتز و به روش فوق بحرانی خشک شدند. در این کارها، اثر پارامترهای مختلف از قبیل نوع ماده اولیه، آب‌دوستی یا آب‌گریزی پایه، ساختار حفرات، پیرسازی[1] در حلال‌های مختلف، نوع فرایند خشک‌کردن‌ونیزپارامترهای‌تاثیرگذاردرواکنش‌های‌هیدرولیز، استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون[2] بر فعالیت آنزیم لیپاز بررسی شده است (۶، ۷، ۲۴). در کارهای تحقیقاتی انجام شده ثابت‌شده است که نه مرحله ژلاسیون و نه مرحله خشک کردن فوق بحرانی تاثیری درآنزیم کپسوله‌شده در سیلیکا ائروژل ندارند. لیپاز پخش شده در ماتریس جامد آئروژل تمایل کمی برای تجمع نسبت به لیپاز آزاد داشته به همین دلیل مقدار سایت‌های در دسترس برای آنزیم بالا بوده و فعالیت آنزیم در حالت تثبیت شده حتی در برخی موارد بالاتر از آنزیم آزاد بود (۱۲، ۱۸، ۲۲). درتحقیقی که توسط امیرخانی و همکارانش در خصوص تثبیت آنزیم لیپاز بر روی پایه سیلیکا آئروژل مغناطیسی سنتز شده در دما و فشار محیط، انجام شد، پتانسیل بالای این پایه‌ها در حفظ فعالیت اولیه آنزیم و قابلیت بالای جداسازی و استفاده مجدد آن‌ها از محیط واکنش نشان داده شد(۳).دراین تحقیق بعد از سنتزآئروژل‌های‌سیلیکایی‌آبدوست در شرایط دما و فشار محیط با استفاده از ماده ارزان قیمت سدیم سیلیکات، بهینه‌سازی تثبیت آنزیم پکتیناز بر روی این پایه به روش جذب سطحی انجام شد و پس از تعیین خواص، این بیوکاتالیست‌ها در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور، مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد اولیه به‌کار رفته درسنتز سیلیکا آئروژل آب‌دوست، شامل سدیم‌سیلیکات‌باچگالی۱/۳۵گرم‌برسانتیمترمکعب،هیدورکسید آمونیوم،هگزان‌نرمال، ایزوپروپیل الکل، تری متیل کلروسیلان[3] (TMCS) و رزین‌های تبادل یونی بودندکه همه این مواد از شرکت مرک تهیه شدند. در فرایند تثبیت آنزیم نیز پکتیناز *آسپرژیلوس‌نایجرو* پلی گالاکتورونیک اسید از شرکت سیگما آلدریچ‌و۳و۵دی‌نیتروسالیسیک اسید و سدیم استات از شرکت مرک خریداری گردید.

۲-۲-تجهیزات وآزمون‌ها

آئروژل‌های‌سیلیکایی‌در ظروف تفلونی سنتز شدند. این ظروف درب‌دارغیر قابل نفوذ به هوا بوده و از خروج حلال‌ها و عوامل اصلاح‌کننده‌سطح‌جلوگیری‌کرده و برای انجام مراحل مختلف سنتزبه‌کاررفتند(شکل۱). درکلیه‌مراحل‌سنتز، درب این ظروف به منظورجلوگیری از خروج بخارات و خشک‌شدن سطح ژل، توسط پیچ‌های تعبیه‌شده در قسمت بالای‌آن کاملا بسته شد. به منظور تامین درجه‌حرارت واکنش‌ها در دمای مشخص و نیز به منظورخشک‌کردن ژل‌ها بعد از انجام مراحل واکنش از آون استفاده‌گردید.ازکوره‌الکتریکی (شرکت شیماز، ساخت کشور ایران) به‌منظورکلسینه‌کردن و حرارت دادن نمونه‌ها در دماهای بالا استفاده شد. برای تنظیم و کنترل pH محلول سل از pH متر(Hanna pH meter, checker, HI98103) و برای رقیق‌کردن و انجام تبادل یونی و افزودن یکنواخت کاتالیست به‌مخلوط‌واکنش، از همزن مغناطیسی (Stuart Scientific، ساخت انگلستان) استفاده شد. برای تعیین مساحت سطح ویژه، حجم و توزیع اندازه حفرات از آنالیز جذب و دفع نیتروژن توسط دستگاه BEL Sorp-II mini ساخت‌کشور ژاپن استفاده شد. آنالیز میکروسکوپی الکترونی روبشی با وضوح بالا با استفاده از دستگاه FESEM (Mira 3-XMU, Tescan USA Inc.)

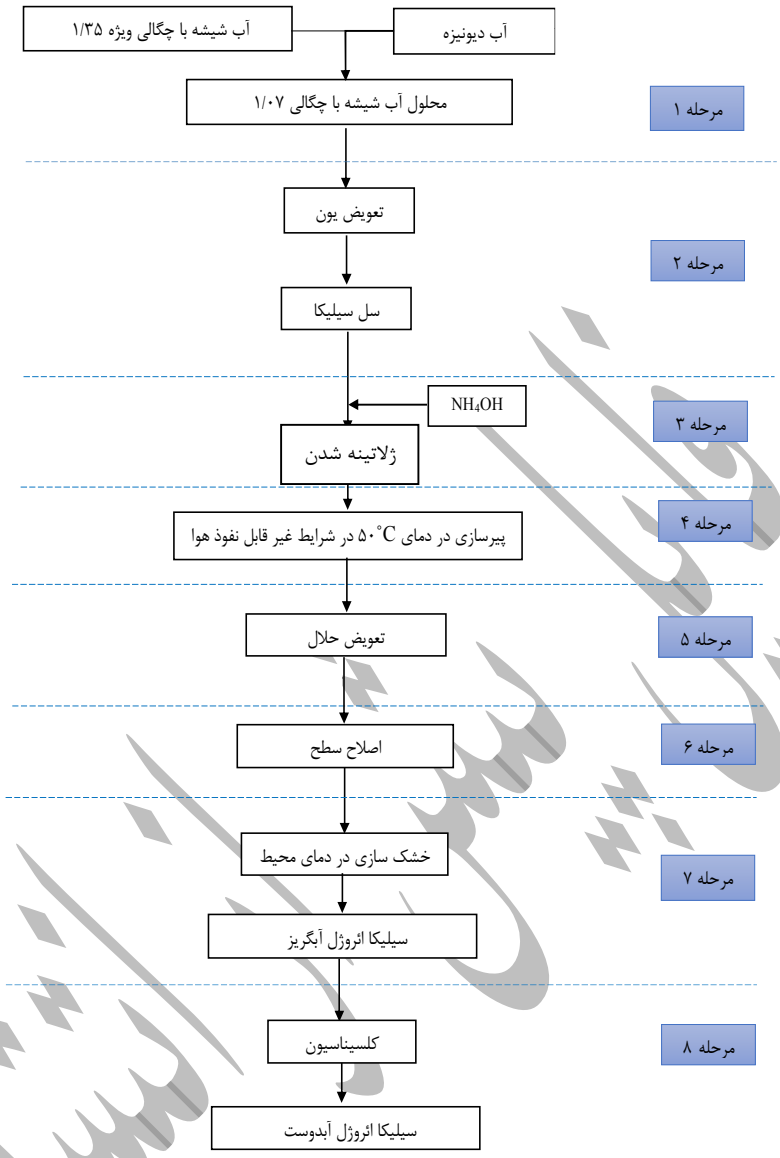
1-Aging
2- Transesterification
3- Trimethylchlorosilane

