نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص.80-69

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 69- 80

مقایسه روش‌های آنزیمی، اهمی و متداول بر بازده و ویژگی‌های کیفی پکتین استخراجی از ضایعات پرتقال

حامد صابریان[1]- زهره حمیدی اصفهانی[2*]- حسن احمدی گاولیقی[3]- محسن برزگر[2]

تاریخ دریافت: 1395/09/28
تاریخ پذیرش: 1395/12/25

چکیده

ابتدا تاثیر غلظت آنزیم، نسبت ماده جامد به حلال و زمان بر بازده پکتین استخراجی از ضایعات پرتقال با استفاده از دو نوع آنزیم سلولاز Celluclast و Rohament مورد بررسی قرار گرفت. سپس بازده، درجه استری، میزان گالاکتورونیک اسید، ویژگی‌های امولسیفایری و رفتار گرانروی پکتین‌های استخراجی در بهترین شرایط استخراج توسط انزیم‌ها با بهترین شرایط استخراج توسط روش نوین اهمی (مقاومتی) و روش متداول اسیدی مقایسه شد. نتایج حاکی از آن بود که بیشترین بازده پکتین با استفاده از آنزیم Celluclast و Rohament به‌ترتیب در غلظت‌های آنزیم 15 و 17/5 درصد، نسبت ماده جامد به حلال 1:20 و 1:40 و زمان 3 ساعت حاصل شد که برابر با 5/92 و 10/7 درصد بود. بیشترین بازده پکتین در روش نوین گرمایش اهمی در شیب ولتاژ 15 ولت بر سانتی‌متر، دمای 90 درجه و زمان 30 دقیقه بدست آمد (14/33%) که بیشتر از روش متداول (13/53%) نیز بود. فعالیت امولسیفایری پکتین‌های استخراجی با دو روش گرمایش اهمی و متداول به‌ترتیب 65/47 و 67/18% بود اما پکتین استخراجی به روش آنزیمی فاقد فعالیت امولسیفایری بود. گرانروی پکتین‌های استخراجی با روش‌های اهمی و متداول در غلظت 2% نیز نسبت به نوع آنزیمی بسیار بالاتر بود. بنابراین پکتین استخراجی با روش اهمی و همچنین متداول بیشترین بازده، ویژگی امولسیفایری و گرانروی را داشت.

واژه‌های کلیدی: استخراج پکتین، ضایعات پرتقال، روش آنزیمی، گرمایش اهمی، ویژگی‌های کیفی

مقدمه

پکتین، پلی‌ساکارید پیچیده‌ای است که در حد فاصل بین دیواره‌های سلولی گیاهان مختلف وجود دارد و حدود 35% از دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می‌دهد. (Mohnen, 2008). این پلی‌ساکارید از نظر شیمیایی پلی‌مری طویل از 1و 4 آلفادی‌گالاکتورونیک اسید می‌باشد که در زنجیره جانبی آن قندهایی ازجمله رامنوز، آرابینوز، گالاکتوز و زایلوز وجود دارند (Yapo, 2011) در برخی نقاط از زنجیره پلیمر، عامل کربوکسیل آن با متانول به‌صورت استر در آمده است (مصباحی و جمالیان، 1381). پکتین بر اساس درجه استریفیکاسیون به دو گروه با درجه متوکسی بالا (درجه استری بالا، بیش از50%) و درجه متوکسی پایین (کمتر از 50%) تقسیم‌بندی می‌شوند. درجه استریفیکاسیون عامل کلیدی در خواص رئولوژی و فیزیکوشیمیایی پکتین می‌باشد به‌طوری که توانایی پکتین در تشکیل ژل به آن بستگی دارد. از طرفی مقدار بالاتر اسید گالاکتورونیک از مشخصات خلوص بالاست (وثوقی، 1375).

پکتین دارای خواص عملکردی زیادی بوده و می‌تواند به‌عنوان غلیظ‌کننده، عامل تشکیل ژل، پایدارکننده، امولسیفایر و عامل باندکننده کاتیون عمل کند. همچنین دارای فواید درمانی مثل کاهش میزان کلسترول خون، حذف یون‌های فلزی سنگین از بدن، تثبیت‌کننده فشار خون و تسهیل فعالیت روده‌ای می‌باشد (فتحی و همکاران، 1391؛ Sato *et al*., 2011)

پکتین می‌تواند به‌عنوان یک محصول جانبی از منابع مختلفی مانند تفاله سیب درختی، تفاله و پوست (لایه داخلی سفید رنگ) مرکبات، تفاله چغندرقند و طبق گل آفتابگردان استخراج شود (کرامت و همکاران، 1381؛ مصباحی، 1388). بیشترین بازده تولید پکتین از پوست مرکبات می‌باشد (آزادبخت و همکاران، 1382؛ مصباحی و جمالیان،1381؛ Mohnen, 2008; Xie *et al*., 2008) .

رایج‌ترین شیوه برای استخراج صنعتی پکتین، استخراج اسیدی می‌باشد (Koubala *et al*., 2008) گرچه آبکافت اسیدی در دمای بالا معایبی نیز دارد که عیب اصلی آن نگرانی‌های زیست محیطی به

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
(* - نویسنده مسئول: (Email: h_zohreh@yahoo.com
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.61093

خاطر تولید حجم بالایی از فاضلاب اسیدی می‌باشد. علاوه بر آن، فرآیند اسیدی شدید ممکن است موجب تجزیه نامطلوب زنجیره پکتین گردد (Dominiak *et al*., 2014). اخیرا بکارگیری روش‌های استخراج جدیدی که پکتین با راندمان و کیفیت بالا را نتیجه دهد و از تجزیه پکتین جلوگیری کند، مورد استقبال قرار گرفته اند. برخی از فناوری‌های نوآورانه و کاربردی از قبیل فراصوت (Maran & Priya, 2015; Wang *et al*., 2015)، مایکروویو (Maran *et al*., 2015)، فشار بالا (Guo *et al*., 2012)، میدان الکتریکی پالسی (Yin *et al*., 2009) و میدان الکتریکی ملایم (de Oliveira *et al*., 2015) به علت افزایش نفوذپذیری بافت‌های گیاهی و درنتیجه افزایش بازده استخراج پکتین مورد استفاده قرار گرفته است.

گرمایش اهمی (گرمایش مقاومتی) یک فن‌آوری حرارت‌دهی مبتکرانه است که برای فرایند حرارتی مواد غذایی به‌کار گرفته می‌شود. در این روش، غذا به‌عنوان مقاومت الکتریکی بین دو الکترود قرار می‌گیرد و یک جریان الکتریکی متناوب از این مدار عبور می‌کند. به علت تاثیر و اهمیت مقاومت الکتریکی در این روش، حرارت به‌طور یکنواخت‌تری نسبت به روش متداول در سراسر غذا حتی در مدت چند ثانیه تولید می‌شود (Ahmed *et al*., 2010). مزیت‌های عمده این روش، حرارت‌دهی سریع، یکنواخت، ضریب تبدیل انرژی بالا، دوستدار محیط زیست (به‌علت کارایی روش از نظر انرژی و همچنین امکان کاهش حلال و مواد شیمیایی) و مناسب بودن برای مایعات گرانرو می‌باشد (Assiry *et al*., 2010; de Oliveira *et al*., 2015).

