

(مقاله پژوهشی)

بهینه‌سازی تثبیت آنزیم پکتیناز بر سیلیکا آئروژل و کاربرد آن در استخراج ترکیبات فنلی تفاله انگور

اسماعیل فرامرزی آق 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 ایلمچی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلمچی، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲

DOI: 10.30495/jfst.2022.1939051.1771

چکیده

یکی از کاربردهای 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 استفاده آنزیم در صنعت را کاهش می‌دهد. در این تحقیق آنزیم پکتیناز حاصل از اسپرژیلوس نایجر بر روی سیلیکا آئروژل آبدوست به روش جذب سطحی تثبیت گردید. جذب سطحی شامل برهمکنش‌های هیدروژنی، آبگریز و وان‌دروالس بین حامل جامد و مولکول‌های جذب شونده هستند و به دلیل سادگی، باقی ماندن فعالیت کاتالستی بالا و قابلیت استفاده 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 پکتیناز 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 تثبیت شده در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور بررسی گردید. نتایج به دست 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 ۷۸/۷٪ درصد گیرندگی رادیکال آزاد ۵۵/۷٪، نسبت به حالتی که تیمار آنزیمی انجام نگرفت، افزایش یافت.

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

*مسئول مکاتبات: l-amirkhani@iau-ahar.ac.ir

۱- مقدمه

پکتینازها (E.C.3.2.1.15)، کاربردهای مهمی در صنایع نساجی، کاغذسازی، دارویی، تصفیه پساب و همچنین شفاف سازی و کاهش کدورت آب میوه ها و در نتیجه بهبود کیفیت، بازده و قابلیت فیلتراسیون آن ها دارند. این آنزیم ها، ترکیبات پکتیکی را از طریق شکستن باند α - و β -گلیکوزیدی بین دو باقیمانده گالاکتورونیک، تجزیه می کنند (۲۳، ۲۱، ۱۰). همچنین تیمار میوه ها با پکتیناز به آزادسازی ترکیبات فنلی از پوست میوه کمک می کند. این ترکیبات، می توانند نقش مهمی به عنوان آنتی اکسیدان جهت حفظ سلامتی و پیشگیری از بیماری های قلبی و عروقی و انواع سرطان ها داشته باشند (۱۴). از آنجا که دیواره سلولی میوه ها، از سلولز، همی سلولز، پکتین، پروتئین و همچنین ترکیبات فنولی متصل به پلی ساکاریدها از طریق باندهای هیدروژنی و آب گریز، تشکیل شده است، آنزیم های مختلفی مثل سلولاز، پکتیناز، و همی سلولاز می توانند به عنوان عوامل هیدرولیزکننده برای تخریب دیواره سلولی و سهولت آزادسازی ترکیبات فنولی مورد استفاده قرار بگیرند. این آنزیم ها همچنین می توانند برای افزایش نفوذ دیواره سلولی که منجر به آزادسازی ترکیبات فنولی و افزایش بازده استخراج ترکیبات بیواکتیوی شود، مورد استفاده قرار گیرند. مکانیسم دیگر احتمالا اثر مستقیم آنزیم در شکستن پیوندهای استری و اتری بین فنول ها و دیواره سلولی پلیمری گیاه است. آنزیم ها در تحقیقات مختلفی برای استخراج ترکیبات فنولی از گیاهان و میوه ها مثل انگور، گوجه فرنگی و سیب ... مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۶). در تحقیقی که توسط فرناندز^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی تاثیر آنزیم های پکتیناز، سلولاز و تاناز بر روی استخراج ترکیبات فنولی از پوست و دانه انگور 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 این حال کاربرد این آنزیم ها در صنعت، به دلیل پایداری کم آنها در شرایط عملیاتی مختلف و نیز مشکلات مربوط به بازیابی و

