مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد اول، شماره سوم، پاییز ۸۸
۳۷-۵۰
www.ejfpp.info

استفاده از آنزیم پکتیناز و تیمار اتانولی در افزایش خلوص و راندمان لیکوپن استخراج شده از پوست گوجه‌فرنگی

*آزاده رنجبر[۱]، یحیی‌مقصودلو[۲]، محمدقربانی[۳] و علیرضا صادقی‌ماهونک[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۷ ؛ تاریخ پذیرش : ۸۹/۵/۱٤

چکیده

لیکوپن رنگ‌دانه طبیعی و غالب در گوجه‌فرنگی است که امروزه سعی در افزایش دست‌یابی به آن از گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های آن می‌باشد. در این پژوهش جهت استخراج لیکوپن ابتدا از پیش تیمار آنزیمی پکتیناز در غلظت‌های ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زمان‌های اثر ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه در دمای ثابت ۵۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سپس قبل از انجام استخراج، نیمی از نمونه‌ها با اتانول ۹٤ درصد در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه شستشو داده شدند. مشاهده شد که تحت این شرایط میزان لیکوپن در اولئورزین با افزایش غلظت آنزیم افزایش می‌یابد و نمونه‌های تیمار شده با اتانول در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده با اتانول به طرز معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۱$). به‌طوری‌که در نمونه‌های تیمار شده با اتانول بیش‌ترین مقدار لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زمان ٦۰ دقیقه به‌مقدار ۱۰۷٤٤/۵ میلی‌گرم رسید در حالی‌که بیش‌ترین مقدار لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین در نمونه‌های تیمار نشده با اتانول در غلظت ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زمان اثر ۱۸۰ دقیقه، برابر با ۳۵۲٤/٦۳ میلی‌گرم می‌باشد. در این حالت راندمان استخراج لیکوپن از ۱۰۰ گرم پوست خشک شده گوجه‌فرنگی به‌ترتیب در نمونه‌های تیمار شده با اتانول و بدون تیمار با اتانول برابر با ۱۰۷٤٤/۵ و ۷۹۳۰/٤۳ میلی‌گرم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: خلوص لیکوپن، اولئورزین، پوست گوجه‌فرنگی، آنزیم پکتیناز، تیمار اتانولی

* مسئول مکاتبه: aranjbar5264@gmail.com

مقدمه

لیکوپن رنگ‌دانه قرمز روشنی است که به بسیاری از میوه‌های رسیده، سبزی‌جات و گل‌ها رنگ می‌دهد. گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های آن منابع اصلی رژیم غذایی این کاروتنوئید هستند، هر چند که این رنگ‌دانه در هندوانه، گواوا، گریپ‌فروت صورتی و در مقادیر کم در حداقل ٤٠ گیاه دیگر نیز یافت می‌شود. تمام کاروتنوئیدها را می‌توان مشتقی از لیکوپن دانست (سوکاسیو، ۲۰۰۸). علاوه‌بر این در سال‌های اخیر نشان داده شده است که در کنار قدرت خنثی کردن اکسیژن یگانه (سونی، ۲۰۰۳) و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی نسبت به بتاکاروتن (۲ برابر بتاکاروتن) و آلفا توکوفرول (۱۰ برابر آلفاتوکوفرول) (شی و همکاران، ۱۹۹۹؛ سالین و همکاران، ۲۰۰٤)، لیکوپن قادر به جلوگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی و انواع سرطان‌های ویژه از جمله پروستات، ریه و معده می‌باشد (اوسیچ و ساندرز، ۱۹۹۷). بنابراین حضور آن در رژیم غذایی مهم می‌باشد. به همین دلیل تقاضا برای مصرف این رنگ‌دانه طبیعی و آنتی‌اکسیدان که دارای ویژگی‌های ضدسرطانی نیز می‌باشد روز به روز در حال رشد است. این امر باعث گرایش به‌سمت استخراج آن از منابع طبیعی مانند گوجه‌فرنگی شده است.

