فصلنامه‌ی علمی و پژوهشی شریف
فروردین‌ماه‌ و اردیبهشت ۱۳۸۷، شماره‌ی چهل و یکم، ص. ۲۲-۲۲

بررسی شرایط بهینه غنی‌سازی فروکتوز از ضایعات خرما به‌روش آنزیمی

اختر‌الملوک کاظمی‌ویسری (استادیار)
جمشید کشفی (کارشناس ارشد)
مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی، دانشگاه صنعتی شریف

شربت‌های قندی حاوی گلوکز و فروکتوز با محدوده‌ی غلظتی ۶۰ تا ۸۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر توسط آنزیم گلوکز ایزومراز در شرایط بهینه‌ی درجه حرارت، pH و زمان به شربت‌های قندی غنی‌شده از فروکتوز تبدیل می‌شوند. عملکرد آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت‌شده روی قند مایع حاصل از شیره‌ی خرما، تحت شرایط خاصی در سیستم ناپیوسته بررسی و بهینه شد. از آب‌کافت (هیدرولیز) ساکاروز موجود در شیره‌ی خرما، به‌دلیل ناچیز بودن مقدار، صرف‌نظر شد. فرایند هم‌پارشدن (ایزومریزاسیون) در محدوده‌ی دمایی $۳۰ - ۹۰°C$ و محدوده‌ی pH ۶-۸/۵ در سیستم ناپیوسته، برای مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد و محدوده‌ی دمایی $۵۰ - ۶۰°C$ به‌عنوان حرارت بهینه و محدوده‌ی pH ۷-۷/۷ به‌عنوان pH بهینه به دست آمد.

a_ kazemi@sharif.edu
J_ kashfi@yahoo.com

مقدمه

قسمت اعظم قند و شکر دنیا از چغندرقند و نیشکر تهیه می‌شود که ماده‌ی اصلی شیرین‌کننده‌ی آن ساکاروز است. ازجمله شربت‌های قندی دیگر می‌توان به قند مایع حاصل از نشاسته (موجود در گندم، ذرت، سیب‌زمینی، کاساوا)، قند مایع حاصل از سلولز (ضایعات مختلف سلولزی)، و قند مایع حاصل از خرما که به‌صورت قند ساده‌ی گلوکز و فروکتوز و مقدار ناچیزی ساکاروز است، اشاره کرد. می‌توان شیره‌ی خرما را پس از استخراج از خرماهای ضایعاتی تبدیل به قند مایع کرد. درجه‌ی شیرینی قند مایع حاصل از خرما کم‌تر از قند ساکاروز است ولی با تبدیل آنزیمی گلوکز به فروکتوز، از آن‌جا که شیرینی فروکتوز ۱/۸ برابر ساکاروز است، شربت‌های قندی با درجه‌ی شیرینی بالاتر از ساکاروز به دست می‌آید. امروزه تولید شربت‌های غنی‌شده از فروکتوز در دنیا مورد توجه قرار گرفته است. با مصرف میزان کم‌تر مواد اولیه می‌توان به شیرینی مناسب دست یافت که در صنایع غذایی مختلف (صنایع نوشابه‌سازی، شیرینی‌سازی، بیسکویت، کمپوت، مرباجات، بستنی‌سازی، و غذای کودک)، صنایع دارویی و دیگر صنایع کاربرد دارد. خرما که حاوی ۸۰-۷۰ درصد کربوهیدرات، مواد قندی، مواد معدنی مناسب (پتاسیم، منیزیم، فسفر و کلسیم)، و نیز مقدار محدودی از بعضی ویتامین‌ها در یک رژیم متعادل غذائی است، در جنوب کشور به‌عنوان یک غذای عمده محسوب می‌شود. شربت‌های قندی غنی از فروکتوز را از خرما (HFDS) و با استفاده از آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت شده تولید می‌کنند.[۱و۲]

آنزیم گلوکز ایزومراز در یک واکنش برگشت‌پذیر و در دمای حدود $۶۰°C$، آلدوپنتوزها و آلدوهگزوزها را به ایزومرهای خود تبدیل می‌کند؛ البته بیشترین تأثیر این آنزیم بر روی آلدوهگزوزها (به‌ویژه گلوکز) متمرکز است. لذا امروزه فراورده‌ی حاصل از این آنزیم به‌عنوان یکی از منابع مهم شیرین‌کننده‌ی دنیا به کار گرفته می‌شود. ضمن این‌که بیماران مبتلا به دیابت می‌توانند بدون هیچ‌گونه عارضه‌ی جانبی از قند فروکتوز استفاده کنند.[۳-۷]

مواد لازم و آزمایشات

۱. شیره‌ی خرمای مهرورزان تهیه شده از سازمان نخیلات؛
۲. آنزیم گلوکز ایزومراز تثبیت شده (Sweetzyme T) تهیه شده از شرکت NOVO NORDisk؛
۳. کیت آنزیمی تهیه‌شده از شرکت زیست‌شیمی؛
۴. مواد شیمیایی مختلف؛
۵. رفراکتومتر ERMA OPITICA WORK؛
۶. جذب اتمی PYE UNICAM, Sp191.