استفاده مجددشان، محدود شده است. تثبیت آنزیم بر روی یک پایه، می تواند روش مناسبی برای تهیه بیوکاتالیست مناسب در کاربردهای خاص باشد (۹) روش های مختلفی مانند به دام اندازی در آلژینات، جذب سطحی روی پایه های رزینی، آلومینا و نانوذرات سیلیکایی و پیوندهای کووالانسی با پایه هایی چون شیشه های متخلخل و نایلون برای تثبیت آنزیم پکتیناز مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال یافتن پایه ها و روش های جدید برای تثبیت آنزیم ها، اهمیت زیادی در تکنولوژی آنزیم دارد (۵، ۲۵). پایه مناسب برای تثبیت آنزیم باید دارای تخلخل، مساحت سطح و ظرفیت بالا بوده و علاوه بر پایداری مکانیکی و شیمیایی مناسب، طول عمر زیادی نیز داشته باشد (۱۹، ۱). آئروژل ها جزء پیشرفته ترین مواد در زمینه علم مواد بوده و به دلیل خواص منحصر به فردشان، کاربردهای تکنولوژیکی متعددی در صنایع مختلف دارند. آئروژل های سیلیکایی از شبکه ای با پیوندهای عرضی ذرات سیلیکاساخته شده اند (۲، ۴). این ساختارها موادی با خواص غیر عادی مثل مساحت سطح ویژه بالا (۵۰۰ تا ۱۲۰۰ مترمربع بر گرم)، تخلخل بالا (۸۰ تا ۹۹/۸ درصد)، چگالی پایین (تا ۰/۰۰۵ گرم بر سانتی متر مکعب)، هدایت حرارتی پایین (۰/۰۰۲ وات بر متر بر کلین)، سرعت صوت پایین (۱۰۰ متر بر ثانیه)، شفافیت فوق العاده زیاد (تقریباً ۹۰٪) در ناحیه مرئی، ثابت دی الکتریک بسیار پایین (۱/۰ تا ۲/۰ k) و ضریب شکست پایین (تقریباً ۱/۰۵) هستند. سنتز آئروژل های سیلیکایی از سال ۱۹۳۰ که اولین بار توسط آقای کیسلرانجام شد تا کنون به تفضیل مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (۱۱، ۱۵، ۱۷). تولید تجاری آئروژل های سیلیکایی و بهره برداری گسترده از آنها در کاربردهای مختلف به دلیل دو مشکل عمده استفاده از پیش ماده های گران قیمت و خطرناک آلکوکسیدهای سیلیکونی و نیز روش خشک کردن فوق بحرانی محدود می شود. خشک کردن فوق بحرانی به دلیل استفاده از اتوکلاوهای گران قیمت، خطرناک بوده و مصرف انرژی بالایی داشته و امکان تولید این مواد را به صورت پیوسته محدود می کند. استفاده از ماده اولیه ارزان قیمت و بی خطر سدیم سیلیکات و روش خشک کردن در دما و فشار محیط تحت

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 انجام شده است. در این تحقیقات، آنزیم لیپاز با منابع مختلف بر روی آئروژل‌های سیلیکایی و کامپوزیت‌های آن‌ها به روش کپسوله کردن تثبیت شده 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^۱ در حلال‌های مختلف، نوع فرایند خشک کردن و نیز پارامترهای تاثیرگذار در واکنش‌های هیدرولیز، استریفیکاسیون و ترانس استریفیکاسیون^۲ بر فعالیت آنزیم لیپاز بررسی شده است (۶، ۷، ۲۴). در کارهای تحقیقاتی انجام شده ثابت شده است که نه مرحله ژلاسیون و نه مرحله خشک کردن فوق بحرانی تاثیری در آنزیم کپسوله شده در سیلیکا آئروژل 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). در تحقیقی 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). در این تحقیق بعد از سنتز آئروژل‌های سیلیکایی آبدوست 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 به کار رفته در سنتز سیلیکا آئروژل آبدوست، شامل سدیم سیلیکات با چگالی ۱/۳۵ گرم بر سانتیمتر مکعب، هیدروکسید آمونیوم، هگزان نرمال، ایزوپروپیل الکل، تری متیل کلروسیلان^۳ (TMCS) و رزین‌های تبادل یونی بودند که همه این مواد از شرکت مرک تهیه شدند. در فرایند تثبیت آنزیم نیز پکتیناز آسپرژیلوس نایجرو پلی گالاکتورونیک اسید از شرکت سیگما آلدردیج و ۳ و ۵ دی‌نیترو سالیسیک اسید و سدیم استات از شرکت مرک خریداری گردید.

۲-۲- تجهیزات و آزمون‌ها

آئروژل‌های سیلیکایی در ظروف تفلونی سنتز شدند. این ظروف درب‌دار غیر قابل نفوذ به هوا بوده و از خروج حلال‌ها و عوامل اصلاح‌کننده سطح جلوگیری کرده و برای انجام مراحل مختلف سنتز به کار رفتند (شکل ۱). در کلیه مراحل سنتز، درب این ظروف به منظور جلوگیری از خروج بخارات و خشک شدن سطح ژل، توسط پیچ‌های تعبیه شده در قسمت بالای آن کاملاً بسته شد. به منظور تامین درجه حرارت و واکنش‌ها در دمای مشخص و نیز به منظور خشک کردن ژل‌ها بعد از انجام مراحل واکنش از آون استفاده گردید. از کوره الکتریکی (شرکت شیماز، ساخت کشور ایران) به منظور کلسینه کردن 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 رقیق کردن و انجام تبادل یونی و افزودن یکنواخت کاتالیست به مخلوط واکنش، 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 ساخت کشور ژاپن استفاده شد. آنالیز میکروسکوپی الکترونی روبشی با وضوح بالا با استفاده از دستگاه FESEM (Mira 3-XMU, Tescan USA Inc.)