لیکوپن در گوجه‌فرنگی به‌طور غالب در کلروپلاست بافت گیاه وجود دارد و بیوسنتز آن در گوجه‌فرنگی در طول فرآیند رسیدن انجام می‌شود که طی آن کلروپلاست به کروموپلاست تبدیل می‌شود (چودهاری و آنانتاریان، ۲۰۰٦). به‌دلیل پنهان بودن لیکوپن در درون ساختارهای غشایی کلروپلاست و دشواری حلال در نفوذ به بافت فشرده در پوست گوجه‌فرنگی و حل کردن رنگ‌دانه لیکوپن، راندمان استخراج این رنگ‌دانه از پوست گوجه‌فرنگی پایین است (لاوچیا و زورو، ۲۰۰۸). از آنجا که دیواره سلولی از سلولز و پکتین تشکیل شده است، می‌توان با استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی از قبیل سلولاز و پکتیناز، استخراج لیکوپن از بافت گوجه‌فرنگی را تسهیل نمود. از طرفی طبق مطالعات شی و همکاران در سال ۲۰۰۱، پوست و لایه پریکارپ گوجه رسیده حاوی تقریباً ۸۰ درصد از کل مقدار لیکوپن موجود در گوجه رسیده می‌باشد (شی، ۲۰۰۱). در این باره چودهاری و آنانتانارایان (۲۰۰٦) به بررسی تیمار آنزیمی با سلولاز و پکتیناز و دست‌یابی به غلظت بهینه این آنزیم‌ها در استخراج لیکوپن از گوجه‌فرنگی، پوست و ضایعات آن پرداختند. آنها به این نتیجه رسیدند که استفاده از آنزیم پکتیناز برای گوجه‌فرنگی کامل و پوست، و استفاده از آنزیم سلولاز در استخراج لیکوپن از ضایعات مناسب‌تر است. به‌طوری‌که آنزیم پکتیناز باعث افزایش راندمان استحصال لیکوپن (۱۱۰٤ میکروگرم در هر گرم نمونه) از پوست گوجه‌فرنگی می‌شود (چودهاری و آنانتاریان، ۲۰۰٦).

همچنین لاوچیا و زورو (۲۰۰۸) از پیش تیمار آنزیمی سلولاز، پکتیناز و همی‌سلولاز برای افزایش راندمان استخراج لیکوپن از ضایعات گوجه‌فرنگی استفاده کردند. آنها بعد از تیمار یک ساعته با آنزیم‌های ذکرشده، عمل استخراج با هگزان: اتانول: استون از پوست خشک شده گوجه‌فرنگی را انجام داده و توانستند میزان ٤٤٠ میلی‌گرم لیکوپن را از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه استخراج نمایند (لاوچیا و زورو، ۲۰۰۸؛ زورو و لاوچیا، ۲۰۰۸). بورتلیک و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ از یک مرحله شستشو با اتانول جوشان حاوی ۲۸ درصد آب قبل از انجام استخراج لیکوپن از گوجه‌فرنگی استفاده نمودند (بورتلیک و همکاران، ۲۰۰۱). آنها معتقد بودند که شستشو با اتانول باعث حذف کاروتنوئیدهای قطبی، زانتوفیل‌ها و ترکیبات قطبی دیگر از پوست گوجه‌فرنگی می‌شود. به همین دلیل در این مطالعه سعی شده است تا قبل از استخراج لیکوپن از پوست گوجه‌فرنگی، اثر شستشو با اتانول ۹٤ درصد و تیمار آنزیمی در زمان‌های مختلف بررسی و نقش آنها در افزایش غلظت لیکوپن در اولئورزین و همچنین راندمان استخراج از پوست مورد مطالعه قرار گیرد.