انجام گرفت. گروه‌های عاملی موجود در نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از آنالیز طیف‌سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه (FTIR, PU 9800, from Philips, Netherlands) در محدوده‌طول‌موج ۴۰۰nm -۴۰۰۰ مطالعه شد. برای خشک کردن نمونه‌های تفاله انگور، آون تحت خلا (Lab Tech، ساخت کشور کره جنوبی) استفاده شد.

شکل ۱- ظروف تفلونی سنتز سیلیکا آئروژل

۲-۳- روش سنتز سیلیکا آئروژل آب‌دوست

سنتز سیلیکا آئروژل خالص آب‌دوست با استفاده از ماده اولیه سدیم سیلیکات و خشک‌کردن در دما و فشار محیط شامل هفت مرحله می باشد (شکل ۲). در مرحله اول، محلول سدیم سیلیکات با چگالی ۱/۳۵ با آب دیونیزه به نسبت ۱ به ۴ رقیق می‌شودتا به چگالی ۱/۰۷ برسد. در مرحله دوم به منظور حذف یون‌های Na^+، از رزین‌های تبادل یونی با نسبت حجمی مساوی به محلول‌سدیم سیلیکات‌رقیق‌شده اضافه گردید. محلول حاصل و رزین‌های تبادل یونی‌توسط همزن مغناطیسی به مدت ۳ دقیقه با سرعت۵۰۰ دور بر دقیقه مخلوط شدند. بعد از تشکیل سیلیسیک‌اسیدبا pH در حدود ۲، محلول هیدروکسید آمونیوم (۱/۰ مولار)، به‌محلول اضافه می‌شود تا pH آن به منظور انجام ژلاتینه شدن به ۴ افزایش پیدا کند. سل سیلیکایی بدست آمده سریعابه‌ظروف‌تفلونی‌انتقال‌پیداکرده‌و در مرحله سوم هیدروژل تشکیل می‌گردد. ژل تشکیل‌شده در آون در دمای۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ دقیقه نگه داشته می‌شود تا در مرحله پیرسازی شبکه سیلیکایی تقویت شود (مرحله ۴). در مرحله پنجم آب موجود در حفرات ژل با ایزوپروپیل الکل و نرمال هگزان تعویض‌می‌شود. این کار با قرار دادن ژل‌ها در هر کدام ازمحلول‌ها به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، انجام می‌شود. بعد از تعویض‌حلال و تخلیه حلال‌های اضافی، ژل‌های‌خیس،درمحلول‌اصلاح‌سطح که‌شامل‌تری‌متیل‌کلروسیلان وهگزان با نسبت حجمی۱ به ۴ می‌باشد، به مدت ۱۲ ساعت در دمای۵۰ درجه سانتی‌گراد، غوطه ور می‌شوند. در مرحله پایانی ژل‌های اصلاح سطح شده در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت و سپس به ترتیب در هر کدام از دماهای ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲ ساعت خشک می‌شوند. به منظور تولید سیلیکاآئروژل‌آب‌دوست‌عملیات‌کلسینه‌کردن،باحرارت‌دادن نمونه‌هادرکوره‌الکتریکی،دردمای۵۰۰درجه‌سانتیگراد، به مدت ۲ ساعت انجام می گردد.



شکل ۲- مراحل سنتز سیلیکا آئروژل آب‌دوست

۲-٤- تثبیت پکتیناز

برای تثبیت پکتیناز،۱۰ میلی لیتر محلول پکتیناز (۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتردربافرسدیم‌استات ۵۰ میلی مولار) با مقدار مشخص پایه‌سیلیکا آئروژل و در زمان معین، بر اساس طراحی آزمایش، مخلوط شد تا فرآیند جذب کامل شود. تثبیت در دمای محیط و سرعت هم زدن ۵۰۰ دور در دقیقه انجام شد. پس از آن، سوسپانسیون‌فیلترگردید تا پایه‌ها با پکتیناز تثبیت‌شده جدا شود. پایه‌های‌جداشده با بافر فسفات‌شسته‌شدند تا آنزیم جذب نشده حذف‌گردد وسپس درهوا خشک شدند. محلول‌های فیلتر شده و شستشو برای اندازه‌گیری پروتئین جمع‌آوری گردید. غلظت پروتئین به روش لوری تعیین شد (۲).

۲-۵- بازده تثبیت

درصد بازده تثبیت از معادله ۱ محاسبه می شود:

$$\text{بازده تثبیت} = \frac{\text{مقدار پروتئین تثبیت شده} - \text{مقدار پروتئین آزاد از تثبیت}}{\text{مقدار پروتئین اولیه قبل از تثبیت}} \times 100 \qquad (1)$$

۲-٦- طراحی آزمایش، بهینه‌یابی وآنالیز آماری

برای تثبیت آنزیم پکتیناز بر پایه‌های سیلیکا آئروژل، از طرح مرکب مرکزی[1] (CCD) سه فاکتوری، با شش نقطه محوری (α=۲)، هشت نقطه‌مکعب وشش نقطه‌مرکزی، مجموعا مشتمل بر۲۰ آزمایش استفاده شد. روش سطح پاسخ[2] (RSM) ، برای تخمین‌اثرات‌متغیرهای‌مستقل‌برمتغیرهای‌پاسخ‌یعنی بازده جذب آنزیم‌تثبیت‌شده‌استفاده‌شد. نرم‌افزار مورد استفاده برای طراحی آزمایش‌ها، دیزاین‌اکسپر نسخه ۱۳بود. درتثبیت‌آنزیم پکتیناز، اثر پارامترهای زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه وpH، بربازده جذب‌آنزیم‌تثبیت شده مورد مطالعه قرار گرفت. جهت‌یافتن محدوده بهینه، یک سری آزمایشات اولیه به منظور بررسی‌اثر پارامترهای تاثیرگذار بر شرایط تثبیت آنزیم انجام شد و با توجه به این‌آزمایشات اولیه، محدوده پارامترها و سطوح‌آن‌ها تعیین شد که مطابق جدول ۱ بود.