محدوده طول موج ۴۰۰-۴۰۰۰ nm مطالعه شد. برای خشک کردن نمونه های تفاله انگور، آون تحت خلا (Lab Tech، ساخت کشور کره جنوبی) استفاده شد.

انجام گرفت. گروه های عاملی موجود در نانوکامپوزیت ها با استفاده از آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه (FTIR, PU 9800, from Philips, Netherlands) در



شکل ۱- ظروف تفلونی سنتز سیلیکا آئروژل

سانتی گراد به مدت ۱۸۰ دقیقه نگه داشته می شود تا در مرحله پیرسازی شبکه سیلیکایی تقویت شود (مرحله ۴). در مرحله پنجم آب موجود در حفرات ژل با ایزوپروپیل الکل و نرمال هگزان تعویض می شود. این کار با قرار دادن ژل ها در هر کدام از محلول ها به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، انجام می شود. بعد از تعویض حلال و تخلیه حلال های اضافی، ژل های خیس، در محلول اصلاح سطح که شامل تری متیل کلروسیلان و هگزان با نسبت حجمی ۱ به ۴ می باشد، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، غوطه ور می شوند. در مرحله پایانی ژل های اصلاح سطح شده در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت و سپس به ترتیب در هر کدام از دماهای ۵۰، ۸۰ و ۱۲۰ درجه سانتی گراد، به مدت ۲ ساعت خشک می شوند. به منظور تولید سیلیکا آئروژل آب دوست عملیات کلسینه کردن، با حرارت دادن نمونه ها در کوره الکتریکی، در دمای ۵۰۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۲ ساعت انجام می گردد.

۲-۳- روش سنتز سیلیکا آئروژل آب دوست

سنتز سیلیکا آئروژل خالص آب دوست با استفاده از ماده اولیه سدیم سیلیکات و خشک کردن 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 می شود تا به چگالی ۱/۰۷ برسد. در مرحله دوم به منظور حذف یون های Na^+ ، از رزین های تبادل یونی با نسبت حجمی مساوی به محلول سدیم سیلیکات رقیق شده اضافه گردید. محلول حاصل و رزین های تبادل یونی توسط همزن مغناطیسی به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه مخلوط شدند. بعد از تشکیل سیلیسیک اسید با pH در حدود ۲، محلول هیدروکسید آمونیوم (۱/۰ مولار)، به محلول اضافه می شود تا pH آن به منظور انجام ژلاتینه شدن به ۴ افزایش پیدا کند. سل سیلیکایی بدست آمده سریعاً به ظروف تفلونی انتقال پیدا کرده و در مرحله سوم هیدروژل تشکیل می گردد. ژل تشکیل شده در آون در دمای ۵۰ درجه

۲-۶- طراحی آزمایش، بهینه یابی و آنالیز آماری

برای تثبیت آنزیم پکتیناز بر پایه های سیلیکا آتروژل، از طرح مرکب مرکزی^۱ (CCD) سه فاکتوری، با شش نقطه محوری ($\alpha=2$)، هشت نقطه مکعب و شش نقطه مرکزی، مجموعاً مشتمل بر ۲۰ آزمایش استفاده شد. روش سطح پاسخ^۲ (RSM)، برای تخمین اثرات متغیرهای مستقل بر متغیرهای پاسخ یعنی بازده جذب آنزیم تثبیت شده استفاده شد. نرم افزار مورد استفاده برای طراحی

آزمایش ها، دیزاین اکسپر نسخه ۱۳ بود. در تثبیت آنزیم پکتیناز، اثر پارامترهای زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH، بر بازده جذب آنزیم تثبیت شده مورد مطالعه قرار گرفت. جهت یافتن محدوده بهینه، یک سری آزمایشات اولیه به منظور بررسی اثر پارامترهای تاثیرگذار بر شرایط تثبیت آنزیم انجام شد و با توجه به این آزمایشات اولیه، محدوده پارامترها و سطوح آنها 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 (+1)	سطح مرکزی (0)	سطح پایین فاکتوریل (-1)	سطح پایین محوری (- α)
X ₁	pH	-	6	5/5	5	4/5	4
X ₂	نسبت آنزیم به پایه	(w/w)	0/195	0/15	0/105	0/6	0/15
X ₃	زمان تثبیت	دقیقه	150	120	90	60	30