استخراج کاروتنوئیدها و به‌ویژه لیکوپن توسط آنزیم به‌طورکلی روش جدیدی است. در منابع موجود بررسی‌های بسیار اندکی در زمینه استخراج لیکوپن از گوجه‌فرنگی و به‌خصوص ضایعات صنعتی آن انجام شده است. بریانت و همکاران در سال ۱۹۹۲ از روش ساده‌ای استفاده کردند که شامل جداسازی و تجزیه کروموپلاست در هویج و سپس استخراج رنگ‌دانه‌های هویج توسط فیلتراسیون ژلی بود (بریانت و همکاران، ۱۹۹۲). آروانتینوس زافیریز و همکاران در سال ۱۹۹۲ از تیمار آنزیمی و سپس حلال هگزان برای استخراج رنگ‌دانه از پوست پرتقال استفاده نمودند (آروانتینوس زافیریز و همکاران، ۱۹۹۲). در سال ۱۹۹۵ بریتون و همکاران از هیدرولیز آنزیمی توسط کلسترول استراز و لیپاز برای هیدرولیز استرهای کاروتنوئیدی استفاده نمودند (بریتون و همکاران، ۱۹۹۵). دلگادو وارگاس و پاردس لوپز نیز در سال ۲۰۰۲ از تریپسین، پپسین و پاپایین برای استخراج کاروتنوپروتئین‌ها از ضایعات میگوی قهوه‌ای استفاده کردند (دلگادو وارگاس و پاردس لوپز، ۱۹۹۷a؛ دلگادو وارگاس و پاردس لوپز، ۱۹۹۷b). همان‌طور که ذکر شد، تنها دو مورد استفاده از آنزیم پکتیناز برای افزایش راندمان استخراج لیکوپن از گوجه‌فرنگی و ضایعات آن وجود دارد که نتایج دقیق آن در مورد میزان حضور لیکوپن در اولئورزین و راندمان استخراج لیکوپن از پوست گوجه‌فرنگی وجود ندارد. از طرفی تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است که اثر افزودن تیمار شستشو با اتانول که توسط بورتلیک و همکاران انجام شده است، خلوص لیکوپن در اولئورزین را بررسی نماید. به همین دلیل در این مطالعه سعی

شده است تا به بررسی اثر غلظت آنزیم و همچنین تیمار اتانولی بـر غلظـت لیکـوپن در اولئـورزین و همچنین راندمان استخراج آن از پوست گوجه‌فرنگی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

مواد: گوجه‌های رسیده تازه از کارخانه رب کامنوش واقع در تقی‌آباد استان گلستان تهیه و پوست آنها به‌طور دستی از گوجه کامل جدا و جمع‌آوری شد. در ایـن مطالعـه از آنـزیم پکتینـاز Panzym BE شرکت Begrow ایتالیا استفاده شد. حلال‌های به‌کار رفته نیز عبارت بودند از استون و اتانول ساخت ایران و هگزان Scharlow کشور اسپانیا که خلوص آنها به‌ترتیب ۹۸، ۹٦ و ۹۸ درصد بود.

روش‌ها:

آماده‌سازی نمونه و تعیین ویژگی‌ها: میوه‌های رسیده گوجه‌فرنگی به‌مدت ۲-۱ دقیقـه در آب جـوش فرو برده و بعد از آن به سرعت سرد و با دست پوست‌گیری شدند (چودهاری و آنانتاریان، ۲۰۰٦).

تعیین دامنه غلظت اثر آنزیم در پوست گوجه‌فرنگی: قبل از افزودن آنزیم به نمونه‌های پوست، ابتـدا غلظت مناسب آنزیم برای آنها محاسبه شد. به‌این‌ترتیب که ابتدا غلظت‌های ۲۵ تـا ٤۰ میلـی‌گـرم بـر کیلوگرم از آنزیم مایع که در مقداری آب معادل با وزن نمونه‌ها حل شده بود، به ۵ نمونـه ۲ گرمـی از پوست گوجه‌فرنگـی اضـافه‌شـد و بـه‌ترتیـب در زمـان‌هـای ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقـه از آنهـا نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها توسط کاغذ صافی صاف شده و به عصاره صاف شده به مقدار ۲:۱ (عصاره: الکل- اسید) از الکل: اسید کلریدریک با نسبت ۵:۹۵ به آرامی اضافه شد. سپس به‌مـدت ۵ دقیقـه بـه عصاره‌ها فرصت داده شد. طی این فاصله هاله پکتین در نمونه‌هایی که آنزیم بر پکتین اثر نگذاشته بود مشاهده شد. هاله پکتین در اثر اسیدکلریدریک و اتانول به‌صورت نامحلول برروی مایع جدا شده قرار می‌گیرد و به‌راحتی با چشم قابل مشاهده است. اگر پکتین توسط آنزیم به‌صورت محلول تبـدیل شـده باشد این هاله بسیار ضعیف و حتی نامعلوم خواهد بود. زیرا پکتین در اثر آنزیم از حالت نامحلول بـه حالت محلول تبدیل می‌شود. بعد از بررسی تمام نمونه‌ها، بهترین دامنه استفاده از آنزیم، همان دامنه‌ای انتخاب شد که توسط شرکت سازنده برای استفاده در شکستن پکتین در گوشت خـرد شـده میـوه‌هـا یعنی ۲۵ تا ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، پیشنهاد شده بود. بنابراین نمونه‌ها طبق آن آنزیم‌زنی شدند.