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح آنها در تثبیت آنزیم

فاکتور	متغیرها	واحد	سطح بالای محوری (+α)	سطح بالای فاکتوریل (+۱)	سطح مرکزی (۰)	سطح پایین فاکتوریل (−۱)	سطح پایین محوری (−α)
x_1	pH	-	٦	٥/٥	٥	٤/٥	٤
x_2	نسبت آنزیم به پایه	(w/w)	۰/۱۹٥	۰/۱٥	۰/۱۰٥	۰/۰٦	۰/۰۱٥
x_3	زمان تثبیت	دقیقه	۱٥۰	۱۲۰	۹۰	٦۰	۳۰

1- Central Composite Design
2- Response Surface Methodology

۲-۷-آماده‌سازی نمونه‌های تفاله انگور

نمونه‌های‌تفاله‌انگورقرمز(گونه‌انگورقرمز سردشت) از کارخانهٔ پاکدیس‌درشهرستان‌ارومیه‌به‌صورت‌تازه‌تهیه‌شدودر آزمایشگاه درداخل فریزر در دمای۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری تا در زمان مناسب‌آزمایش‌ها بر روی‌آن صورت پذیرد. درهنگام شروع آزمایش‌ها نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آون تحت خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۶-۴ ساعت، خشک شده و پس از خشک‌شدن، توسط خردکن برقی به دقت خرد شد و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش ۸۰ الک‌گردید. پس از آسیاب‌کردن مجدداً نمونه‌ها به داخل فریزر منتقل شدند تا ترکیبات فنلی موجود در نمونه‌ها دچار آسیب نشوند.

۲-۸- تیمار آنزیمی

برای رهایش ترکیبات فنلی از تفاله انگور، یک گرم از نمونه خردشده تفاله انگور با ۵۰ میلی گرم از آنزیم تثبیت شده در ۱۰ میلی‌لیتربافرسدیم‌استات۰/۱مولار(pH=۵) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت اختلاط همزن با سرعت ۱۰۰ دوربردقیقه انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی‌جمع‌آوری و فیلترگردید و مورد آنالیز قرار گرفت. به دلیل اختلاف چگالی تفاله انگور و پایه‌های حاوی آنزیم تثبیت شده، با دادن زمان لازم برای ته‌نشینی تفاله انگور، جداسازی آنزیم تثبیت‌شده جهت استفاده مجدد آن، امکان-پذیر شد(۸). برای تهیه نمونه شاهد تمام مراحل ذکر شده، بدون افزودن آنزیم تثبیت شده انجام شد.

۲-۹-تعیین مقدار ترکیبات فنلی

غلظت ترکیبات فنلی با استفاده از روش فولین- سیوکالتیو[1] اندازه‌گیری‌شد. به این ترتیب‌که مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول استخراجی را با ۰/۵ میلی لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو و ۱۰ میلی‌لیترکربنات‌سدیم۱مولارمخلوط کرده‌و بعد از یک ساعت، جذب‌نمونه‌دردستگاه‌در۷۵۰نانومترتوسط‌دستگاه‌اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نتایج برحسب میلی‌گرم اسیدگالیک موجود در۱۰۰میلی‌لیترمحلول استخراجی‌گزارش‌گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از رقت‌های۷۰۰ -۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک استاندارد استفاده شد(۸).

۲-۱۰-اندازه‌گیری درصدگیرندگی رادیکال آزاد

به منظوراندازه‌گیری درصدگیرندگی رادیکال آزاد نمونه‌ها با دستگاه‌اسپکتروفتومتر،محلول۲,۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل[2] (DPPH) با غلظت۰/۱میلی‌مولار را با حل‌کردن ۳/۹میلی‌گرم DPPH در۱۰۰میلی‌لیتر متانول تهیه شد. محلول برای تکمیل واکنش‌به‌مدت‌نیم‌ساعت درتاریکی نگه داشته شد. ۲ میلی‌لیتر ازنمونه با۲میلی‌لیتر از محلولDPPH مخلوط شد. این محلول به شدت‌تکان‌داده‌شده و درتاریکی به مدت نیم ساعت دیگر انکوبه‌شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتراندازه‌گیری‌شد(۲۷). درصدگیرندگی‌رادیکال از رابطه ۲ بدست می‌آید.

رابطه(۲) درصد گیرندگی رادیکال آزاد = (۱-A_S/A_C) × ۱۰۰

در این رابطه A_C و A_S به ترتیب جذب نمونه و جذب شاهد می‌باشد.