تهیه‌ی شیره‌ی خرما

برای تهیه‌ی شیره‌ی خرما باید مخلوطی مناسب ــ معمولاً ۳۰ درصد ــ از آب و خرما تهیه، و برای مدت ۲ ساعت در تانک‌های هم‌زن‌دار و در دمای مناسب $۶۰ - ۷۰°C$ قرار داد تا مخلوطی همگن تهیه شود. سپس باید مواد جامد و معلق

جدول ۱. فلزات سنگین موجود در شیره خرما.

نوع فلز	درصد gr/۱۰۰
Ca	۰/۱۵۴
Mg	۰/۰۶۶
Fe	۰/۰۰۱۲۱۱۷
Co	-
Pb	-
Zn	-
Cu	-

را با استفاده از سانتریفوژ و صافی جدا، و بعد عملیات رنگ‌بری را با استفاده از خاک رنگ‌بر و کربن فعال انجام داد. و در نهایت باید عمل تغلیظ توسط دستگاه تقطیر در خلاء انجام شود.

آماده‌سازی شیره‌ی خرمای مهرورزان

ابتدا محلول ۳۰ درصد از شیره‌ی خرما تهیه می‌شود. شیره‌ی خرما به‌علت داشتن مواد کلوئیدی و رنگی مختلف کدر است. سپس شیره‌ی خام را که pH آن حدود ۵ تا ۵/۵ است تا $۷۵^{\circ}C$ گرم، و با اسیدفسفریک ۸۹ درصد pH را روی ۳/۵ تنظیم کرده و سپس ۱/۵ درصد هیدروکسید کلسیم برای رسوب‌سازی (سولفات، فسفات، اگزالات، سیترات) به آن اضافه می‌کنیم. در این مرحله تصفیه‌ی جزئی انجام می‌شود؛ البته در این مرحله کنترل حرارت به‌منظور جلوگیری از انعقاد مواد پروتئینی ضروری است. شیره را توسط خاک دیاتومه صاف و بعد به‌میزان ۰/۵ – ۰/۲ درصد کربن فعال اضافه و مجدداً صاف می‌شود که برای سریع صاف‌شدن از پمپ خلاء استفاده می‌شود.

تجزیه‌ی شیره‌ی خرما

تعیین فلزات سنگین موجود در شیره‌ی خرما

میزان فلزات سنگین موجود در شیره‌ی خرما با استفاده از دستگاه جذب اتمی تعیین می‌شوند که نتایج حاصله در جدول ۱ منعکس شده است.

تعیین میزان قندهای موجود در شیره‌ی خرما

میزان ساکاروز و قندهای احیاءشونده با استفاده از روش فهلینگ، و میزان گلوکز با استفاده از روش یدسنجی اندازه‌گیری می‌شود که در نهایت میزان گلوکز و فروکتوز و ساکاروز به دست می‌آید.[۸] میزان ساکاروز موجود با روش شکست‌سنجی، و میزان گلوکز با استفاده از کیت آنزیمی گلوکز اکسیداز تعیین شدند که ارقام به‌دست آمده از هر دو روش تقریباً یکسان است.

اندازه‌گیری ساکاروز با روش شکست‌سنجی[۹]

ابتدا صفر دستگاه را با آب مقطر تنظیم، و چند قطره از محلول شیره‌ی خرما به آن اضافه می‌کنند و سپس ضریب شکست را یادداشت می‌کنند. ضریب شکست محلول‌های قندی به غلظت آنها بستگی دارد. با استفاده از جداول درصد ساکاروز را به دست می‌آوریم.

اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از کیت آنزیمی گلوکز اکسیداز

ابتدا محلول ۳۰ درصد از شیره‌ی خرما را تهیه، و $۱cc$ از آن را به حجم ۱۰۰ می‌رسانیم. طبق دستورالعمل بلانک و نمونه و استاندارد تهیه و معرف‌ها اضافه و ۱۵ دقیقه در بن ماری $۳۷^{\circ}C$ قرار داده بعد توسط اسپکتروفتومتر در ۵۲۰ نانومتر، جذب نوری نمونه و استاندارد را در مقابل بلانک یادداشت کرده و از فرمول زیر میزان گلوکز به دست می‌آید.

$$\text{میزان گلوکز در شیره خالص} = \text{رقت} \times \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد}}$$

استفاده از قند خرما و آب‌کافت توسط گلوکز ایزومراز[۴،۵و۷]

به‌دلیل بالابودن گران‌روی (ویسکوزیته) شیره، یک محلول ۳۰ درصد از شیره‌ی خرما تهیه و مقدار $۱۰۰ppm$ سولفات منیزیم و مقدار $۲۰۰ppm$ از $So_۳Na_۲$ یا $S_۲o_۵Na_۲$ اضافه و pH با استفاده از کربنات سدیم یا بی‌کربنات سدیم روی pH مورد نظر تنظیم می‌شود. پس از تهیه‌ی سوبسترا با pH مورد نظر چند عامل باید بررسی شود. این عوامل شامل تعیین درجه‌حرارت بهینه، تعیین pH بهینه و اثر حرارت و pH بر پایداری آنزیم است.

فرایند همپارشدن به‌صورت ناپیوسته (Batch) انجام می‌شود. بدین‌منظور مقدار مشخصی از آنزیم به مقدار مشخصی از سوبسترا در لوله‌ی آزمایش اضافه و لوله در همزن الکتریکی در دمای مورد نظر قرار می‌گیرد، پس از زمان مورد نظر، میزان گلوکز اندازه‌گیری می‌شود و با تعیین کاهش میزان گلوکز از مقدار اولیه، مقدار فروکتوز تولید شده تعیین می‌شود. و بدین ترتیب فعالیت آنزیم اندازه‌گیری می‌شود.

طبق تعریف، فعالیت آنزیم عبارت است از میزان آنزیمی که تحت شرایط مشخص یک میکرومول سوبسترا را در مدت یک دقیقه به محصول تبدیل کند؛ و به‌بیان دقیق‌تر، مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول گلوکز را در مدت یک دقیقه به فروکتوز تبدیل کند، از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود:

$$IGIU/gr = \frac{\text{میکرومول گلوکز تبدیل شده}}{\text{زمان واکنش} \times \text{مقدار آنزیم}}$$

نتایج

جدول ۱ نشان‌گر نتایج مربوط به آزمایش جذب اتمی است. نتایج مربوط به آزمایش‌های قند موجود در شیره‌ی خرما در دو روش فهلینگ و یدسنجی در

جدول ۲. تعیین درصد قندهای موجود.

قند کل	۵۹/۴۸ گرم درصد
قندهای احیاءشونده	۵۹/۴۳ گرم درصد
ساکاروز	۰/۰

جدول ۳. تعیین درصد قندهای موجود.

قند کل	۵۹/۴۸
گلوکز	۴۸/۳
فروکتوز	۱۱/۱۸

جدول ۴. نتایج حاصل از کیت آنزیمی.

درصد گلوکز در شیره خالص (گرم)	درصد گلوکز (میلی‌گرم)	جذب نوری نمونه	جذب نوری محلول استاندارد
۴۸/۱۶	۱۴۴۸۴/۷۷	۰/۴۹۱	۰/۳۳۹

جدول‌های ۲ و ۳ ارائه شده‌اند؛ چنان که مشهود است هر دو روش با هم کاملاً مطابقت دارند و نتایج حاصله از کیت آنزیمی در جدول ۴ ارائه شده است.

روش فهلنیگ

روش یدسنجی

محاسبه‌ی درصد ساکاروز از روش طیف‌نورسنجی (اسپکتروفتومتری) با توجه به جداول ضریب شکست و ضریب شکست معادل ۱/۳۳۲۹ که از دستگاه خوانده شد حاکی از آن است که میزان ساکاروز به دست آمده ۰/۰۸ گرم درصد (تقریباً معادل صفر) است و با مقدار روش یدسنجی تقریباً یکسان است. قابل ذکر است که اندازه‌گیری با روش کیت آنزیمی سریع‌تر انجام می‌شود.

تعیین شرایط بهینه‌ی عملکرد آنزیم در سیستم ناپیوسته

پس از تهیه‌ی سوبسترا، pH محلول را توسط محلول ۲ درصد بی‌کربنات سدیم روی (۷/۵ – ۷) تنظیم و سپس ۰/۱ گرم از آنزیم تثبیت‌شده را در لوله‌ی آزمایش ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر سوبسترا (نسبت $\frac{E}{S} = ۰/۰۲$ رعایت شود) اضافه می‌شود. سپس درب لوله را مسدود و در حرارت $۳۰°C$ در همزن الکتریکی با سرعت ۱۸۵ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار می‌دهند.