روش استخراج آنزیمی به علت عدم استفاده از اسید، روشی دوستدار محیط زیست است ضمن اینکه پتانسیل مناسبی نیز برای استخراج پکتین با بازده بالا دارد (Wikiera *et al*., 2015) با توجه به اینکه ساختار و ترکیب دیواره سلولی پیچیده است و معمولا از 15-45% پکتین، 30-60% سلولز، 15- 25 % همی سلولز و 10-15% گلیکوپروتئین (بر اساس وزن خشک) تشکیل شده است بسیاری از آنزیم‌ها ازقبیل سلولاز و همی‌سلولاز برای آزادسازی پکتین از دیواره سلولی مورد استفاده قرار گرفته اند (Dominiak *et al*., 2014).

باتوجه به اینکه در ایران سالیانه بیش از یک صد تن پکتین در صنایع غذایی و داروئی به مصرف می‌رسد، که تماما از خارج از کشور تامین می‌گردد و ارزبری نسبتا چشمگیری دارد، بررسی تولید آن در داخل کشور اهمیت و ارزش بالایی خواهد داشت. لذا، هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر روش استخراج آنزیمی بر بازده و کیفیت (درجه استری، گالاکتورونیک اسید، ویژگی‌های امولسیفایری و گرانروی) پکتین و مقایسه آن با پکتین استخراجی با روش اهمی و متداول و درنهایت، انتخاب بهترین روش استخراج می باشد.

مواد و روش‌ها

ضایعات پرتقال از فروشگاه آبمیوه‌ای در تهران تهیه شد. ضایعات به قطعات کوچکتر تقسیم شد و دانه‌های پرتقال جدا شده و در آون هوای خشک با دمای 60°C تا رسیدن به وزن ثابت (حدود 36 ساعت) خشک شد. ضایعات خشک شده با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی آسیاب شد و از الک با مش 60 عبور داده شد تا پودر مناسب و یکنواختی تهیه شود. پودر آسیاب شده در دمای محیط نگهداری شد.

استخراج پکتین

بهینه سازی استخراج آنزیمی پکتین

دو آنزیم مختلف سلولازی (Celluclast و Rohament) جهت استخراج پکتین از ضایعات آب پرتقال مورد استفاده قرار گرفتند و شرایط بهینه استخراج مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای استخراج آنزیمی در چند مرحله بهینه‌سازی شدند. ابتدا غلظت آنزیم‌ها (2/5 تا 20٪ نسبت به وزن خشک نمونه) در شرایط ثابت دما، pH، نسبت S/L[1] و زمان به‌ترتیب 60، 4/5، 1:20 و 3 ساعت بهینه‌سازی شد. دور همزن انکوباتور، 300 rpm بود. یک گرم از نمونه پودر ضایعات آب پرتقال آسیاب شده با 19 میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر بافر استات سدیم با pH 4/5 (جهت جلوگیری از تغییرات pH طی فرآیند استخراج) مخلوط شد و مقادیر 25 تا 200 میکرولیتر از هر کدام از آنزیم‌ها به‌صورت جداگانه به محلول حاوی پودر ضایعات آب پرتقال اضافه شد. این آزمون غلظت بهینه هر آنزیم را مشخص می‌نماید. سپس نسبت S/L (از 1:10 تا 1:50 گرم بر میلی‌لیتر) در شرایط ثابت دمایی، pH و زمانی به‌ترتیب 60، 4/5 و 3 ساعت بهینه‌سازی شد. غلظت آنزیم مورد استفاده در این آزمون، همان غلظت بهینه شده در آزمون قبل می باشد. در نهایت، زمان بهینه (1 تا 18 ساعت) جهت استخراج پکتین در شرایط غلظت و نسبت S/L از پیش بهینه شده، مورد بررسی قرار گرفت تا زمانی که بیشترین بازده پکتین استخراج می‌شود، انتخاب گردد.

استخراج پکتین با استفاده از روش اهمی

اثر عوامل مختلف شیب ولتاژ (7-15ولت بر سانتی‌متر)، دما (50-70 درجه) و زمان (5-30 دقیقه) بر بازده پکتین، درجه استریفیکاسیون و میزان گالاکتورونیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. pH محلول و نسبت S/L به‌ترتیب 2 و 1:20 درنظر گرفته شد.

1 Solid/Liquid ratio

سوسپانسیون اسیدی ضایعات پرتقال در داخل سلول اهمی ریخته شد و فرآیند اهمی اعمال شد. بهترین شرایط استخراج اهمی انتخاب شد و با سایر روش ها مورد مقایسه قرار گرفت[1]. استخراج به روش متداول نیز در داخل سلول اهمی بدون اعمال جریان الکتریکی صورت پذیرفت.

سامانه مورد استفاده برای انجام گرمایش اهمی و نحوه اتصال اجزاء مدار به‌صورت شماتیک در شکل 1 نشان داده شده است. این سامانه شامل قسمت‌های محفظه اهمی، پاورآنالایزر[2]، دماسنج، رایانه، ترازوی دیجیتالی، دستگاه تنظیم ولتاژ[3]، سیم‌های رابط و سیرکولاتور است.

آزمون‌های فیزیکوشیمیایی

استخراج پکتین و خالص‌سازی

بعد از انجام فرآیند استخراج با روش‌های ذکر شده، مخلوط داغ پودر ضایعات تا دمای اتاق سرد شد و سپس با استفاده از سانتریفوژ در دور 10000 rpm به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی با استفاده از حجم دو برابر اتانول 96% در دمای 4 °C به مدت 1 ساعت نگهداری شد تا پکتین موجود در آن رسوب کند. پکتین رسوب داده شده با استفاده از اتانول 96% شستشو داده شد تا ناخالصی‌هایی ازقبیل مونو و دی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی حذف شوند. پکتین حاصله در آون هوای خشک با دمای 60 °C تا رسیدن به وزن ثابت (حدود 16 ساعت) خشک شد و سپس توزین گردید. راندمان پکتین با استفاده از رابطه (1) به صورت گرم بر 100 گرم ماده خشک گزارش شد (Wai, Alkarkhi, & Easa, 2010).

(1) درصد پکتین= (وزن پکتین/ وزن نمونه) ×100

تعیین درجه استریفیکاسیون

درجه استریفیکاسیون نمونه‌های پکتین با استفاده از روش تیتراسیون گزارش شده توسط سانتوس و همکاران (2013) با اندکی اصلاحات اندازه گیری شد (Santos *et al*., 2013). ابتدا 0/1 گرم از نمونه پکتین خشک شده به ارلن 250 میلی‌لیتری منتقل شد و با استفاده از 1 میلی‌لیتر اتانول، مرطوب شده و 40 میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. بعد از حدود 10 ساعت همزدن مداوم و انحلال کامل، 2 قطره فنل فتالئین (1% وزنی/ حجمی) به نمونه اضافه شد و با استفاده از سود 0/1 نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم‌رنگ تیتر شد و به‌عنوان حجم اولیه (V_1) ثبت شد. این حجم مصرفی سود، درواقع اسیدهای کربوکسیلیک آزاد را خنثی نموده است. سپس 10 میلی لیتر از سود 0/5 نرمال به نمونه ها اضافه شد و به مدت 15 دقیقه در دور 150 rpm همزده شد تا عمل صابونی کردن استرهای پکتین انجام پذیرد. سپس 10 میلی‌لیتر از اسید کلریدریک 0/5 نرمال به نمونه‌ها اضافه شد و عمل همزدن انجام گرفت تا سود مصرفی را خنثی سازد. درنهایت محلول نهایی با سود 0/1 نرمال تا ظهور رنگ صورتی کم رنگ تیتر شد و به‌عنوان حجم ثانویه (V_2) ثبت گردید. با استفاده از رابطه (3) درجه استریفیکاسیون نمونه ها محاسبه گردید:

$$DE(\%) = (V_2/(V_2 + V_1)) \times 100 \quad (2)$$

تعیین میزان گالاکتورونیک اسید

میزان گالاکتورونیک اسید نمونه‌ها مطابق روش اسکات (1979) با اندکی اصلاحات اندازه‌گیری شد (Scott, 1979). ابتدا پکتین خشک شده پودر گردید و از الک با مش 60 عبور داده شد. از آنجایی که پکتین پودر شده تمایل به کلوخه‌ای شدن دارد، با استفاده از اتانول مرطوب گردید. بعد از آن، 2 میلی لیتر اسیدسولفوریک 72% به نمونه‌ها اضافه شد و در حمام آب گرم با دمای 50°C درجه برای مدت 10 دقیقه جهت هضم پکتین حرارت داده شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر تا حجم 100 میلی‌لیتر رقیق شدند و بعد از آن به نسبت 1:1 با سود 0/5 نرمال رقیق شدند تا متانول موجود در پکتین استرزدایی شود. 0/125 میلی‌لیتر از محلول تهیه شده با 0/125 میلی لیتر از NaCl 2% در لوله شیشه‌ای مخلوط شد تا ایجاد رنگ توسط قندهای خنثی به حداقل برسد. 2 میلی‌لیتر از اسید سولفوریک غلیظ (96%) به محلول قبلی افزوده شد و همزدن صورت پذیرفت. نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه در حمام آب گرم با دمای 70°C درجه قرار گرفتند و سپس سریعا تا دمای محیط سرد شدند. 0/1 میلی‌لیتر از معرف رنگی 3 و 5 دی متیل فنل (0/1 گرم از 3 و 5 دی‌متیل فنل در 100 میلی‌لیتر اسید استیک حل شد) به محلول افزوده شد و بعد از همزدن به مدت 15 دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج‌های 400 و 450 نانومتر خوانده شد و تفاضل این طول موج‌ها محاسبه گردید. جهت تهیه منحنی استاندارد، محلول‌های گالاکتورونیک اسید (25-125 میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. جذب خوانده شده برای نمونه‌ها در ضریب تصحیح 1/12 ضرب گردید زیرا گالاکتورونیک اسید به‌صورت پلیمری در نمونه وجود داشته است و جذب کمتری را نسبت به حالت مونومری (نمونه استاندارد) نتیجه می‌دهد.

اندازه‌گیری خصوصیات امولسیفایری پکتین

فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون با استفاده از روش دالو و سیمونوا (1995) و یاپو و همکاران (2007) با اعمال تغییرات جزئی

1 در این مقاله تنها به شرایط بهینه اهمی پرداخته شده و به علت محدودیت صفحات مقاله از ذکر جزئیات اجتناب شده است.

2 Power analyser

3 Regulator voltage

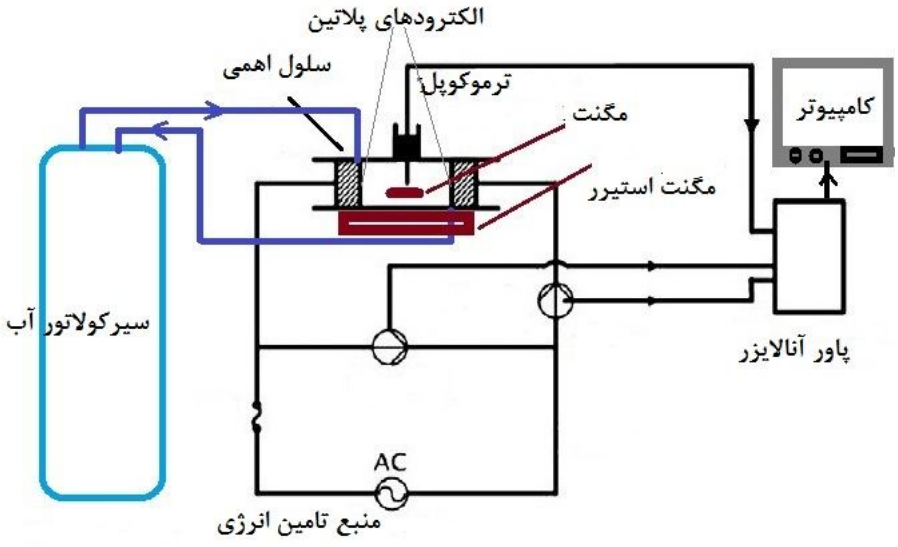
و در یک غلظت از پکتین، اندازه‌گیری شد (Yapo *et al.*, 2007). بدین منظور ابتدا محلول 0/5% از نمونه‌های انتخابی پکتین (پکتین بهینه در روش گرمایش اهمی، متداول، آنزیم میکروبی و آنزیم سلولاز Rohament) در آب مقطر تهیه شد. در ادامه 5 میلی‌لیتر روغن آفتابگردان با 5 میلی‌لیتر محلول پکتین مخلوط گردید و 0/02% درصد سدیم آزید برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها به آن اضافه شد. در مرحله بعد جهت تهیه امولسیون، نمونه‌ها توسط هموژنایزر با دور 10000rpm به مدت سه دقیقه مخلوط گردیدند. سپس امولسیون ایجاد شده به لوله سانتریفوژی 15 میلی‌لیتری منتقل و برای مدت پنج دقیقه در دور 527 g سانتریفوژ شد. فعالیت امولسیونی با توجه به معادله 3 محاسبه شد.

$$EA\% = \frac{ELV}{W_V} \times 100 \qquad (3)$$

EA فعالیت امولسیونی، ELV حجم لایه امولسیون شده و W_V حجم کل سامانه می‌باشد.

برای مطالعه ویژگی پایداری امولسیون (ES)، 4 نمونه امولسیون برای هر کدام از غلظت‌های پکتین و به ترتیبی که در قسمت ذیل ذکر شد، تهیه گردید. سپس نمونه‌ها به لوله‌های سانتریفوژ 15 میلی‌لیتری منتقل شدند. دو نمونه از آن‌ها (به‌عنوان تکرار) تا دمای 4°C سرد شده و به مدت 5 دقیقه با دور 527 g سانتریفوژ شد. حجم اولیه امولسیون (ELV_i) یادداشت گردید و در دمای 4°C نگهداری شد. دو نمونه دیگر از امولسیون‌های تهیه شده به همان ترتیب و در دمای 25°C سانتریفوژ شد و پس از یادداشت حجم اولیه امولسیون، در دمای 25°C نگه‌داری گردید. پس از دوره‌های یک و 30 روزه، نمونه‌ها دوباره به‌ترتیبی که گفته شد، سانتریفوژ شده و حجم امولسیون باقی مانده (ELV_r)، اندازه‌گیری شد. پایداری امولسیون با استفاده از رابطه 3-11 محاسبه گردید.