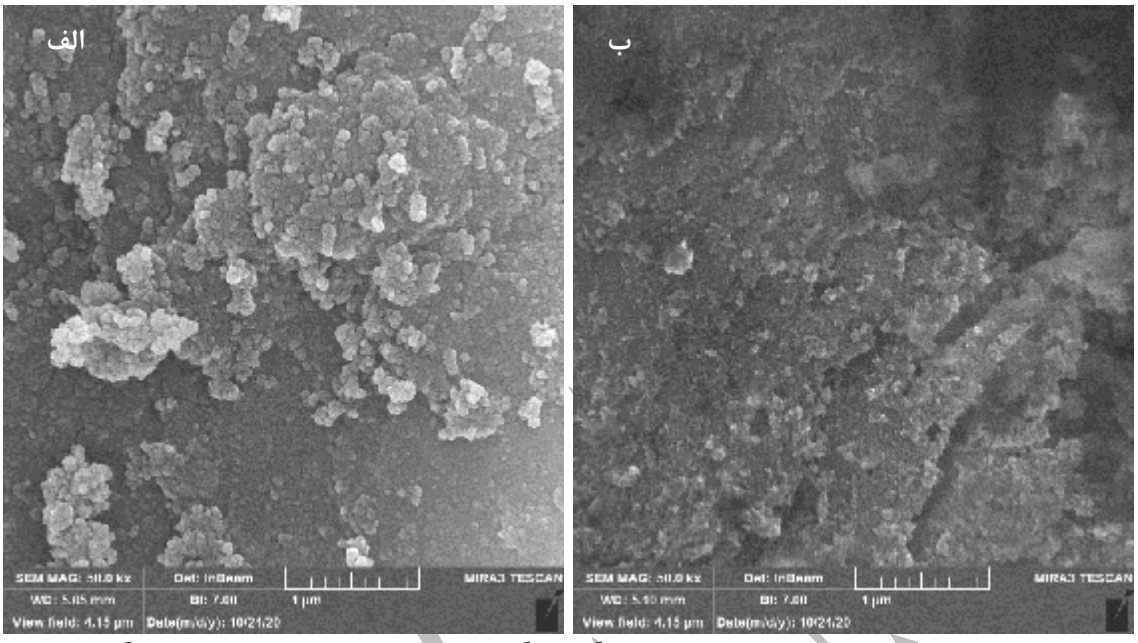
۳-نتایج و بحث

۳-۱- خواص فیزیکوشیمیایی پایه و پکتیناز تثبیت شده

شکل۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سیلیکا آئروژل آب‌دوست را قبل و بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز نشان می‌دهد. اشکال میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می‌دهد که اندازه منافذ و میزان تخلخل پایه به دلیل ایجاد برخی پیوندها، پس از جذب پکتیناز کاهش یافته است. از سوی دیگر، پس از تثبیت، یک لایه از آنزیم ممکن است سطح تکیه‌گاه‌ها را بپوشاند و تخلخل را کاهش دهد.

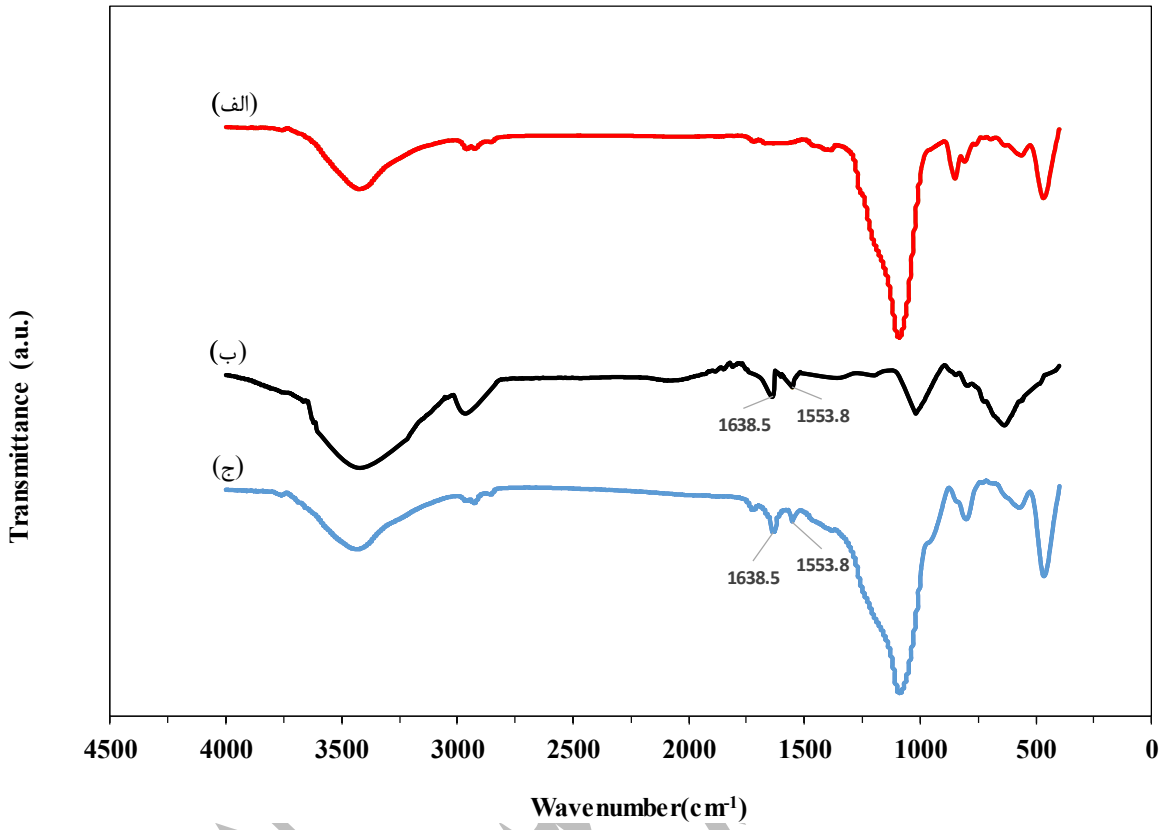
1- Folin–Ciocalteau

2 -2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سیلیکا آئروژل آب‌دوست (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز

آنالیزطیف‌سنجی‌زیرقرمزتبدیل فوریه برای تایید جذب پکتیناز برروی‌سیلیکاآئروژل‌آب‌دوست‌استفاده‌شد.شکل۴طیف‌سنجی زیرقرمزتبدیل‌فوریه‌پایه‌راقبل‌وبعدازتثبیت‌آنزیم‌نشان‌می‌دهد.در هردوطیف،یک پیک پهن‌درحدود $3450\ (cm)^{-1}$ وجود داشت که‌نشان‌دهنده‌وجودگروه‌های O-H وآب‌دوست بودن پایه بود. در مراحل سنتز سیلیکا آئروژل به روش خشک‌کردن در دما و فشارمحیط،پایه‌های‌سنتزشده‌خاصیت‌آب‌گریزی‌دارندکه‌محیط مناسبی‌برای تثبیت و عملکرد آنزیم پکتیناز نمی‌باشد. از این رو درمرحله نهایی‌سنتز پایه‌ها، آنها در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت‌دوساعت‌کلسینه‌شدند تا خاصیت آب‌دوستی پیدا کنند. وجودگروه‌های‌هیدروکسیل‌درآنالیزطیف‌سنجی‌زیرقرمزتبدیل فوریه،آب‌دوست‌شدن‌پایه‌هاراتاییدکرد. وجودگروه‌های عاملی هیدورکسیل بر روی پایه‌ها، اتصال سطحی‌آنزیم به پایه و بازده تثبیت و تمایل آنزیم به بیومولکول‌ها را افزایش می‌دهد (۲۸).همچنین‌نتایج‌آنالیزطیف‌سنجی‌زیر قرمز تبدیل فوریه تایید می‌کندکه بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز گروه‌های آمینی تشکیل شده است. آنزیم پکتیناز دو باند مشخصه در $1553/8\ (cm)^{-1}$ و $1638/5\ (cm)^{-1}$ دارد، که مربوط به گروه‌های آمین نوع اول و دوم است. این پیک‌ها در پایه بعد از تثبیت پکتیناز قابل مشاهده است. این امر دلالت بر جذب آنزیم پکتیناز در این پایه‌ها دارد. نتایج مشابهی درتعیین خواص فیزیکوشیمیایی پایه وآنزیم تثبیت‌شده در تحقیقات انجام گرفته در خصوص تثبیت آنزیم لیپاز بر روی پایه سیلیکا آئروژل مغناطیسی به‌دست آمده است (۲).