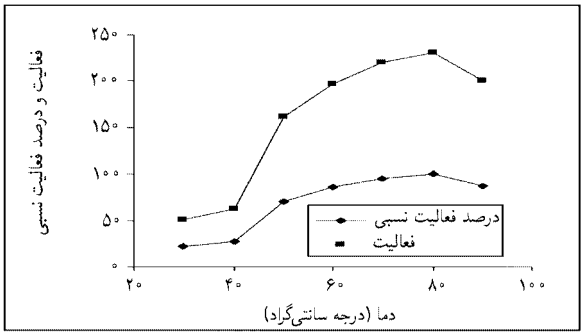
در خاتمه، برای متوقف‌شدن واکنش آنزیمی، لوله را در حمام یخ قرار می‌دهند؛ و از این محلول به‌میزان ۱ میلی‌لیتر برداشته و آن را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانند. اندازه‌گیری میزان گلوکز با استفاده از روش گلوکز اکسیداز، توسط کیت آنزیمی تعیین می‌شود. در این آزمایش ابتدا دما بهینه و سپس پایداری حرارتی آنزیم تعیین می‌شود، و بعد با استفاده از دمای بهینه، مقدار pH بهینه می‌شود.

بررسی اثر حرارت و تعیین حرارت بهینه

مطابق روش قبلی ابتدا سوبسترا تهیه و آزمایش فوق در دماهای ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. بدین‌ترتیب، میزان گلوکز باقی‌مانده و نیز فعالیت آنزیم در دماهای مختلف تعیین می‌شود که نتایج در جدول ۵ و نمودار ۱ منعکس شده است.

جدول ۵. نتایج فعالیت آنزیم و درصد فعالیت نسبی در دماهای مختلف. (نتایج، میانگین دو تکرار است).

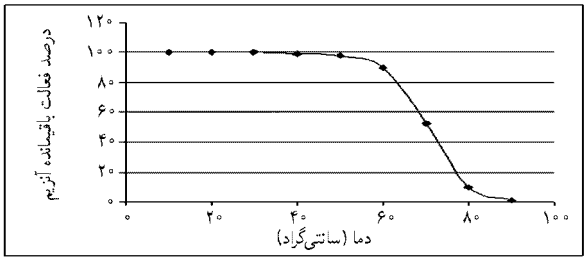
درصد فعالیت نسبی	IGIU/gr	T(°C)
۲۲	۵۰/۶۸	۳۰
۲۶/۸۷	۶۱/۹۰	۴۰
۷۰/۲۵	۱۶۱/۸۵	۵۰
۵۴/۸۵	۱۹۷/۰۸	۶۰
۹۵/۷	۲۲۰/۴	۷۰
۱۰۰	۲۳۰/۴	۸۰
۹۸/۲۷	۲۰۱/۷	۹۰



نمودار ۱. نتایج فعالیت آنزیم و درصد فعالیت نسبی در دماهای مختلف.

جدول ۶. درصد فعالیت آنزیم باقیمانده در دماهای مختلف.

فعالیت باقی‌مانده (٪)	T(°C)
۱۰۰	۱۰
۱۰۰	۲۰
۱۰۰	۳۰
۹۹	۴۰
۹۸	۵۰
۹۰	۶۰
۵۲/۵	۷۰
۱۰	۸۰
۱/۱۷	۹۰

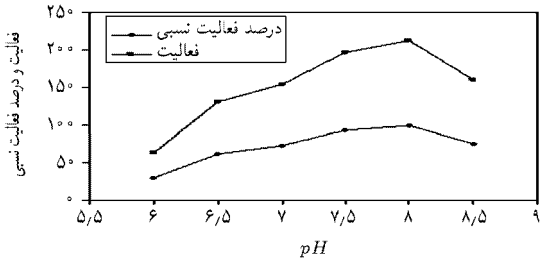


نمودار ۲. اثر دما بر پایداری آنزیم.

با بررسی جدول ۵، مشاهده می‌کنیم که فعالیت آنزیم در دمای $۳۰°C$ و $۴۰°C$ افزایش قابل توجهی نداشته است ولی در دمای $۷۰ – ۸۰°C$ بالاترین فعالیت را داشته و در دمای بالای $۸۰°C$ افت فعالیت داشته است.