$$ES\% = \frac{ELV_i}{ELV_r} \times 100 \qquad (4)$$



شکل 1- تصویر شماتیک مدار بسته اهمی

تعیین گرانروی و رفتار رئولوژیکی عصاره ژل

گرانروی محلول‌های پکتین انتخابی (پکتین بهینه در روش گرمایش اهمی، متداول، آنزیم میکروبی و آنزیم سلولاز Rohament) در غلظت 2٪ وزنی/ حجمی توسط ویسکومتر قابل برنامه‌ریزی چرخشی (LVDV-II Pro, Brookfield Engineering Inc., USA) با استفاده از اسپیندل LV اندازه‌گیری شد. حدود 20 میلی‌لیتر از هر نمونه داخل استوانه ویسکومتر ریخته شد و نرخ برشی بین 2 و 100 بر ثانیه در بازه زمانی 2 ثانیه برنامه‌ریزی شد. رفتار جریانی محلول های تهیه شده در دمای 25°C بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

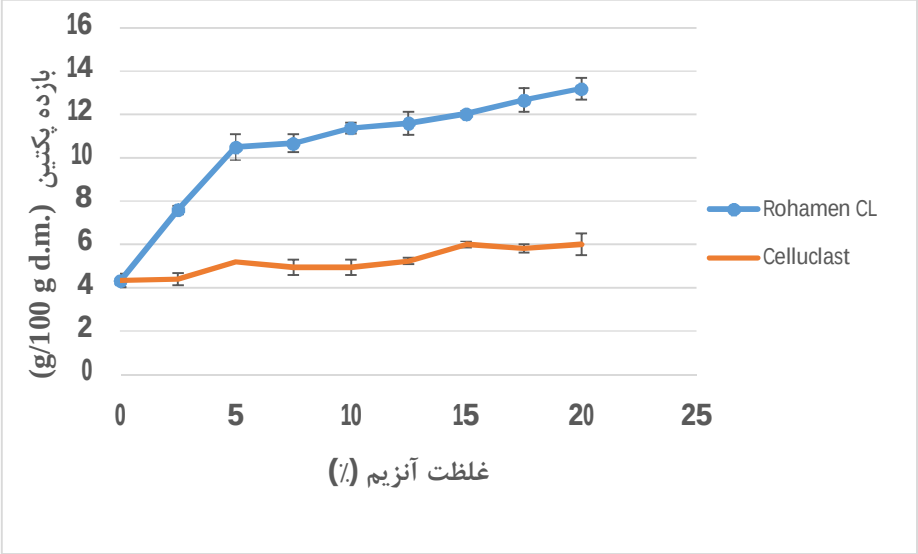
آزمایش‌های مربوط به انتخاب غلظت هر کدام از آنزیم‌ها، زمان استخراج و نسبت S/L و همچنین مقایسه نتایج روش‌های مختلف استخراج با استفاده از طرح یک فاکتور در یک زمان[1] انجام شد و

1 One Factor at a Time

به‌منظور مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

شرایط ملایم استخراج آنزیمی (به علت عدم افزودن اسید) مشکلات فرایند اسیدی را که آلودگی محیط زیست و خوردگی تجهیزات است، حذف می‌کند. استخراج پکتین توسط آنزیم‌ها، روش جایگزین مناسبی نسبت به روش شیمیایی متداول می‌باشد (Dominiak *et al.*, 2014; ptichkina *et al.*, 2008). گرچه تحقیقات برای آنزیم‌های انتخابی، کارامد و ارزان هنوز محدود است. به همین خاطر در این تحقیق، کارایی چند آنزیم تجاری سلولازی که فعالیت سلولازی بالایی جهت شکستن بافت سلول گیاهی دارند، برای استخراج پکتین مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل 2، 8 غلظت از آنزیمها (2/5-20% نسبت به ماده خشک) به‌طور جداگانه استفاده شد و فرآیند استخراج پکتین در دمای 60 درجه، نسبت S/L 1:20 و زمان 3 ساعت انجام پذیرفت. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود غلظت آنزیم‌ها تاثیر معنی‌داری بر راندمان استخراج پکتین داشت به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت آنزیم، بازده پکتین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین شیب افزایش تا غلظت 5% مشاهده شد و بعد از آن روند افزایش کندتر بود. مطابق شکل 2، غلظت‌های 15 و 17/5% به‌ترتیب برای دو آنزیم Celluclast و Rohament جهت انجام مرحله بعدی آزمون انتخاب شد. به نظر می‌رسد دلیل ثابت ماندن بازده استخراج پکتین در غلظت‌های 17/5 و 20%، ناکافی بودن سوبسترا و عدم دسترسی آنزیم‌های مازاد به سوبسترا باشد (Jeong *et al.*, 2014).



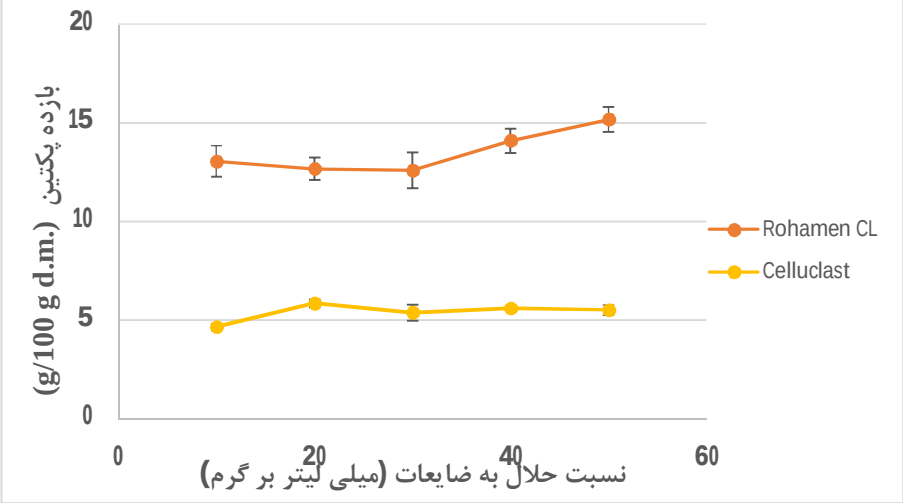
شکل 2- تاثیر غلظت آنزیم‌های مختلف بر بازده استخراج پکتین از ضایعات آب پرتقال

بازده استخراج به نسبت S/L نیز وابسته بود. در مورد آنزیم سلولاز Celluclast، بیشترین راندمان پکتین در نسبت S/L برابر با 1:20 بدست آمد؛ اگرچه آنزیم سلولاز Rohament در نسبت S/L برابر با 1:40 بیشترین راندمان پکتین را موجب شد (شکل 3). بنابراین نسبت S/L 1:20 و 1:40 به‌ترتیب برای دو آنزیم Celluclast و Rohament جهت انجام مرحله بعدی آزمون انتخاب شد. ویکیرا و همکاران (2015) مشاهده کردند که سه آنزیم Celluclast، Econase و Viscoferm در نسبت‌های S/L 1:20 ، 1:10 و 1:10 موجب استخراج بیشترین میزان پکتین از تفاله سیب شدند (Wikiera *et al.*, 2015). به نظر می‌رسد ساختار و ترکیب سوبسترا و همچنین نوع آنزیم تاثیر بسزایی در بازده استخراج دارند.