شکل٤- طیف‌سنجی‌زیرقرمز تبدیل فوریه پایه‌ها قبل و بعد از تثبیت پکتیناز: (الف) سیلیکا آئروژل آب‌دوست (ب) آنزیم پکتیناز (ج) سیلیکا آئروژل آب‌دوست- پکتیناز

۳-۲- برازش مدل سطح پاسخ

به منظور بهینه‌سازی شرایط تثبیت آنزیم، تاثیر سه فاکتور pH، نسبت آنزیم به پایه و زمان تثبیت در ۵ سطح با استفاده از روش سطح پاسخ بر بازده تثبیت مطالعه شد. با توجه به سه فاکتور اصلی در نظر گرفته شده، نرم افزار ۲۰ آزمایش طراحی کرد که نتایج آزمایشگاهی بدست آمده برای بازده تثبیت آنزیم به عنوان پاسخ، بر اساس طرح مرکب مرکزی در جدول ۲ نشان داده شده است. معادله ۳ برای برازش داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^{n} a_i x_i + \sum_{i=1}^{n} a_{ii} x_i^2 + \sum_{i,j=1}^{n} a_{ij} x_i x_j$$

ضرایب رگرسیون تخمینی برای مدل نهایی کاهش یافته و همچنین اهمیت رگرسیون‌ها در جدول۳ آمده است. باید توجه شود که مقادیر پایین شاخص p و نسبت‌های بالای F نشان‌دهنده اهمیت بیشتر یک عبارت بر متغیرهای پاسخ مورد مطالعه است. مدلهای کاهش‌یافته بعد از حذف عبارت‌های کم‌اهمیت بدست آمد. نتایج دلالت بر آن داشت که در مورد این پایه‌ها، ضریب تعیین (R^2) مدل برای پاسخ درصد تثبیت آنزیم ۰/۹۴۳۶ بود(جدول ۳). مقادیر بالای R^2 بدست آمده، مناسب بودن مدل پیشنهادی برای پیش‌بینی مقدار بازده تثبیت با استفاده از این روش را تایید کرد. علاوه براین بالابودن مقادیر F برای مدل پیشنهادی، مناسب بودن مدل را تایید کرد.

۳-۳-آنالیز سطوح پاسخ

همان طورکه در جدول ۲ نیز مشخص است، بازده تثبیت از ۵۸ تا ۷۹ درصد تغییر می‌کند. جدول۳ نشان می‌دهد که در بین عبارت‌های خطی، نسبت آنزیم به پایه و عبارت‌های درجه دوم تمام متغیرهای مستقل اثر معناداری ($p<0/05$) بر بازده تثبیت

آنزیم‌تثبیت‌شده‌دارند. نتایج‌جدول۳نشان‌می‌دهدکه عبارت‌های درجه‌دوم‌متغیرهای‌مستقل، به دلیل بالا بودن مقادیرF، بیشترین اهمیت و اثر را بر بازده آنزیم تثبیت شده دارند. همچنین نتایج به‌دست‌آمده‌برای‌ضرایب‌رگرسیون‌نشان می‌دهد که پارامترهای اصلی اثر مثبت بر بازده تثبیت دارند. این امر بدان معناست که در مقادیر $x_2<$۰/۱۰۵، با افزایش نسبت آنزیم به پایه، بازده تثبیت افزایش می‌یابد. نتایج عکس برای اثرات همه متغیرهای مستقل در سطوح بالایی برای بازده تثبیت آنزیم به دست آمد. همان طورکه از جدول ۳ مشخص است همه پارامترهای درجه دوم دارای ضرایب رگرسیون منفی هستند. از طرفی به غیر از اثر برهمکنش بین نسبت زمان تثبیت و pH، سایر برهمکنش‌ها، اثرات معناداری بر روی بازده تثبیت آنزیم ندارند. شکل ۵ اثر برهمکنش‌پارامترهارابربازده‌تثبیت،نشان می‌دهد. اثر درصدهای مختلفpH و زمان تثبیت بر فعالیت ویژه آنزیم تثبیت یافته (در نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱۰۵) در شکل ۵ به صورت نمودار کانتور دو بعدی و سطح پاسخ سه بعدی نشان داده شده است. حضور انحنا در این شکل تایید می‌کند که تغییر مقدار بازده تثبیت به صورت یک تابع غیرخطی وابسته به pH و زمان است. همان طور که از این شکل مشخص است در زمان ثابت با افزایش pH (تا محدوده pH معادل ۵)، بازده تثبیت به طورچشمگیری‌افزایش‌می‌یابد. این‌افزایش‌درزمان‌های میانی، قوی‌تراست. این‌نتایج بامقادیر نتایج آزمایشگاهی جدول ۲ در تطابق‌است. همچنین این نتیجه با نتایج بدست آمده در تحقیقی که آنزیم لیپاز را بر روی پایه‌های بر پایه سیلیکا تثبیت کرده‌اند در توافق‌است (۳). از شکل ۵ می‌توان نتیجه گرفت که افزایش زمان‌های بالاتر از۹۰ دقیقه منجر به کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. وقتی نسبت آنزیم به پایه افزایش پیدا می‌کند بازده تثبیت هم افزایش می‌یابد، ولی بعد از مقادیر میانی به دلیل اشباع‌شدن سایت‌های‌متخلخل و عدم جذب آنزیم بیشتر، بازده تثبیت کاهش پیدا می‌کند.