۲-۷- آماده‌سازی نمونه‌های تفاله انگور

نمونه‌های تفاله انگور قرمز (گونه انگور قرمز سردشت) از کارخانه پاکدیس در شهرستان ارومیه به صورت تازه تهیه شد و در آزمایشگاه در داخل فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری تا در زمان مناسب آزمایش‌ها بر روی آن صورت پذیرد. در هنگام 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 خشک شدن، توسط خردکن برقی به دقت خرد شد و برای یکنواخت کردن اندازه ذرات، با الک مش ۸۰ الک گردید. پس از آسیاب کردن 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 خرد شده تفاله انگور با ۵۰ میلی‌گرم از آنزیم تثبیت شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سدیم استات ۰/۱ مولار (pH=۵) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت اختلاط همزن با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی جمع‌آوری و فیلتر گردید 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 تثبیت شده 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^۱ اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استخراجی را با ۰/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیوکالتیو و ۱۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۱ مولار مخلوط کرده و بعد از یک ساعت،

جذب نمونه در دستگاه در ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک موجود در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استخراجی گزارش گردید. جهت رسم منحنی استاندارد از رقت‌های ۷۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید گالیک استاندارد استفاده شد (۸).

۲-۱۰- اندازه‌گیری درصد گیرندگی رادیکال آزاد

به منظور اندازه‌گیری درصد گیرندگی رادیکال آزاد نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر، محلول ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل^۲ (DPPH) با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار را با حل کردن ۳/۹ میلی‌گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول تهیه شد. محلول برای تکمیل واکنش به مدت نیم ساعت در تاریکی نگه داشته شد. ۲ میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط شد. این محلول به شدت تکان داده شده و در تاریکی به مدت نیم ساعت دیگر انکوبه شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (۲۷). درصد گیرندگی رادیکال از رابطه ۲ بدست می‌آید.

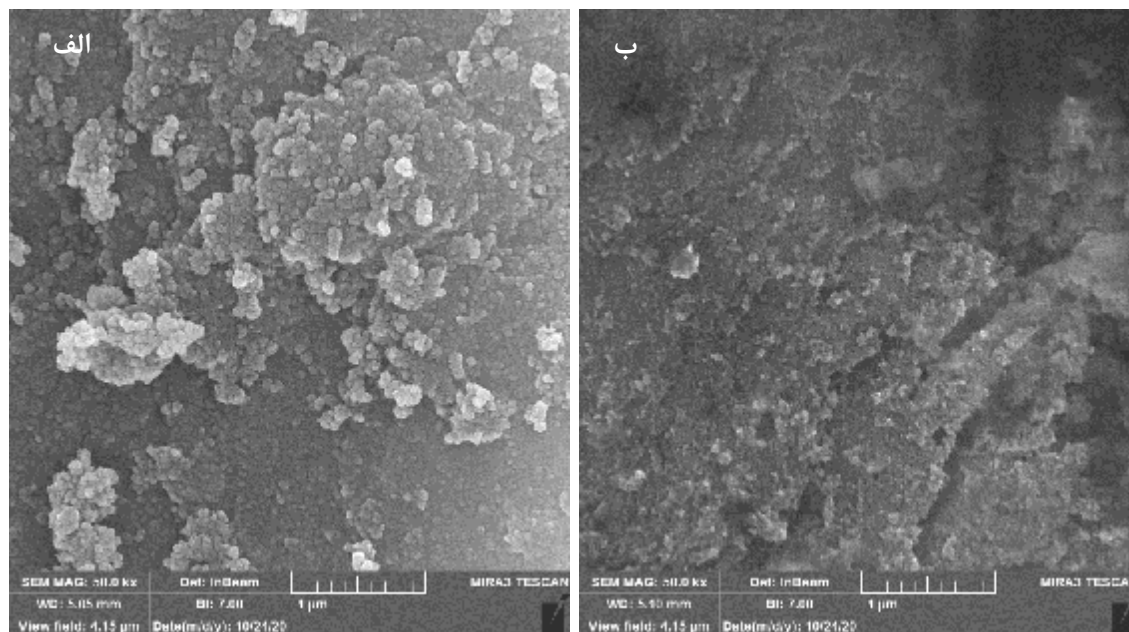
$$\text{رابطه (۲)} \quad 100 \times (1 - A_s/A_c) = \text{درصد گیرندگی رادیکال آزاد}$$