افزودن آنزیم و گرم‌خانه‌گذاری: ۱۰۰ گرم از نمونه‌های پوست گوجه‌فرنگی خرد شده با رطوبت ۵ درصد، به ۵ قسمت مساوی ۲۰ گرمی تقسیم‌شدند. به‌ترتیب به نمونه‌ها دامنه غلظت تعیین شده برای آنزیم پکتیناز مورد استفاده که در قسمت بالا اشاره شده است، اضافه شد و در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. همان‌گونه که ذکر شد، جهت توزیع مناسب آنزیم، این حجم از آنزیم در مقدار آب معادل با وزن نمونه حل شده و به‌طور منظم طی گرم‌خانه‌گذاری هم زده می‌شد. به‌منظور بررسی اثر زمان اثر آنزیم بر میزان استخراج لیکوپن، نمونه‌ها با فواصل زمانی ذکرشده، از گرم‌خانه خارج و بعد از آن آنزیم در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه غیرفعال شد (شی، ۲۰۰۱).

پیش‌تیمار اتانولی: نمونه‌های آنزیم‌زنی شده به دو قسمت تقسیم‌شدند. یک قسمت به‌عنوان تیمار بدون اتانول در نظرگرفته و خشک شدند و قسمت دوم در مقدار مساوی وزنی/ وزنی اتانول ۹٤ درصد با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۵ ثانیه قرارداده‌شده و بعد از آن در آون (آون Memert آلمان) تحت دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به رطوبت ثابت خشک شدند.

فرآیند استخراج لیکوپن: بعد از خشک کردن تمامی نمونه‌های ذکرشده، به‌مقدار ۲ گرم از هر نمونه تهیه و در ظروف شیشه‌ای ریخته شدند. این ظروف جهت جلوگیری از ورود نور با فویل آلومینیومی کاملاً پوشیده شده بودند. عمل استخراج توسط حلال استون: اتانول: هگزان (۱: ۱: ۲) به نسبت ۱: ۱۰ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌همراه هم زدن آرام و به‌مدت ١٦ ساعت انجام شد (سدلر و همکاران، ۱۹۹۰؛ شی و همکاران، ۱۹۹۹). به‌منظور جلوگیری از اکسیداسیون لیکوپن در طول استخراج، از ۵ درصد وزنی/ وزنی BHT استفاده‌شد. بعد از گذشت ١٦ ساعت، نمونه‌ها توسط کاغذ صافی واتمن شماره ٤ که توسط اتانول اشباع شده بودند، صاف شدند. سپس به‌مقدار ۲۰ درصد حجم حلال مورد استفاده آنها ، آب مقطر به دیونیزه اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه به حال خود باقی ماندند تا به دو فاز آلی و آبی تقسیم شوند. فاز بالایی فاز غیرقطبی و حاوی لیکوپن و فاز پایینی فاز آبی می‌باشد که دور ریخته شده و فاز بالایی جهت استحصال لیکوپن جداسازی می‌شود (سدلر و همکاران، ۱۹۹۰؛ شی و همکاران، ۱۹۹۹). در مرحله بعد حلال توسط جریان هوا از ماده استخراجی جدا شد. یک نمونه شاهد (بدون تیمار آنزیمی) نیز به همین ترتیب استخراج شد تا تفاوت بین مقدار الئورزین و لیکوپن مقایسه شود.

محاسبه مقدار لیکوپن: روش محاسبه لیکوپن، استفاده از اسپکتروفتومتر می‌باشد (لاوچیا و زورو، ۲۰۰۸؛ چودهاری و آنانتاریان، ۲۰۰٦). جذب لیکوپن در هگزان دارای سه پیک در ٤٤۵ نانومتر، ٤۷۲

نانومتر و ۵۰۳ نانومتر می‌باشد که به‌منظور حداقل کردن دخالت سایر کاروتنوئیدها و اندازه‌گیری مقدار کل لیکوپن تمام ترانس، اندازه‌گیری در طول موج ۵۰۳ نانومتر (λ_{Max}) در حلال هگزان انجام شد (لاوچیا و زورو، ۲۰۰۸؛ چودهاری و آنانتاریان ، ۲۰۰٦). مقدار لیکوپن تمام ترانس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instruments Ltd ،UV/VIS T80) طبق فرمول زیر بر حسب میلی‌گرم و با استفاده از ضریب خاموش‌سازی[1] ویژه ($E_{1cm}^{1\%}$) محاسبه شد (چودهاری و آنانتاریان، ۲۰۰٦):

$$\text{Lycopene (mg)} = A \times dil \times ml \times 10 / E^{1}_{cm1\%} \quad (۱)$$