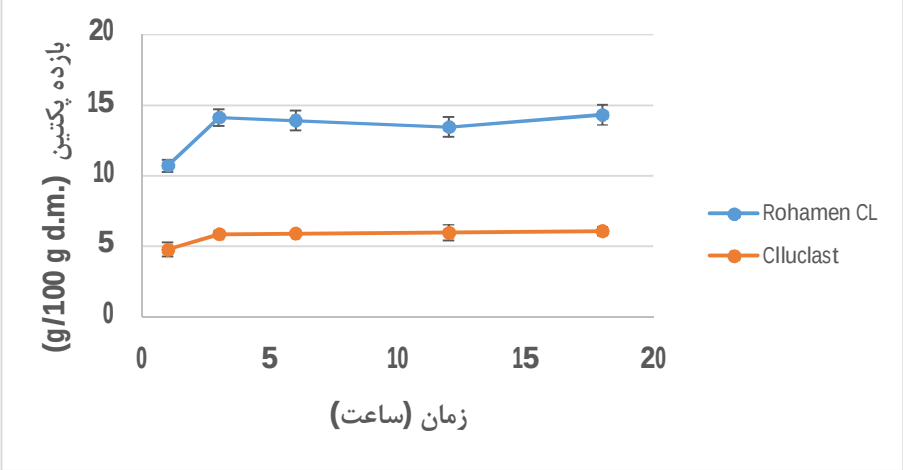
مطابق شکل 4، نتایج تاثیر زمان بر بازده پکتین استخراجی حاکی از آن بود که با افزایش زمان استخراج تا 3 ساعت، بازده افزایش یافت و پس از آن ثابت ماند. برای برهمکنش آنزیم و سوبسترا، زمانی مورد نیاز است تا آنزیم بتواند دیواره سلولی را تجزیه کرده و پکتین را آزاد نماید (Liew *et al.*, 2015). اگرچه جونگ و همکاران (2014) و همچنین لیو و همکاران (2015) مشاهده کردند که با افزایش زمان استخراج، بازده افزایش پیدا کرد.

گرچه بازده پکتین استخراجی با آنزیم میکروبی خیلی بیشتر از آنزیم سلوکلاست بود اما فعالیت سلولازی آنزیم Celluclast خیلی بیشتر (700 واحد به ازای گرم) از سلولاز آنزیم میکروبی (22 واحد به ازای گرم) بود (نتایج نشان داده نشده است). لذا به نظر می‌رسد

آنزیم‌های دیگری غیر از سلولاز در کمپلکس آنزیم میکروبی وجود داشته‌اند و به استخراج پکتین کمک کرده‌اند. گرچه قسمت عمده دیواره سلولی گیاهان از سلولز و همی‌سلولز تشکیل شده است اما ترکیباتی نظیر کربوهیدرات ها و پروتئین‌ها نیز در ساختار سلول وجود دارند (McCann and Roberts, 1991). برخی از محققین (Zykwinska *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015) گزارش کردند که آنزیم‌های زایلاناز، آنزیم‌های تخریب‌کننده کمپلکس پروتئین- کربوهیدرات، آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین و پروتوپکتینازها می‌توانند به استخراج پکتین از دیواره سلولی کمک نمایند و در جهت سینرژیستی با آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز عمل کنند. جئونک و همکاران (2014) تاثیر مخلوط نسبت‌های مختلف آنزیم Alcalase (به‌عنوان آنزیم تخریب کننده کمپلکس پروتئین- کربوهیدرات) با آنزیم Celluclast (به‌عنوان آنزیم تجزیه‌کننده برخی از پیوندهای کربوهیدرات) را برای استخراج پکتین به‌کار بردند و تاثیر سینرژیستی مخلوط دو آنزیم را بر استخراج تایید کردند.



شکل 3- تاثیر نسبت ماده جامد به حلال بر بازده پکتین استخراجی از ضایعات آب پرتقال با استفاده از آنزیم‌های مختلف



شکل4- تاثیر زمان استخراج بر بازده پکتین استخراجی از ضایعات آب پرتقال با استفاده از آنزیم‌های مختلف

مقایسه روش‌های استخراج پکتین

بهترین شرایط استخراج پکتین به روش اهمی شامل شیب ولتاژ 15 ولت بر سانتی‌متر، دمای 90 درجه و زمان 30 دقیقه بود (داده‌های بهینه‌سازی ذکر نشده‌اند). بنابراین شرایط استخراج متداول (به‌عنوان کنترل) نیز همانند شرایط بهینه اهمی (بدون اعمال جریان الکتریکی) انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که روش اهمی به‌طور معنی‌داری

موجب افزایش بازده پکتین شد. به‌نظر می‌رسد که علت افزایش بازده در روش اهمی، سازوکار الکتروپوراسیون (منافذ ایجاد شده بر روی غشا به خاطر جریان الکتریکی متناوب) باشد (Cho, Yousef, & Sastry, 1996). de Oliveira و همکاران (2015) گزارش کردند که میدان الکتریکی ملایم (در دمای 45 درجه و ولتاژ 50 و 100 ولت) موجب افزایش بازده پکتین نسبت به روش متداول شد. Loypimai و همکاران (2015) مشاهده کردند که بازده رنگدانه طبیعی سبوس برنج سیاه با استفاده از روش اهمی بیشتر از روش استفاده از بخار بود زیرا شکست و نفوذپذیری غشای سلولی و درنتیجه انتشار رنگدانه از سراسر غشا به علت اعمال جریان الکتریکی افزایش یافت.

بازده استخراج پکتین با استفاده از آنزیم سلولاز Celluclast در شرایط بهینه (5/93%) به‌صورت قابل توجهی کمتر از آنزیم Rohament (10/8%) بود. Wikiera و همکاران (2015) فعالیت پکتینازی را در آنزیم تجاری سلوکلاست گزارش کردند که می‌تواند موجب کاهش بازده شود. بازده پکتین بدست آمده با استفاده از روش‌های اهمی (14/33%) و متداول (13/53%) نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از آنزیم Rohament بود. بنابراین روش نوین گرمایش اهمی (که در شرایط اسیدی انجام شد) توانایی بیشتری برای استخراج پکتین از ضایعات پرتقال داشت. نتایج Wikiera و همکاران (2015) جهت مقایسه بازده پکتین استخراجی توسط آنزیم با روش متداول (دمای 85 درجه، pH برابر با 2 و زمان 3 ساعت در نسبت S/L برابر با 1:20) نیز بیانگر آن بود که در شرایط بهینه استخراج، بازده پکتین استخراجی دو آنزیم Celluclast و Viscoferm به ترتیب 18/95، 17/78% بود که بیشتر از روش متداول اسیدی (14/52%) بود (Wikiera *et al*., 2015). آن‌ها همچنین دریافتند که بازده بیشتر این دو آنزیم مربوط به فعالیت خیلی بالای سلولاز، زایلاناز و ماناز بود اگرچه فعالیت پکتینازی خیلی پایین بود. Zykwinska و همکاران (2009) گزارش کردند که محلول های آنزیمی که دارای بیشترین فعالیت سلولازی یا زایلانازی هستند، احتمال بیشتری برای آزادسازی پکتین از باقی مانده سلول های گاهی را دارند.