در این رابطه A_s و A_c به ترتیب جذب نمونه و جذب شاهد می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- خواص فیزیکوشیمیایی پایه و پکتیناز تثبیت شده

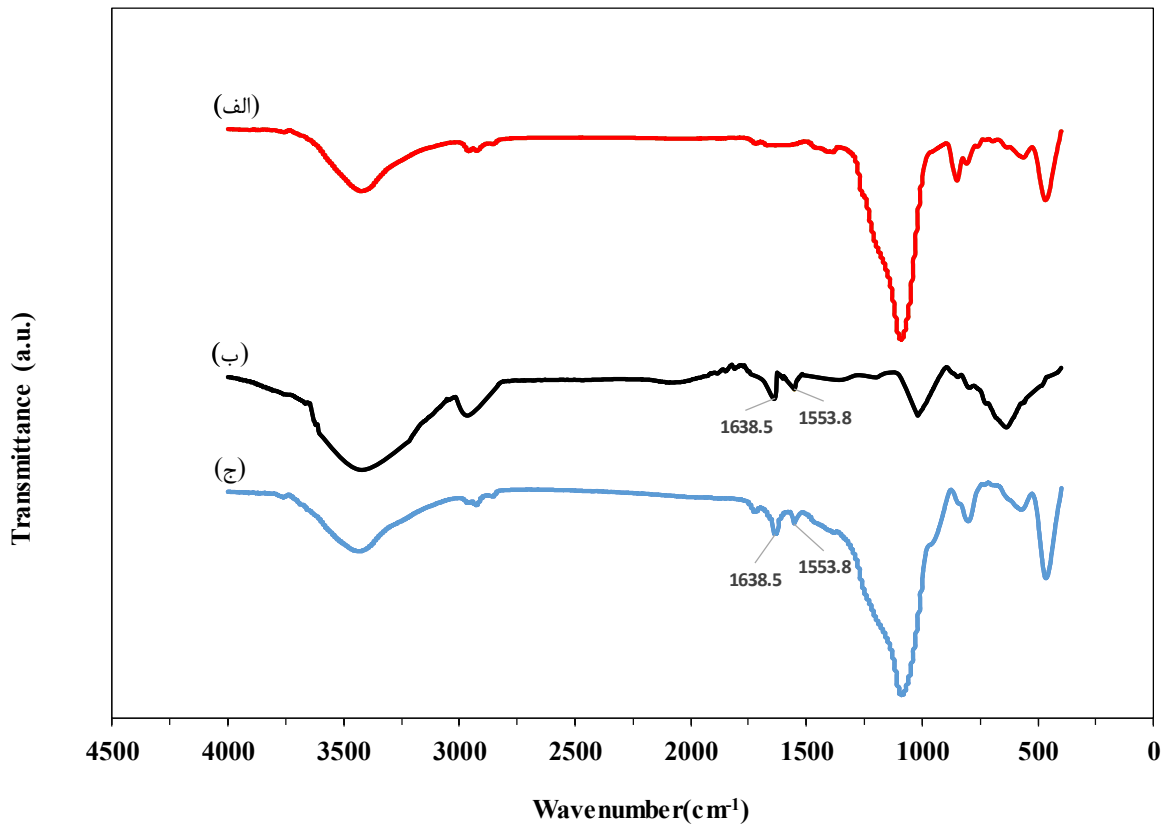
شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سیلیکا آئروژل آب‌دوست را قبل و بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز نشان می‌دهد. اشکال میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان می‌دهد که اندازه منافذ و میزان تخلخل پایه به دلیل ایجاد برخی پیوندها، پس از جذب پکتیناز کاهش یافته است. از سوی دیگر، پس از تثبیت، یک لایه از آنزیم ممکن است سطح تکیه‌گاه‌ها را بپوشاند و تخلخل را کاهش دهد.



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

هیدروکسیل بر روی پایه‌ها-، اتصال سطحی آنزیم به پایه و بازده تثبیت و تمایل آنزیم به بیومولکول‌ها را افزایش می‌دهد (۲۸). همچنین نتایج آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه تایید می‌کند که بعد از تثبیت آنزیم پکتیناز گروه‌های آمینی تشکیل شده است. آنزیم پکتیناز دو باند مشخصه در $(\text{cm})^{-1}$ $1553/8$ و $(\text{cm})^{-1}$ $1638/5$ 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 در تعیین خواص فیزیکوشیمیایی پایه و آنزیم تثبیت شده در تحقیقات انجام گرفته در خصوص تثبیت آنزیم لپاز بر روی پایه سیلیکا آئروژل مغناطیسی به دست آمده است (۲).

آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه برای تایید جذب پکتیناز بر روی سیلیکا آئروژل آب دوست استفاده شد. شکل ۴ طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه پایه را قبل و بعد از تثبیت آنزیم نشان می‌دهد. در هر دو طیف، یک پیک پهن در حدود $(\text{cm})^{-1}$ 3450 وجود داشت که نشان دهنده وجود گروه‌های O-H و آب دوست بودن پایه بود. در مراحل سنتز سیلیکا آئروژل به روش خشک کردن در دما و فشار محیط، پایه‌های سنتز شده خاصیت آب‌گریزی دارند که محیط مناسبی برای تثبیت و عملکرد آنزیم پکتیناز نمی‌باشد. از این رو در مرحله نهایی سنتز پایه‌ها، آنها در دمای 500 درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت کلسینه شدند تا خاصیت آب دوستی پیدا کنند. وجود گروه‌های هیدروکسیل در آنالیز طیف سنجی زیر قرمز تبدیل فوریه، آب دوست شدن پایه‌ها را تایید کرد. وجود گروه‌های عاملی



شکل ۴- طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه پایه‌ها قبل و بعد از تثبیت پکتیناز: (الف) سیلیکا آئروژل آب‌دوست (ب) آنزیم پکتیناز (ج) سیلیکا آئروژل آب‌دوست- پکتیناز

بیشتریک عبارت بر متغیرهای پاسخ مورد مطالعه است. مدل‌های کاهش یافته 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 بر این با بودن مقادیر F برای مدل پیشنهادی، مناسب بودن مدل را تایید کرد.

۳-۳- آنالیز سطوح پاسخ

همان‌طور که در جدول ۲ نیز مشخص است، بازده تثبیت از ۵۸ تا ۷۹ درصد تغییر می‌کند. جدول ۳ 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

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 مدل‌نهایی کاهش یافته و همچنین اهمیت رگرسیون‌ها در جدول ۳ آمده است. باید توجه شود که مقادیر پایین شاخص p و نسبت‌های بالای F نشان‌دهنده اهمیت

نمودار کانتور دو بعدی و سطح پاسخ سه بعدی نشان داده شده است. حضور انحنا در این شکل تایید می کند 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 طور چشمگیری افزایش می یابد. این افزایش در زمان های میانی، قوی تر است. این نتایج با مقادیر نتایج آزمایشگاهی جدول ۲ در تطابق است. همچنین این نتیجه با نتایج بدست آمده در تحقیقی که آنزیم لیپاز را بر روی پایه های بر پایه سیلیکا تثبیت کرده اند در توافق است (۳). از شکل ۵ می توان نتیجه گرفت که افزایش زمان های بالاتر از ۹۰ دقیقه منجر به کاهش فعالیت آنزیم می شود. وقتی نسبت آنزیم به پایه افزایش پیدا می کند بازده تثبیت هم افزایش می یابد، ولی بعد از مقادیر میانی به دلیل اشباع شدن سایت های متخلخل و عدم جذب آنزیم بیشتر، بازده تثبیت کاهش پیدا می کند.

آنزیم تثبیت شده دارند. نتایج جدول ۳ نشان می دهد که عبارت های درجه دوم متغیرهای مستقل، به دلیل بالا بودن مقادیر F، بیشترین اهمیت و اثر را بر بازده آنزیم تثبیت شده دارند. همچنین نتایج به دست آمده برای ضرایب رگرسیون نشان می دهد که پارامترهای اصلی اثر مثبت بر بازده تثبیت دارند. این امر بدان معناست که در مقادیر $x_2 < 0.105$ ، با افزایش نسبت آنزیم به پایه، بازده تثبیت افزایش می یابد. نتایج عکس برای اثرات همه متغیرهای مستقل در سطوح بالای برای بازده تثبیت آنزیم به دست آمد. همان طور که 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 برهمکنش ها، اثرات معناداری بر روی بازده تثبیت آنزیم ندارند. شکل ۵ اثر برهمکنش پارامترها بر بازده تثبیت، نشان می دهد. اثر درصد های مختلف pH و زمان تثبیت بر فعالیت ویژه آنزیم تثبیت یافته (در نسبت آنزیم به پایه معادل ۰/۱۰۵) در شکل ۵ به صورت