که در آن، A: جذب محلول در کووت ۱ سانتی‌متر؛ dil: فاکتور رقیق‌سازی؛ ml: حجم نهایی نمونه؛ و $E_{1cm}^{1\%}$: ضریب خاموش‌سازی ویژه برای لیکوپن در هگزان و معادل ۳٤۵۰ می‌باشد (لو. سی. اچ و همکاران، ۲۰۰۹).

تعیین راندمان استخراج لیکوپن: راندمان استخراج لیکوپن براساس فرمول زیر برحسب میلی‌گرم از ۱۰۰ گرم نمونه محاسبه‌شد.

$$\text{Yield (mg/100g)} = [(C \times m)/M] \times 100 \quad (۲)$$

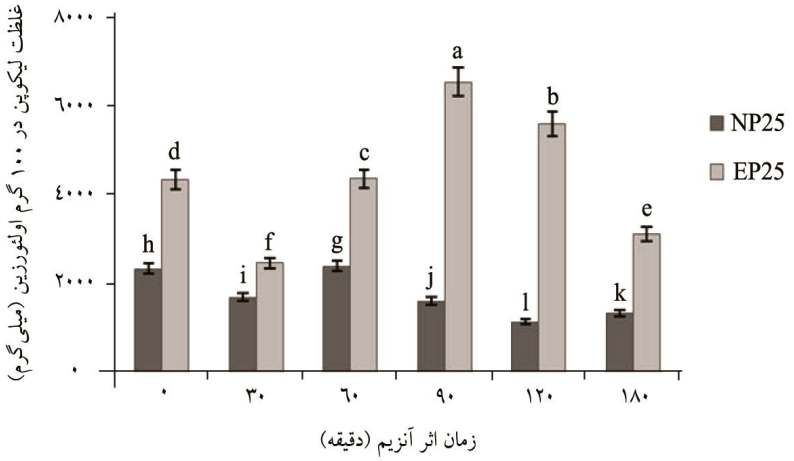
که در آن، C: مقدار لیکوپن استخراج شده (میلی‌گرم)، m: وزن اولئورزین استخراج شده (گرم)، M: وزن نمونه پوست یا ضایعات خشک‌شده گوجه‌فرنگی.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها توسط SAS و SPSS به‌صورت طرح One-way ANOVA آنالیز شدند و برای بررسی بهترین ترکیب و آزمون‌های مقایسات زوجی از LSD و دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. تمام تیمارها در سه تکرار و رسم گراف‌ها توسط نرم‌افزار Excel انجام شد.

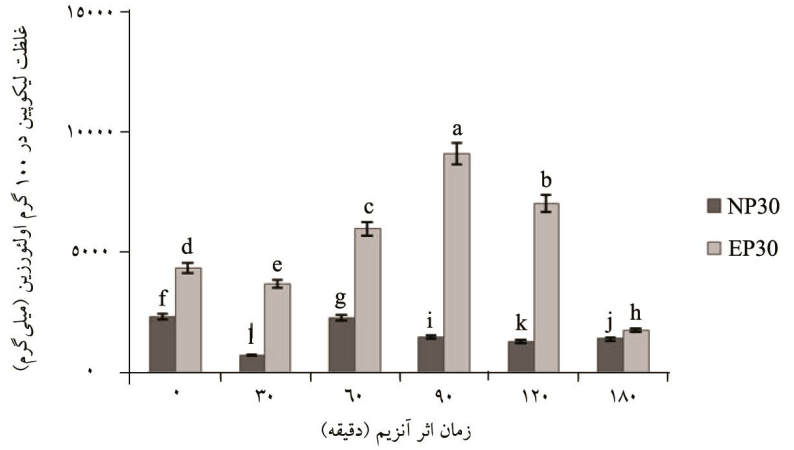
نتایج و بحث

غلظت لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین استخراج‌شده از پوست گوجه‌فرنگی: در نمودار ۱ تا ٤ مقدار لیکوپن استخراج شده از پوست گوجه‌فرنگی بر مبنای ۱۰۰ گرم وزن اولئورزین نمایش داده شده است. در جدول‌های ۱ و ۲ نیز راندمان استخراج لیکوپن از ۱۰۰ گرم پوست خشک شده گوجه‌فرنگی که به‌ترتیب با آنزیم و آنزیم- اتانول تیمار شده‌اند نشان داده می‌شود.