جدول ۲- آزمایش‌های طراحی‌شده از روش طرح مرکب مرکزی برای تثبیت آنزیم بر روی پایه‌های سیلیکا آئروژل آب‌دوست و نتایج آزمایشگاهی و پیش‌بینی‌شده

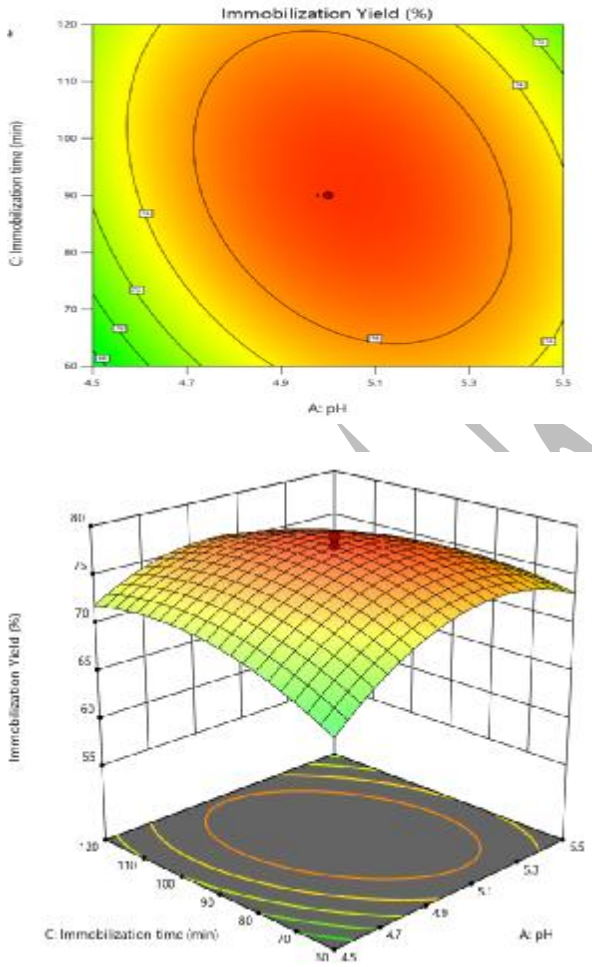
شماره آزمایش	pH	نسبت آنزیم به پایه (w/w)	زمان تثبیت (دقیقه)	بازده تثبیت (٪)	
				آزمایشگاهی	پیش بینی شده
۱	٤/٥	۰/۰٦	٦۰	٦٦	٦۷/۸۳
۲	٥/٥	۰/۰٦	٦۰	۷۰	۷۲/٤٦
۳	٤/٥	۰/۱٥	٦۰	٥۸	٦۰/۲۱
٤	٥/٥	۰/۱٥	٦۰	٦٦	٦۷/۳۳
٥	٤/٥	۰/۰٦	۱۲۰	٦۷	٦۹/۲۱
٦	٥/٥	۰/۰٦	۱۲۰	٦٥	٦٦/۳۳
۷	٤/٥	۰/۱٥	۱۲۰	٦۷	٦۸/۰۸
۸	٥/٥	۰/۱٥	۱۲۰	٦٦	٦۷/۷۱
۹	٤	۰/۱۰٥	۹۰	٥۹	٥۷/۱۰
۱۰	٦	۰/۱۰٥	۹۰	٦۳	٦۱/۳٥
۱۱	٥	۰/۰۱٥	۹۰	۷۰	٦۷/۸٥
۱۲	٥	۰/۱۹٥	۹۰	٦۳	٦۱/٦۰
۱۳	٥	۰/۱۰٥	۳۰	٦۹	٦٦/۸٥
۱٤	٥	۰/۱۰٥	۱٥۰	۷۰	٦۸/٦۰
۱٥	٥	۰/۱۰٥	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱٦	٥	۰/۱۰٥	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱
۱۷	٥	۰/۱۰٥	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۸	٥	۰/۱۰٥	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۹	٥	۰/۱۰٥	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱
۲۰	٥	۰/۱۰٥	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱

جدول ۳- احتمال اهمیت (شاخص P، نسبت F)، ضرایب رگرسیون، R^2 و R^2 تعدیل شده برای مدل تثبیت آنزیم بر روی پایه سیلیکا آئروژل آب‌دوست

پارامترها	متغیرها	بازده تثبیت (٪) (Y)		ضریب رگرسیون	
		نسبت F	شاخص P		
				a_0	-٤٦٨/٥٧
اصلی	x_1	٣/٦٢	٠/٠٨٦٣	a_1	١٩٧/٢٧٦
	x_2	٧/٨٣	٠/٠١٨٩	a_2	٥٩/٨٠٦
	x_3	٠/٦١٣٧	٠/٤٥١٦	a_3	١/٠٢٢
درجه دوم	x_1^2	١٠٩/٩	<٠/٠٠٠١	a_{11}	-١٨/٦٨٢
	x_2^2	٥٤/٧٢	<٠/٠٠٠١	a_{22}	-١٦٢٧/٣٨٥
	x_3^2	٣٢/٦٤	٠/٠٠٠٢	a_{33}	-٠/٠٠٢٨٣
برهمکنش	x_{12}	٠/٦٢٦٢	٠/٤٤٧١	a_{12}	٢٧/٧٧٨
	x_{13}	٥/٦٤	٠/٠٣٩	a_{13}	-٠/١٢٥
	x_{23}	٤/٢٣	٠/٠٦٦٧	a_{23}	١/٢٠٤
رگرسیون		١٨/٥٩	<٠/٠٠٠١		
R^2		٠/٩٤٣٦			
R^2 adjusted		٠/٨٩٢٩			

۳-٤- بهینه‌یابی و تایید شرایط تثبیت

زمانی مقدار نسبت آنزیم به پایه، زمان و pH می‌تواند بهینه شودکه مقدار بازده‌تثبیت‌آنزیم،حداکثرگردد. بهینه‌یابی عددی برای یافتن سطوح بهینه دقیق متغیرهای مورد مطالعه، استفاده شد. شرایط بهینه تثبیت به صورت مقابل بدست آمد: ۰/۱ نسبت آنزیم به پایه، ۸۹/۲ دقیقه زمان واکنش و pH معادل ۵. بیشترین مقدار بازده تثبیت پیش‌بینی شده توسط مدل در این شرایط۷۸/۱۴ بود. شرایط بهینه با استفاده از تست آزمایشگاهی (۰/۵ ±۷۷) تایید شد و در تطابق خوبی با نتایج پیش‌بینی شده بود که بر این امر دلالت داشت که مدل بدست آمده از روش سطح پاسخ به خوبی رابطه بین فاکتورها و پاسخ را در تثبیت آنزیم پکتیناز توصیف می‌کند.