جدول ۲- آزمایش های طراحی شده از روش طرح مرکب مرکزی برای تثبیت آنزیم بر روی پایه های سیلیکا آروژل آب دوست و نتایج آزمایشگاهی و

پیش بینی شده

شماره آزمایش	pH	نسبت آنزیم به پایه (w/w)	زمان تثبیت (دقیقه)	بازده تثبیت (%)	پیش بینی شده
۱	۴/۵	۰/۰۶	۶۰	۶۶	۶۷/۸۳
۲	۵/۵	۰/۰۶	۶۰	۷۰	۷۲/۴۶
۳	۴/۵	۰/۱۵	۶۰	۵۸	۶۰/۲۱
۴	۵/۵	۰/۱۵	۶۰	۶۶	۶۷/۳۳
۵	۴/۵	۰/۰۶	۱۲۰	۶۷	۶۹/۲۱
۶	۵/۵	۰/۰۶	۱۲۰	۶۵	۶۶/۳۳
۷	۴/۵	۰/۱۵	۱۲۰	۶۷	۶۸/۰۸
۸	۵/۵	۰/۱۵	۱۲۰	۶۶	۶۷/۷۱
۹	۴	۰/۱۰۵	۹۰	۵۹	۵۷/۱۰
۱۰	۶	۰/۱۰۵	۹۰	۶۳	۶۱/۳۵
۱۱	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۰	۶۷/۸۵
۱۲	۵	۰/۱۹۵	۹۰	۶۳	۶۱/۶۰
۱۳	۵	۰/۱۰۵	۳۰	۶۹	۶۶/۸۵
۱۴	۵	۰/۱۰۵	۱۵۰	۷۰	۶۸/۶۰
۱۵	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۶	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱
۱۷	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۸	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۸	۷۷/۹۱
۱۹	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱
۲۰	۵	۰/۱۰۵	۹۰	۷۹	۷۷/۹۱

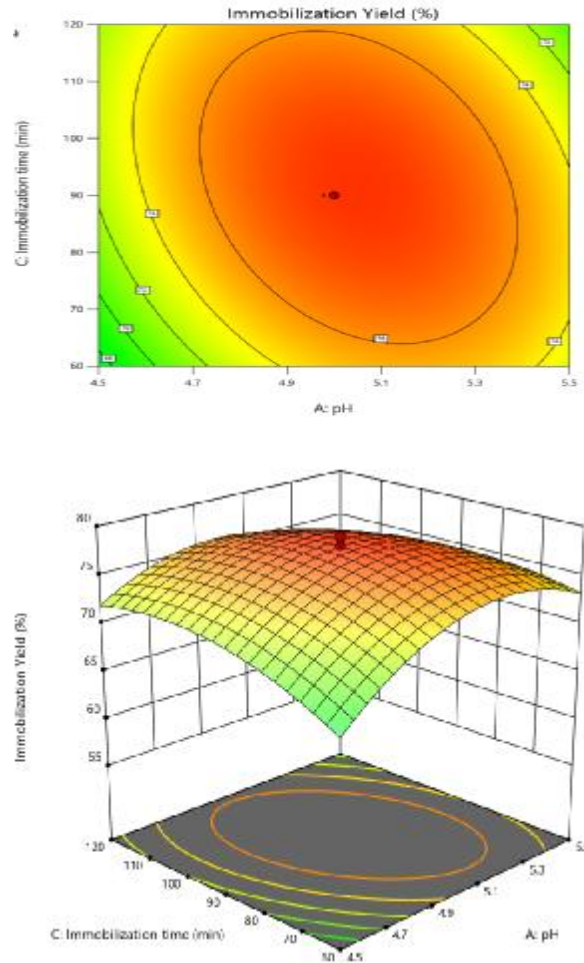
جدول ۳- احتمال اهمیت (شاخص P، نسبت F)، ضرایب رگرسیون، R^2 و R^2 تعدیل شده برای مدل تثبیت آنزیم بر روی پایه سیلیکا آئروژل آب‌دوست