مقایسه بازده پکتین های به‌دست آمده حاکی از آن بود که توانایی روش اسیدی (متداول و اهمی) برای استخراج پکتین، بیشتر از روش‌های آنزیمی بود که مطابق نتایج ودادی (1394) و دومینیاک و همکاران (2014) و مخالف نتایج ویکیرا و همکاران (2015) بود. این نتایج می تواند ناشی از شرایط استخراج متفاوت (دما، زمان و pH استخراج) و همچنین منبع متفاوت (پوست پرتقال،سیب و ...) باشد (Voragen et al., 1995).

مطابق جدول 1، همه پکتین‌های استخراجی از نوع پکتین با درجه استری بالا بودند. همچنین درجه استری پکتین‌های استخراجی با روش‌های اهمی و متداول تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند ولی به‌طور معنی‌داری از پکتین‌های استخراجی با روش‌های آنزیمی بیشتر بودند. علت این امر را می‌توان به فعالیت پکتین متیل استرازی در آنزیم‌ها نسبت داد که موجب جدا کردن گروه‌های استری (De esterification) از پکتین شده‌اند. میزان گالاکتورونیک اسید پکتین‌های استخراجی با روش‌های اهمی و متداول و آنزیم Rohament تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند اگرچه گالاکتورونیک اسید پکتین استخراجی با آنزیم Cellucclast کمتر از سایرین بود که علت آن را می‌توان توانایی اندک این آنزیم در استخراج پکتین دانست. بنابراین بیشترین کمیت و کیفیت پکتین در روش نوین گرمایش اهمی و کمترین کمیت و کیفیت پکتین با استفاده از آنزیم Celluclast حاصل شد.

جدول 1- مقایسه تاثیر روش های مختلف استخراج بر بازده، درجه استری و میزان گالاکتورونیک اسید پکتین

روش استخراجی	**راندمان** (گرم به ازای 100 گرم ماده خشک)	**درجه استری (%)**	**میزان گالاکتورونیک اسید (%)**
روش گرمایش اهمی (15 ولت بر سانتی متر، 90 درجه و 30 دقیقه)	14/33 ± 0/26 ^{ab}	74/62 ± 2/66 ^{a}	72/70 ± 4/55 ^{a}
روش گرمایش متداول (90 درجه و 30 دقیقه)	13/53 ± 0/21 ^{a}	77/78 ± 2/66 ^{a}	70/59 ± 3/62 ^{a}
روش آنزیمی (آنزیم سلولاز Rohament)	10/85 ± 0/95 ^{c}	72/35 ± 1/70 ^{b}	70/43 ± 2/71 ^{a}
روش آنزیمی (آنزیم سلولاز Celluclast)	5/93 ± 0/17 ^{d}	66/21 ± 1/98 ^{c}	59/86 ± 2/62 ^{b}

فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون

فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون پکتین‌های استخراجی به روش‌های اهمی و متداول در شرایط بهینه (دمای 90 درجه و زمان 30 دقیقه) با تهیه محلول 0/5% پکتین بررسی شد. پس از سانتریفوژ امولسیون‌ها، سه فاز شامل فاز روغن در قسمت بالا، فاز آبی در کف و فاز امولسیون بین دو فاز مذکور مشاهده شد. فاز روغنی روغنی بسیار ناچیز بود. همانطور که در جدول شماره 2 مشاهده می‌شود، فعالیت امولسیفایری امولسیون‌های پکتین استخراجی با روش‌های اهمی و متداول به‌ترتیب 3/47 ±65/47 و 3/77 ±67/18% بود که حاکی از فعالیت امولسیفایری یکسان پکتین استخراجی با این دو روش است. پکتین استخراجی با روش آنزیمی فاقد فعالیت امولسیفایری بود و به‌نظر می‌رسد آنزیم‌ها در عین

استخراج پکتین، موجب شکستن و تجزیه نسبی آن شده اند. حسینی و همکاران (2016) و Yapo و همکاران (2007) فعالیت امولسیفایری پکتین استخراجی از پالپ چغندرقند و نارنج را به‌ترتیب 40/7 و 47/1% گزارش کردند. بنابراین پکتین استخراجی از ضایعات پوست پرتقال با روش های متداول و اهمی، فعالیت امولسیفایری بیشتری نسبت به پکتین چغندرقند و نارنج داشته‌اند. مطابق جدول 2، پایداری امولسیونی هر دو پکتین استخراجی با روش‌های اهمی و متداول در هر دو دمای محیط و یخچال بیش از 90% بود. بنابراین هر دو پکتین پایداری امولسیونی بیشتری نسبت به پکتین استخراجی از پوست نارنج (89%) و چغندرقند (62%) که توسط حسینی و همکاران (2016) و Huang و همکاران (2001) گزارش شده است، دارند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پکتین استخراجی از ضایعات پرتقال در شرایط اسیدی با استفاده از دو روش اهمی و متداول توانایی تولید و پایدارسازی امولسیون‌های روغن در آب را دارا هستند درحالی که پکتین استخراجی با روش آنزیمی فاقد چنین ویژگی‌ای می‌باشد.

جدول 2- مقایسه فعالیت و پایداری امولسیفایری پکتین استخراجی با روش های مختلف

خصوصیت	فعالیت امولسیفایری	پایداری امولسیفایری			
زمان نگهداری (روز)		1		30	
دما (درجه سانتی‌گراد)	25	4	25	4	25
روش استخراج متداول	65/47 ± 3/47[a]	96/35 ± 1 /27	93/18 ± 0/46	94/50 ± 0/52	91/88± 1/37
روش استخراج اهمی	67/18 ± 3/77 [a]	97 ± 0/32	95/06 ± 1/84	97± 0/63	94/87± 1/59
روش استخراج آنزیمی (آنزیم Rohament)	عدم فعالیت	-	-	-	-

اندازه‌گیری گرانروی پکتین

گرانروی و رفتار جریانی پکتین‌های استخراجی به روش‌های اهمی و متداول در شرایط بهینه (دمای 90 درجه و زمان 30 دقیقه) و پکتین‌های استخراجی با روش آنزیمی در شرایط بهینه (آنزیم سلولاز Rohament CL در غلظت 17/5%، نسبت S/L برابر با 1:40 و زمان 3 ساعت و کمپلکس آنزیم میکروبی *آسپرژیلوس نایجر*) با تهیه محلول 2% پکتین در دمای 25 درجه بررسی شد.