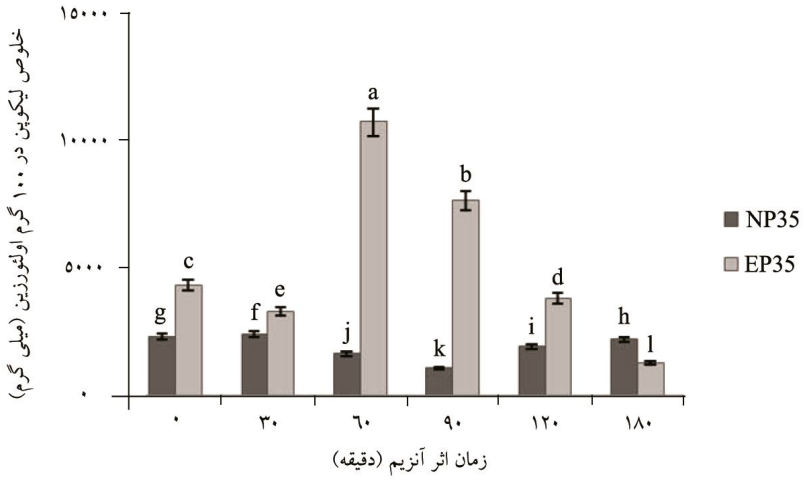
1- Extinction



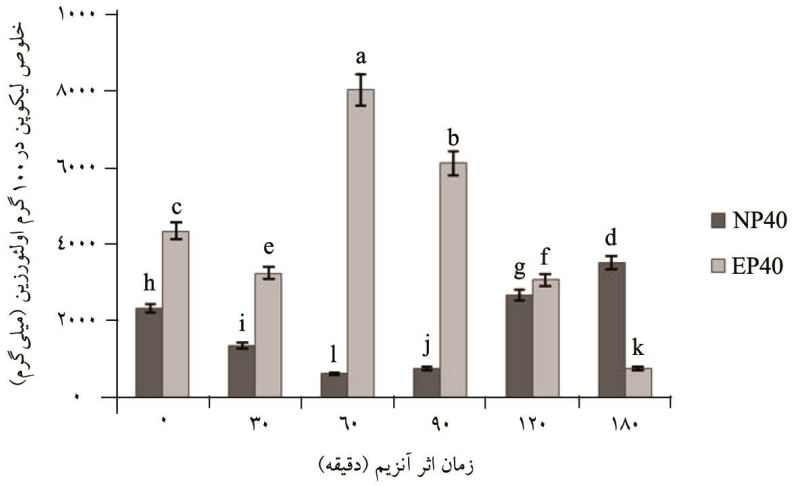
نمودار ۱- مقایسه اثر تیمار اتانولی و غیراتانولی بر غلظت لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین حاصل از نمونه‌های پوست گوجه‌فرنگی تیمار شده با ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم پکتیناز در زمان‌های مختلف اثر آنزیم.



نمودار ۲- مقایسه اثر تیمار اتانولی و غیراتانولی بر غلظت لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین حاصل از نمونه‌های پوست گوجه‌فرنگی تیمار شده با ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم پکتیناز در زمان‌های مختلف اثر آنزیم.



نمودار ۳- مقایسه اثر تیمار اتانولی و غیراتانولی بر غلظت لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین حاصل از نمونه‌های پوست گوجه‌فرنگی تیمار شده با ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم پکتیناز در زمان‌های مختلف اثر آنزیم.



نمودار ٤- مقایسه اثر تیمار اتانولی و غیراتانولی بر غلظت لیکوپن در ۱۰۰ گرم اولئورزین حاصل از نمونه‌های پوست گوجه‌فرنگی تیمار شده با ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم پکتیناز در زمان‌های مختلف اثر آنزیم.