ضریب رگرسیون	بازده تثبیت (%) (Y)	متغیرها		پارامترها
		نسبت F	شاخص P	
-۴۶۸/۵۷	a_0			
۱۹۷/۲۷۶	a_1	۰/۰۸۶۳	۳/۶۲	X_1 اصلی
۵۹/۸۰۶	a_2	۰/۰۱۸۹	۷/۸۳	X_2
۱/۰۲۲	a_3	۰/۴۵۱۶	۰/۶۱۳۷	X_3
-۱۸/۶۸۲	a_{11}	<۰/۰۰۰۱	۱۰۹/۹	X_1^2 درجه دوم
-۱۶۲۷/۳۸۵	a_{22}	<۰/۰۰۰۱	۵۴/۷۲	X_2^2
-۰/۰۰۲۸۳	a_{33}	۰/۰۰۰۲	۳۲/۶۴	X_3^2
۲۷/۷۷۸	a_{12}	۰/۴۴۷۱	۰/۶۲۶۲	X_{12} برهمکنش
-۰/۱۲۵	a_{13}	۰/۰۳۹	۵/۶۴	X_{13}
۱/۲۰۴	a_{23}	۰/۰۶۶۷	۴/۲۳	X_{23}
		<۰/۰۰۰۱	۱۸/۵۹	رگرسیون
		۰/۹۴۳۶		R^2
		۰/۸۹۲۹		R^2 adjusted

۳-۴- بهینه‌یابی و تایید شرایط تثبیت

زمانی مقدار نسبت آنزیم به پایه، زمان و pH می‌تواند بهینه شود که مقدار بازده تثبیت آنزیم، حداکثر گردد. 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 شرایط ۷۸/۱۴ بود. شرایط بهینه با استفاده از تست آزمایشگاهی ($۷۷ \pm ۰/۵$) 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.



شکل ۵- نمودار کانتور دوبعدی و سطح پاسخ سه بعدی تغییرات میزان بازده تثبیت با pH و زمان تثبیت

گیرندگی رادیکال آزاد، بدون تیمار و بعد از تیمار آنزیم پکتیناز مقایسه گردید. جدول ۴ میزان ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد تفاله انگور را بدون تیمار آنزیمی و بعد از تیمار آنزیمی نشان می دهد. آزادسازی ترکیبات فنلی، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) را بعد از تیمار آنزیمی نشان داد. بعد از تیمار آنزیمی محلول حاوی تفاله انگور، میزان استخراج ترکیبات فنلی ۷۸٪ و درصد گیرندگی رادیکال آزاد ۵۵٪ نسبت به حالتی که تیمار آنزیمی انجام نگرفت، افزایش یافت.

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

به منظور استخراج ترکیبات فنلی میوه ها، روش های مختلفی بر پایه استخراج با حلال های آلی مضر و سمی وجود دارد. در حالی که استخراج با آنزیم یک روش استخراج سبز می باشد. این روش توسط محققین دیگر برای استخراج ترکیبات فنلی دانه انگور مورد استفاده قرار گرفته است (۲۶). به منظور بررسی عملکرد آنزیم تثبیت شده بر آزادسازی ترکیبات فنلی، تفاله انگور توسط این بیوکاتالیست تیمار گردیده و میزان فنل کل و درصد

جدول ۴- 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)	۷۵/۶±۴/۶ ^a
درصد گیرندگی رادیکال آزاد (DPPH)	۱۳۵/۱±۵/۹ ^b
	۷۱/۳±۳/۲ ^b
	۴۵/۸±۲/۵ ^a

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

۴- نتیجه‌گیری

با استفاده از روش سطح 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. تفاله‌انگور منبع ارزان قیمتی از ترکیبات فنلی است که می‌تواند مزایای اقتصادی مهمی را ایجاد کند. کاربرد آنزیم تثبیت شده در استخراج ترکیبات فنلی از تفاله انگور بررسی گردید. میزان استخراج ترکیبات فنلی و درصد گیرندگی رادیکال آزاد بعد از تیمار با آنزیم به طور معناداری ($p < 0.05$) 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.

استفاده از آنزیم‌ها 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 بالای آن‌ها، از روش تثبیت آنزیم استفاده می‌شود. تثبیت آنزیم‌ها در یک حامل غیر قابل حل در آب، یک روش بیولوژیکی برای افزایش کاربردهای 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 باقی ماندن 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 خصوصاً صنعت تولید آب‌میوه است بر روی پایه‌های متخلخل سیلیکا آئروژل به روش جذب سطحی تثبیت و تعیین خواص گردید. جهت یافتن شرایط بهینه برای تثبیت آنزیم پکتیناز، تاثیر پارامترهایی چون زمان تثبیت، نسبت آنزیم به پایه و pH در بازده تثبیت،

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 Fe₃O₄-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

- 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.
 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. *Science 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., Benvenuti, 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

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.
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.

(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 Gonbad¹, Leila Amirkhani^{2*}, Seyyed Mahdi Hedayat Zadeh³, Fahimeh Derakhshan Fard²

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