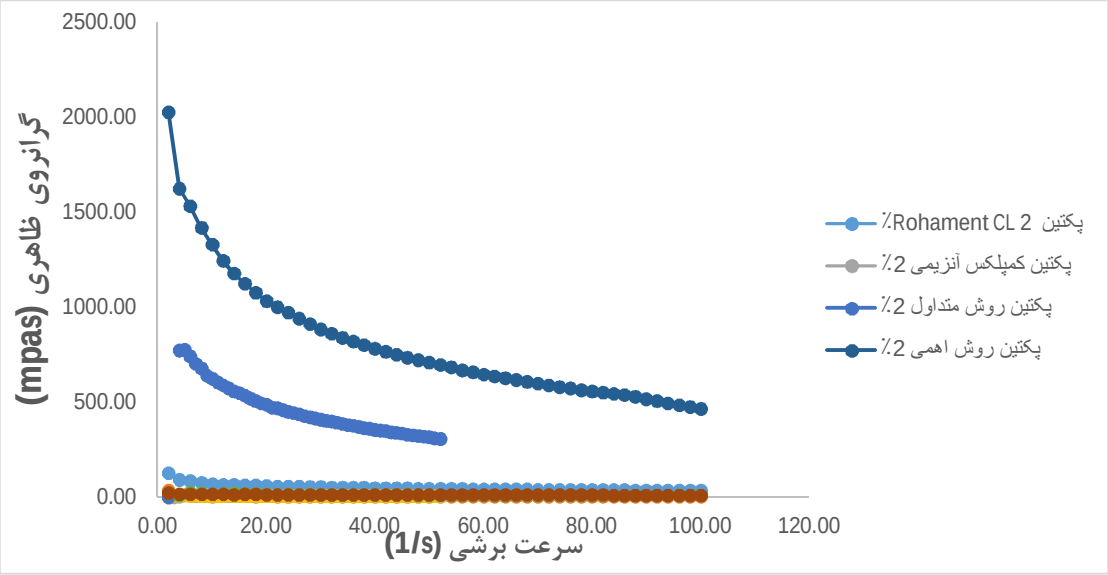
همانطور که در شکل 5 مشاهده می‌شود رفتار محلول پکتین‌های استخراجی با استفاده از روش‌های اهمی و متداول، متفاوت از پکتین‌های استخراجی توسط آنزیم‌ها بود. در غلظت 2% پکتین‌های استخراجی با روش‌های آنزیمی، محلول پکتین رفتار نیوتنی از خود نشان داد که با افزایش نرخ برشی، گرانروی ثابت می‌ماند. اما در غلظت 2% پکتین‌های استخراجی با روش‌های اهمی و متداول، رفتار محلول پکتین از نیوتنی به نرم‌شونده با برش یا شبه پلاستیک تغییر پیدا کرد و با افزایش نرخ برشی، گرانروی کاهش یافت که مشابه نتایج چن و همکاران (2014) بود. چن و همکاران (2014) ویژگی های رئولوژی پکتین استخراجی از *Abelmoschus esculentus* را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که پکتین تهیه شده از این محصول در غلظت کم دارای رفتار جریانی نیوتنی است و با افزایش غلظت، رفتار از نیوتنی به شبه پلاستیک تغییر می‌کند. در واقع گرانروی علاوه بر غلظت، به سرعت برشی نیز وابسته بود. منشا این رفتار شبه پلاستیک آن است که تنش برشی موجب شکستن اینترکشن‌های فیزیکی ضعیف که پلی‌مرهای زیستی را کنار هم نگه می‌دارد، می‌شود (McClements, 2004). در تنش برشی‌های کم، زمان کافی برای این پدیده‌های مولکولی وجود ندارد و بنابراین گرانروی محلول پلیمر زیستی نسبتا بالا است.

مطابق شکل 5، گرانروی ظاهری پکتین‌های استخراجی به روش آنزیمی بسیار کمتر از پکتین‌های استخراجی به روش اسیدی (متداول و اهمی) بود. تغییرات شیمیایی در پکتین نیز می‌تواند موجب ایجاد اثرات متفاوتی بر ویژگی‌های عملکردی آن شود (Liang *et al.*, 2015). وانگ و همکاران (2016) بیان کردند که گرانروی بالاتر پکتین استخراجی از پوست انبه با استفاده از روش متداول نسبت به روش فراصوت، مربوط به وزن مولکولی بالاتر پکتین می‌باشد و نتیجه گرفتند که گرانروی پکتین توسط دو عامل وزن مولکولی و همچنین میزان گالاکتورونیک اسید تحت تاثیر قرار می‌گیرد و هر دو عامل، اثر مثبتی بر گرانروی محلول دارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که غلظت آنزیم، نسبت ماده جامد به حلال و زمان فرآیند تاثیر معنی‌داری با بازده پکتین داشتند و افزایش هر سه متغیر ابتدا موجب افزایش بازده شد و سپس اثر معنی‌داری بر آن نداشت. اگرچه آنزیم سلولاز Rohament به‌طور معنی‌داری موجب افزایش بازده پکتین نسبت به آنزیم Celluclast شد اما بازده آن نسبت به روش‌های استخراج اسیدی کمتر بود. اعمال فرآیند گرمایش اهمی در شرایط اسیدی موجب استخراج بیشترین میزان پکتین از ضایعات پرتقال شد و بعد از آن روش متداول بیشترین بازده پکتین را به‌دست داد. پکتین استخراجی از ضایعات پرتقال در شرایط اسیدی با استفاده از دو روش اهمی و

متداول توانایی تولید و پایدارسازی امولسیون‌های روغن در آب را دارا بودنـد و گرانروی بســیار بالایی را ایجاد کردند درحالی که پکتین اســتخراجی با روش آنزیمی فاقد چنین ویژگی‌هایی بودند. بنابراین روش نوین گرمـایش اهمی و حتی روش متـداول اســیدی موجب اســتخراج پکتین بـا کمیت و کیفیت بهتری نســبت به روش‌های آنزیمی شدند.



شکل 5- رفتار جریانی پکتین‌های استخراجی در شرایط بهینه با استفاده از روش‌های مختلف در غلظت‌های 0/5 و 2%

منابع

Chen, Y., Zhang, J. G., Sun, H. J., & Wei, Z. J. (2014). Pectin from Abelmoschusesculentus: Optimization of extraction and rheological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 498–505.

Cho, H.Y., Yousef, A.E., & Sastry, S.K. (1996). Growth kinetics of lactobacillus acidophilus under ohmic heating. Biotechnology and Bioengineering, 49, 334–340.

de Oliveira, C. F., Giordani, D., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F., & Marczak, L. D. F. (2015). Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *29*, 201-208.

Dominiak, M., Søndergaard, K. M., Wichmann, J., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Meyer, A. S. & Mikkelsen, J. D. (2014). Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, 40: 273-282.

Ebrahimzadeh, M. A., Azadbakht, M. 2006, Pectin extraction and comparison the yield, DE and galacturonic acid from some citruce peel, *Medical Science Journal of Mazandaran*, 16 (54): 52-59.

Fathi, B., Maghsoudloo, Y., Ghorbani, M., Khomeiri, M. 2012, The effect of pH, temperature, and time of acidic extraction on the yield and quality properties of pectin from Nutty Pumpkin, *IFSTRJ*, 22: 465-475.

Guo, X., Han, D., Xi, H., Rao, L., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: a comparison. *Carbohydrate polymers*, *88*(2), 441-448.

Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., & Yarmand, M. S. (2016). Aqueous extraction of pectin from sour orange peel and itspreliminary physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *82*, 920-926.

Huang, X., Kakuda, Y., & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, *15*, 533–542.

Keramat, J., Kabir, Gh., Ghenaati, B. 2002. Investigating the quality and quantity of the pectin extracted from the orange juice concentrate, *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 6 (4): 141-150.

Koubala, B.B., Kansci, G., Mbome, L.I., C, Crepeau, M.J., Thibault, J.F., & Ralet, M.C. (2008). Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from ‘‘Améliorée’’ and‘Mango’ mango peels. *Food Hydrocolloids* 22 (7), 1345–1351.

Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P., & Moontree, T. (2015). Ohmic heating-assisted extraction of anthocyanins from black rice bran to prepare a natural food colourant. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *27*, 102-110.

McClements, D. J. (2004). Food emulsions: Principles, practices, and techniques (2nded.). Boca Raton: CRC Press.