جدول ۷. فعالیت و درصد فعالیت نسبی آنزیم در pHهای مختلف.

pH	IGIU/gr	درصد فعالیت نسبی
۶	۶۳/۵	۲۹/۹۶
۶/۵	۱۳۰/۸	۶۱/۷۲
۷	۱۵۳/۹۳	۷۲/۶۴
۷/۵	۱۹۶/۷۷	۹۲/۸۵
۸	۲۱۱/۹	۱۰۰
۸/۵	۱۶۰/۱	۷۵/۵



نمودار ۳. فعالیت و درصد فعالیت نسبی آنزیم در pHهای مختلف.

بررسی پایداری حرارتی آنزیم

پایداری آنزیم در محدوده‌ی دمایی $۹۰°C$–۱۰ و pH ۷-۷/۵ پس از یک ساعت بررسی شد. میزان ۱۰۰ گرم آنزیم تثبیت‌شده با بافر در pH ۷-۷/۵ مخلوط و مدت یک‌ساعت در محدوده‌ی دمایی $۹۰°C$–۱۰ قرار می‌گیرد. سپس آنزیم از بافر جدا و فعالیت آنزیم در این حالت اندازه‌گیری می‌شود. نتایج این بررسی در جدول ۶ و نمودار ۲ منعکس شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود آنزیم تا محدوده‌ی دمایی $۶۰°C$–۵۰ پس از یک ساعت افت فعالیت قابل توجهی از خود نشان نمی‌دهد، اما از دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به بعد افت شدیدی در فعالیت باقی‌مانده‌ی آنزیم مشاهده می‌شود و آنزیم به سمت تجزیه‌شدن پیش می‌رود.

بررسی اثر pH، و تعیین pH بهینه

سوبسترا باpHهای ۶ و ۶/۵ و ۷ و ۷/۵ و ۸ و ۸/۵، توسط محلول بافر بی‌کربنات سدیم ۱۰٪ تهیه و از هر کدام ۵ میلی‌لیتر در لوله‌ی آزمایش می‌ریزند. سپس به هریک از لوله‌ها ۰/۱ گرم از آنزیم تثبیت‌شده اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت $۶۰°C$ قرار می‌دهند. در خاتمه لوله‌ها را به‌منظور توقف فعالیت آنزیم در حمام آب‌یخ قرار می‌دهند. میزان گلوکز باقی‌مانده‌ی نمونه‌ها با روش کیت آنزیمی اندازه‌گیری می‌شود که در نهایت فعالیت و درصد فعالیت نسبی آنزیم در نمونه‌ها مشخص خواهد شد. نتایج حاصله در جدول ۷ و نمودار ۳ منعکس شده است.

براساس نتایج به‌دست آمده، آنزیم در pH=۸ حداکثر فعالیت را داشته، و به‌طور کلی آنزیم در pHهای قلیایی فعالیت بالاتری نسبت به pHهای اسیدی دارد.

نتیجه‌گیری

تبدیل گلوکز موجود در شیره‌ی خرما توسط آنزیم تثبیت‌شده‌ی گلوکز ایزومراز در سیستم منقطع در حرارت‌های $۹۰°C$ – ۳۰ و pHهای ۸/۵ – ۶ و تعیین بهینه‌ی حرارت و pH که در حرارت $۸۰°C$ – ۷۰ بالاترین فعالیت ولی پایداری در مقابل حرارت و فعالیت بالا در حرارت $۶۰°C$ – ۵۰ حاصل می‌شود. pH بهینه بین ۸ – ۷/۵ به دست می‌آید.

منابع

1. Moo-Young, Preparation of Dextrose feed Stock for isomerization Comprehensive Biotechnology, **3,** pp. 783-858 (1985).
2. MCGinnis, R.A. MULLER, E.G. Production of High Fructose Corm syrup in The USA Sugar Technology Reviews, **11,** pp 32-73 (1984).
3. Marshall R.O. Koole R, 19 ST, Enzymatic conversion of D-Glucose to D-Fructose, *Science,* **125,** pp. 634-649 (1988).
4. Takasaki, y. Enzymatic method for manufacture of fructose, *US Pat.* No. 3698362 (1972).
5. Johnson, R.; Cliyd, N. and Thompson, K. Process for isomerizing Glucose to Fructose. US pat. No. 3788945 (1974).
6. Fogarty W.M., Kely C.T (eds), Microbial Enzymes and Biotechnology, pp. 198-221 (1990).
7. Linko, y-y., Pohjola, L. and CLinko. P. Entrapped glucose isomerase for High fructose syrup production. *Process Biochemistry,* **12**(6), pp. 14-16 (1977).
8. Parvaneh, V. Quality Control and chemical analysis of Foods Tehran University Pablication (1992).
9. Kashani, M. Study box of dates, date (1992).