شکل۵- نمودار کانتور دوبعدی و سطح پاسخ سه‌بعدی تغییرات میزان بازده تثبیت با pH و زمان تثبیت

۳-۵- میزان فنل کل و درصد گیرندگی رادیکال آزاد

به منظور استخراج ترکیبات فنلی میوه‌ها، روش‌های مختلفی بر پایه‌استخراج‌باحلال‌های آلی مضر و سمی وجود دارد. درحالی که استخراج با آنزیم یک روش استخراج سبز می باشد. این روش‌توسط محققین دیگر برای استخراج ترکیبات فنلی‌دانه انگور مورد استفاده قرار گرفته است (۲۶). به منظور بررسی عملکردآنزیم‌تثبیت‌شده‌برآزادسازی ترکبات فنلی، تفاله انگور توسط‌این بیوکاتالیست تیمار گردیده و میزان فنل کل و درصد گیرندگی‌رادیکال‌آزاد، بدون‌تیمار و بعد از تیمار آنزیم پکتیناز مقایسه‌گردید. جدول۴ میزان ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد تفاله انگور را بدون تیمار آنزیمی و بعدازتیمارآنزیمی‌نشان‌میدهد.آزادسازی‌ترکیبات‌فنلی،افزایش‌م عنی‌داری ($p<۰/۰۵$)رابعد از تیمار آنزیمی نشان داد. بعد از تیمارآنزیمی‌محلول‌حاوی‌تفاله انگور، میزان استخراج ترکیبات فنلی ٪۷۸/۷ و درصد گیرندگی رادیکال آزاد ٪۵۵/۷، نسبت به حالتی که تیمار آنزیمی انجام نگرفت، افزایش یافت.

جدول ٤- میزان ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد تفاله انگور قبل و بعد از تیمار آنزیمی

	بدون تیمار آنزیمی	بعد از تیمار با آنزیم تثبیت شده پکتیناز
میزان فنل کل (میلی گرم اسید گالیک بر ۱۰۰ میلی لیتر محلول)	۷۵/٦±٤/٦[a]	۱۳۵/۱±۵/۹[b]
درصد گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH)	٤۵/۸±۲/۵[a]	۷۱/۳±۳/۲[b]

*حروف متفاوت در هر ردیف بیانگر تفاوت معنادار بین مقادیر می‌باشد ($p< 0.05$)

٤- نتیجه‌گیری

استفاده ازآنزیم‌ها به عنوان بیوکاتالیست یکی از روش‌های مهم در صنایع غذایی، برای آماده‌سازی یا تیمار محصولات است. در هر حال بیشتر آنزیم‌های طبیعی انتخاب‌پذیری و واکنش‌پذیری بالا را فقط تحت شرایط نرمال نشان می‌دهند. تحت دماهای بالا و pH های در محدوده اسیدی و یا قلیایی، آنزیم‌ها به راحتی به دلیل تغییر ماهیت دادن غیر فعال می‌شوند. به منظور غلبه بر این مشکلات و امکان استفاده از آنزیم‌ها در فرایندهای پیوسته و تجاری به منظور استفاده مکرر و چند باره از آنزیم‌ها به علت قیمت بالای‌آن‌ها، از روش تثبیت آنزیم استفاده می‌شود. تثبیت آنزیم‌ها در یک حامل غیر قابل حل در آب، یک روش بیولوژیکی برای افزایش‌کاربردهای آنزیم در روش‌های پیوسته و استفاده‌های تجاری و در مقیاس بالا است. روش‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌ها وجود دارد. در بین روش‌های تثبیت آنزیم، جذب سطحی فیزیکی، به دلیل قیمت نسبتاً پایین، سادگی، سرعت و باقی‌ماندن فعالیت کاتالیستی بالا و قابلیت استفاده مجدد حامل‌های گران‌قیمت بعد از غیر فعال شدن آنزیم‌های تثبیت‌شده، پتانسیل اقتصادی بالاتری را در مقایسه با سایر روش‌ها دارد. در این تحقیق آنزیم پکتیناز که یکی از آنزیم‌های پرکاربرد در صنایع غذایی و خصوصا صنعت تولید آب‌میوه است بر روی پایه‌های متخلخل سیلیکا آئروژل به روش جذب سطحی تثبیت و تعیین خواص گردید. جهت‌یافتن‌شرایط‌بهینه‌برای‌تثبیت‌آنزیم‌پکتیناز،تاثیرپارامترهایی چون زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH در بازده تثبیت، با استفاده از روش‌سطح پاسخ مطالعه گردید. شرایط بهینه برای تثبیت، در pH معادل ۵، نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱ و زمان ۸۹/۲ دقیقه به دست آمد. بازده تثبیت در این شرایط ۷۸/۱ درصد بود. تفاله‌انگورمنبع ارزان قیمتی از ترکیبات فنلی است که می‌تواندمزایای‌اقتصادی مهمی را ایجاد کند. کاربرد آنزیم تثبیت شده در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور بررسی گردید. میزان استخراج‌ترکیبات‌فنلی‌ودرصدگیرندگی رادیکال آزاد بعد از تیمار با آنزیم به طور معناداری ($p<$۰۵/) بهبود پیدا کرد. نتایج نشان می‌دهد استفاده از آنزیم پکتیناز تثبیت شده بر روی سیلیکا آئروژل، جهت استخراج ترکیبات فنلی در صنعت آب میوه، می‌تواند امیدوارکننده باشد.