Maran, J. P., Swathi, K., Jeevitha, P., Jayalakshmi, J., & Ashvini, G. (2015). Microwave-assisted extraction of pectic polysaccharide from waste mango peel. *Carbohydrate polymers*, *123*, 67-71.

Mesbahi, Gh., Jamalian, J. 2002, Extraction of the pectin from the root beet waste and investigating its application in the food products, *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 6 (125): 2-13.

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, *11*(3), 266-277.

Ptichkina, N., Markina, O., & Rumyantseva, G. (2008). Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food hydrocolloids*, 22(1): 192-195.

Santos, J. D. G., Espeleta, A. F., Branco, A., & de Assis, S. A. (2013). Aqueous extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate polymers*, *92*(2), 1997-2001.

Sato, M. d. F., Rigoni, D. C., Canteri, M. H. G., Petkowicz, C. L. d. O., Nogueira, A., & Wosiacki, G. (2011). Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivars. *Acta Scientiarum Agronomy*, 33(3): 383-389.

Scott, R. W. (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical chemistry*, *51*(7), 936-941.

Vosoughi, M. 1996. Production and purification of the pectin from apple waste, Research report No. 164, Research Institute of Agricultural Engineering, Iran.

Wai, W. W., Alkarkhi, A. F., & Easa, A. M. (2010). Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and Bioproducts Processing*, *88*(2), 209-214.

Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food chemistry*, *178*, 106-114.

Wang, M., Fan, C., Zhao, K., Huang, B., Hu, H., Xu, X., Pan, S., & Liu, F. (2016). Characterization and functional properties of mango peel pectin extracted by ultrasound assisted citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 794- 803.

Wikiera, A., Mika, M., & Grabacka, M. (2015). Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids*, *44*, 156-161.

Yapo, B. M. (2011). ectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model, *Carbohydrate Polymers,* 86 (2), 373-385.

Yapo, B.M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., & Paquot, M., (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, *100*, 1356–1364.

Yin, Y. g., Fan, X. d., Liu, F. x., Yu, Q. y., & He, G. d. (2009). Fast extraction of pectin from apple pomace by high intensity pulsed electric field. *Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition)*, *5*, 021.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 69- 80

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص.80-69

The comparison between enzymatic, Ohmic and conventional methods on the yield and quality properties of the extracted pectins from orange waste

H. Saberian[1], Z. Hamidi-Esfahani[2*], H. Ahmadi Gavlighi[2], M. Barzegar[2]

Received: 2016.12.18
Accepted: 2017.03.15

Introduction: Ohmic heating or direct resistance heating is one of the several electromagnetic based methods, occurs when alternating electrical current is passed through a conductive material, with the primary purpose of heating it due to the electrical resistance of the foods. There are many applications that can use ohmic treatment technology, such as blanching, evaporation, dehydration, fermentation, extraction, sterilization and pasteurization of foods (Saberian *et al*. 2015; Assiry *et al.* 2010). Pectins are complex heteropolysaccharides, consisting of α-1, 4-linked D-galacturonic acid units and interrupted by L-rhamnose residues with side chains of neutral sugars, mainly L-rhamnose, L-arabinose and D-galactose. In the industrial extraction process, pectin is usually extracted from waste plant material such as citrus peels, apple pomace, sugar beet pulp and sunflower head using hot water (60–100°C) acidified with a mineral acid (such as sulfuric, phosphoric, nitric, hydrochloric) or organic acid (especially citric acid) within the pH of 1.5–3 for 0.5–6 h. The aim of this study was to explore the effect of enzymatic extraction on the yield and quality properties (degree of esterification, Galacturonic acid, emulsifying properties and viscosity) of the pectin, and to compare this pectin with the pectins extracted by ohmic and conventional methods. Finally, the best extraction method was selected.

Materials and Methods: Extraction of pectin was done with the assistance of an ohmic heating system at working frequency of 50 Hz under different parameters including voltage gradient (7-15 V/cm), temperature (50-90°C), and time (5-30 min). Then, the effect of enzyme dose (0-20% v/w) of Celluclast and Rohament CL, solid/liquid ratio (S/L ratio) (1:10 to 1:50 g/ml) and extraction time (1-18 h) on the yield of the extracted pectin from orange waste was investigated.

After the time of extraction (enzymatically, ohmically or conventionally), the sample was cooled to room temperature and centrifuged (10000 rpm, 15 min), and the supernatant was precipitated with two volumes of 96% (v/v) ethanol at 4 °C for 1 h. The precipitated pectin mass was washed twice with 96% ethanol in order to remove impurities. The pectin was dried in a forced circulation oven at 55°C until a constant weight (14 h).

Galacturonic acid content was determined according to Scott (1979) with some modifications. The degree of esterification (DE) of pectin samples was determined by titrimetric method according to Santos et al. (2013).

Emulsifying activity and emulsion stability were measured according to the method described by Yapo et al. (2007).

The viscosity and the flow behavior of the selected pectin solutions (2%, w/v) extracted conventionally and ohmically at 90°C for 30 min (the optimum extraction condition) and the highest pectins extracted enzymatically, were measured at 25°C.

Pectin powder samples were mixed with KBr and pressed into KBr pellets before FTIR analysis. PerkinElmer FTIR spectra (PerkinElmer, Frontier model, USA) was applied at the transmission mode in the frequency range of 4000–400 cm^{-1} at a resolution of 1 cm^{-1}.

Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using SPSS 19 statistical software and the Duncan's test with 95% confidence interval was used to compare the means of the tests. The results which were presented in this research, have been obtained from the average values of the minimal two replicate experiments.

Results and Discussion: first, the effect of enzyme dose, solid/liquid ratio (S/L ratio) and time of extraction on the yield of the extracted pectin from orange waste by using Celluclast and Rohament CL enzymes was studied. Then, the yield, of esterification, galacturonic acid, emulsifying properties and viscosity behavior of the pectins

1 and 2. Ph.D Student and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
(*- Corresponding Author Email: h_zohreh@yahoo.com)

extracted in the optimum condition by enzymes were compared to the extracted pectins by ohmic and conventional methods. Results indicated that the highest yield of pectin was obtained by using Celluclast and Rohament CL enzymes at enzyme doses of 15 and 17.5%, S/L ratio of 1:20 and 1:40 (g/ml) and time of 3 h for both, which were 5.92 and 10.70 %, respectively. The highest yield of pectin by ohmic heating was obtained at the voltage gradient of 15 v/cm, the temperature of 90°C during 30 min (14.33%), which was higher than the amount obtained by conventional method (13.53%) may be due to the electroporation (disruptive pores which were made on the cell membrane by the electric field) (Cho *et al*., 1996). de Oliveira et al. (2015) reported that the moderate electric field (at 45°C, 50 and 100 V) extracted the pectin significantly ($p < 0.05$) more than the conventional extraction. The emulsifying activity of the extracted pectins by ohmic and conventional methods were 65.47 and 67.18%, respectively, although the pectins extracted by enzymatic method had not any emulsifying activity. It seems that during the pectin extraction, enzymes hydrolyzate the pectins. The viscosity of the pectins extracted by ohmic and conventional methods at the concentration of 2% was higher than those obtained from the enzymatic method. Therefore, pectin extracted by ohmic and conventional methods had the highest yield, emulsifying properties, and viscosity.

Keywords: Extraction of pectin Orange waste, Enzymatic method, Ohmic heating, Quality propertie.