۵- منابع

1. Alagöz, D., Tükel S.S. and Yildirim, D., 2016. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, pp. 426–432.
2. Amirkhani, L., Moghaddas, J. and Jafarizadeh-Malmiri, H., 2019. Optimization of biodiesel production using immobilized *Candida rugosa* lipase on magnetic Fe_3O_4-silica aerogel, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(2), pp.193-201.
3. Amirkhani, L., Moghaddas, J. and Jafarizadeh-Malmiri, H., 2016. *Candida rugosa* lipase immobilization on

magnetic silica aerogel nanodispersion. *RSC Advances*, 6, pp.12676-12687.
4. Bangi, U.K.H., Rao, A.V. and Rao, A.P., 2008. A new route for preparation of sodium-silicate-based hydrophobic silica aerogels via ambient-pressure drying. S*cience and technology of advanced materials*, 9, p. 035006.
5. Brena, B., González-Pombo, P. and Batista-Viera, F., 2013. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 1051, pp.15-31.
6. Buisson, P., Hernandez, C., Pierre M. and Pierre A.C., 2001. Encapsulation of lipases in aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*,285(1-3), pp.295-302.
7. Buisson, P. and Pierre A.C., 2006. Immobilization in quartz fiber felt reinforced silica aerogel improves the activity of Candida rugosa lipase in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1-4), pp. 77-82.
8. Chamorro, S., Viveros, A., Alvarez, I., Vega, E. and Brenes, A., 2012. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry*, 133, pp. 308–314.
9. Dal Magro, L., de Moura, K.S., Backes, B.E., de Menezes, E.W., Benvenutti, E.V.and Nicolodi, S. *et al*., 2019. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. *Biotechnology Reports*, 24, e00373.
10. Delcheva, G., Pishtiyski, I., Dobrev, G. and Krusteva S., 2007. Immobilization of *Aspergillus niger* Pectinase on Polyacrylonitrile Copolymer Membrane. *Trends in Applied Sciences Research*, 2, pp. 419-425.
11. Dorcheh, A.S. and Abbasi M.H., 2008. Silica aerogel: synthesis, properties and characterization. *Journal of materials processing technology*, 199, pp. 10-26.
12. El Rassy, H., Maury, S., Buisson, P. and Pierre, A.C., 2004. Hydrophobic silica aerogel-lipase biocatalysts: Possible interactions between the enzyme and the gel. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 350(0), pp. 23-30.
13. Fernández, K., Vega, M. and Aspé, E., 2015. An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. *Food Chemistry*, 168, pp.7–13.
14. Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J. and Mahajan, R., 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6, p.47.
15. Gesser, H.D. and Goswami P.C. 1989. Aerogels and Related Porous Materials. *Chemical Review*, 89, pp. 765-788.
16. Ghandahari Yazdi, A.P., Barzegar, M. Sahari M.A. and Ahmadi Gavlighi, H., 2018. Optimization of the enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green hull. *Food Science & Nutrition,* 7, pp. 356-366.
17. Husing, N. and Schubert, U., 2005. *Aerogels*. Wiley.
18. Karout, A., Chopard, C. and Pierre, A.C., 2007. Immobilization of a lipoxygenase in silica gels for application in aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44(3-4), pp. 117-127.
19. Lee, C.-H., Lin, T.-S. and Mou, C.-Y., 2009. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*, 4, pp. 165-179.
20. Leventis, N. and Koebel, M. M., 2011. *Aerogels Handbook*. Springer.
21. Li, T., Wang, N. Li, S., Zhao, Q., Guo M. and Zhang, C., 2007. Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnology Letters*, 29(9), pp. 1413-1416.
22. Maury, S., Buisson, P., Perrard, A. and Pierre, A.C., 2005. Compared esterification kinetics of the lipase from Burkholderia cepacia either free or encapsulated in a silica aerogel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(5-6), pp. 193-203.

23. Mohammadi, M., Khakbaz Heshmati, M., Sarabandi, K., Fathi, M., Lim, L.-T. and Hamishehkar, H., 2019. Activated alginate-montmorillonite beads as an efficient carrier for pectinase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, pp.253-260.
24. Orcaire, O., Buisson, P. and Pierre, A.C., 2006. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(3-4), pp. 106-113.
25. Ramirez, H. L., Briones, A.I., Úbeda, J. and Arevalo, M., 2013. Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support. *Biotecnología Aplicada*, 30, pp.101-104.
26. Tambuk, P., Tomaskovic, D., Tomaz, I., Maslov, L., Stupic, D. and Kontic, J.K., 2016. Application of pectinases for recovery of grape seeds phenolics. *3 Biotech*, 6, p. 224.
27. Zahedi, M., Memar Maher, B., Anarjan, N. and Hamishehkar, H., 2021. Investigation the synergistic effects of licorice, garlic and fennel essential oils Microemulsions as natural antioxidant and antibacterial agents. *Food Hygiene*, 11, pp. 23-36.
28. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T. and Pinelo, M., 2018. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(3), p. 92.

(Original Research Paper)

Optimization of Pectinase Enzyme Immobilization on Silica Aerogel and Its Application in the Extraction of Phenolic Compounds of Grape Pomace

Ismaeil Faramarzi Agh Gonbad[1], Leila Amirkhani[2*], Seyyed Mahdi Hedayat Zadeh[3], Fahimeh Derakhshan Fard[2]

1-Ph.D Student of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
3-Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Ilkhchi Branch, Islamic Azad University, Ilkhchi, Iran.

Received:02/01/2022 Accepted:11/03/2022

Abstract

One of the commercial applications of the pectinase enzyme is pectinization and clarification of fruit juices and extraction of phenolic compounds from the fruits. Pectinase immobilization is one of the stabilization methods that makes it possible to separate the enzyme from the reaction and reuse it, thus reducing the cost of using the enzyme in the industry. In this study, the pectinase enzyme from *Aspergillus niger* was immobilized on hydrophilic silica aerogel by the adsorption method. Adsorption involves hydrogen, hydrophobic, and van der Waals interactions between solid carriers and adsorbed molecules, and due to their simplicity, high catalytic activity, and reusability of carriers after inactivation of immobilized enzymes, has higher economic potential, compared to other immobilization methods. Properties of silica aerogel containing pectinase were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM) analysis. Effective parameters in enzyme immobilization (immobilization time, enzyme to support ratio, and pH) were studied using the Response Surface Methodology (RSM) and the application of immobilized enzyme in the extraction of phenolic compounds from the grape pomace was investigated. Results obtained from properties analysis and measurement of immobilization efficiency showed effective immobilization of the enzyme on the silica aerogel supports. Optimal conditions for immobilization were obtained at pH 5, enzyme to support ratio of 0.1, and time of 89.2 minutes. The immobilization efficiency in these conditions was 78.1%. Experimental results and modeling were not significantly different, which showed the adequacy of the model. Extraction of phenolic compounds from the grape pomace by pectinase immobilized on silica aerogel supports, increased by 78.7% and free radical scavenging by 55.7%, compared to the case without enzymatic treatment.

Keywords: Enzyme Immobilization, Pectinase, Silica Aerogel, Grape Pomace, Phenolic Compounds.

[*]Corresponding Author: l-amirkhani@iau-ahar.ac.ir