همان‌گونه که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت آنزیم، مقدار لیکوپن استخراج شده از پوست در هر دو نمونه تیمار شده با اتانول و بدون تیمار اتانولی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<۰/۰۱$) که این مطابق با نتایج لاوچیا و زورو (۲۰۰۸) و چودهاری و آنانتاریان (۲۰۰٦) است. اما مقدار این افزایش در نمونه‌های تیمار شده با اتانول بیشتر است و همان‌طوری‌که در نمودارها دیده می‌شود، تیمار اتانولی به شکل بارزی باعث افزایش غلظت لیکوپن در اولئورزین می‌شود ($P<۰/۰۱$). این پدیده مطابق با نظریه بورتلیک و همکاران (۲۰۰۱) است. آنها معتقد بودند که اتانول می‌تواند ترکیبات قطبی از قبیل کاروتنوئیدهای قطبی و زانتوفیل‌ها و آفت‌کش‌ها را در خود حل کند و به این ترتیب این ترکیبات مزاحم در زمان استخراج لیکوپن وارد اولئورزین نمی‌شوند. همچنین طبق نظریه سالتویت (۱۹۸۹)، با کمک تیمار اتانول جوشان ترکیبات محبوس در ترکیبات دیواره سلولی از جمله قندها، اسیدها، لیپیدهای غشا از شبکه دیواره خارج می‌شوند. سالتویت معتقد بود که اتانول قادر به دناتوره کردن پروتئین‌های دیواره سلولی نیز می‌باشد. این دناتوره شدن قابلیت انحلال این پروتئین‌ها را افزایش می‌دهد (سالتویت، ۱۹۸۹). به این ترتیب به راحتی در اثر شستشو با آب از ماده استخراجی خارج شده و وارد اولئورزین می‌شوند. این فرضیه با پژوهش والیزوفسکی و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. آن‌ها برای استخراج وانیلین از دانه وانیل، ابتدا آن را به‌مدت ۰، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت در اتانول ۵ درصد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس با کمک تیمار آنزیمی عمل استخراج را انجام دادند و میزان آزادسازی قندهای احیا و گلوکز تحت تیمار اتانولی را مورد بررسی قرار دادند. آنها به این نتیجه رسیدند که تیمار اتانولی قادر به افزایش رهاسازی قندهای احیا و گلوکز است و این قدرت با افزایش زمان خیساندن افزایش می‌یابد (والیزوفسکی و همکاران، ۲۰۰۷). این پدیده باعث افزایش غلظت لیکوپن در حجم معینی از اولئورزین می‌شود. به‌طورکلی می‌توان گفت که در مورد نمونه‌های تیمار شده با آنزیم، غلظت ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم و زمان اثر ۱۸۰ دقیقه برای به‌دست آوردن بیش‌ترین مقدار لیکوپن یعنی مقدار ۳۵۲٤/٦٤ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم اولئورزین بهترین حالت است و در مورد نمونه‌های تیمار شده با آنزیم و اتانول بیش‌ترین مقدار لیکوپن یعنی ۱۰۷٤٤/۵ میلی‌گرم/ ۱۰۰ گرم اولئورزین، از غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم در زمان ٦۰ دقیقه به‌دست می‌آید.

راندمان استخراج لیکوپن از ۱۰۰ گرم نمونه پوست گوجه‌فرنگی: مقدار اولئورزین استخراج شده از ۱۰۰ گرم نمونه پیش‌تیمار شده، به‌صورت راندمان استخراج لیکوپن از پوست خشک شده گوجه‌فرنگی در جدول‌های ۱ و ۲ نمایش داده شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، در مورد

نمونه‌های بدون تیمار اتانولی، بیش‌ترین راندمان استخراج لیکوپن از ۱۰۰ گـرم نمونـه را مـی‌تـوان در غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنزیم و زمان اثر ۱۸۰ دقیقه و به‌مقدار ۷۹۳۰/٤۳۵ میلی‌گرم بـه‌دسـت آورد. در حالی‌که در مورد نمونه‌های تیمار شده با اتانول، ترتیب بـیش‌تـرین مقـدار یعنـی ۱۰۷٤٤/۵۷ میلی‌گرم از۱۰۰ گرم نمونه در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در زمان ٦٠ دقیقه به‌دست آمد.

جدول ۱- راندمان استخراج لیکوپن از پوست گوجه‌فرنگی تیمار شده با آنزیم در زمان‌های مختلف (میلی‌گـرم/ ۱۰۰ گرم نمونه).

مقدارآنزیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) / زمان اثر آنزیم (دقیقه)	۲۵	۳۰	۳۵	٤٠
۰	۳۷۱۳/۰٤۳^{k}	۳۷۱۳/۰٤۳^{k}	۳۷۱۳/۰٤۳^{k}	۳۷۱۳/۰٤۳^{k}
۳۰	۲۱۷٦/۹٤۳^{s}	۱۰٦۸/۳۲۳^{u}	٤۱۰۱/۵۷۳^{g}	۲۸٤۸/٦۹٦^{q}
٦٠	٤۷٦٠/۸۷^{e}	٤٤۳٤/۷۸۳^{f}	۳۷۸٦/۹۵۷^{j}	۱۵۷۸/۲٦۱^{t}
۹٠	٤٠۵۲/۱۵^{h}	۳۸۳٠/٤۳۵^{i}	۳٠٤۳/٤۷۸^{o}	۲۳۲٦/٠۸۷^{r}
۱۲٠	۳٠٤۳/۱۱٤^{p}	۳۳٠۵/۵٤۷^{m}	٤۸۸٦/۹۵۷^{d}	٦٠۱۳/٠٤۳^{b}
۱۸٠	۳۲۷۳/٤۱۱^{n}	۳۳۳۹/۱۳^{l}	۵٠٤٠/۷٤۱^{c}	۷۹۳٠/٤۳۵^{a}

اعدادی که دارای حروف غیر مشابه هستند، اختلاف معنی‌دار دارند

جدول ۲- راندمان استخراج لیکوپن از پوست گوجه‌فرنگی تیمارشـده بـا آنـزیم و اتـانول در زمـان‌هـای مختلـف (میلی‌گرم/ ۱۰۰ گرم نمونه).

مقدارآنزیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) / زمان اثر آنزیم (دقیقه)	۲۵	۳۰	۳۵	٤٠
۰	۵٦٤۳/٤۷۸^{r}	۵٦٤۳/٤۷۸^{r}	۵٦٤۳/٤۷۸^{r}	۵٦٤۳/٤۷۸^{r}
۳٠	۵۷۵٦/۵۲۲^{q}	۷۷۳۳/٤۷۸^{h}	٦٦۲٦/٠۸۷^{k}	٦۱۵۹/۱۵۱^{p}
٦٠	۸٠۵۲/۱۵^{f}	۸۳۵٠^{d}	۱٠۷٤٤/۵۷^{a}	٦٤۱۵/۱۲۳^{o}
۹٠	٦۵٤۸/۱۳۷^{m}	۸٦۲٦/٠۸۷^{c}	۸٠۳٤/۷۸۳^{g}	۷۳۲۳/۹۱۳^{i}
۱۲٠	۸۱۳٠/٤۳۵^{e}	۱٠۵٠۲/۸٤^{b}	٦۸۷۳/۹۱۳^{j}	٦٦۱۳/٠٤۳^{l}
۱۸٠	٦۵٠٦/۵۲۲^{n}	۵۵٠٤/۳٤۸^{s}	٤٤۸۲/٦٠۹^{t}	۳٠۱۲/۷۳۹^{u}

اعدادی که دارای حروف غیر مشابه هستند، اختلاف معنی‌دار دارند

این نتایج نشان می‌دهند که در صورت استفاده از تیمار اتانولی، می‌توان در غلظت و زمان اثر کمتر آنزیم، مقدار لیکوپن بیش‌تری در ۱۰۰ گرم اولئورزین به‌دست آورد. این موضوع با توجه به قیمت آنزیم و سرعت بخشیدن به استخراج لیکوپن در مقیاس انبوه و همچنین قابلیت بازیافت مجدد اتانول، از نظر اقتصادی قابل‌توجه است.

نتیجه‌گیری

با انجام این پژوهش این امکان به‌وجود آمد تا میزان آنزیم مصرفی و زمان بهینه اثر آن بر بیش‌ترین استخراج اولئورزین و لیکوپن برروی گوجه‌فرنگی‌های بومی بررسی شود. به‌طوری‌که در مقایسه با موارد انجام شده توسط آنانتاریان و چودهاری (۲۰۰٦) که میزان w/w ٤-۰/۵ درصد آنزیم پکتیناز با زمان اثر ۱۵ دقیقه را برای استخراج به‌کار برده و توانستند به‌میزان ۲۰٦ درصد یعنی به میزان ۱۱۰٤ میکروگرم بر گرم لیکوپن استخراج نمایند، در این پژوهش در صورت استفاده از آنزیم به تنهایی، در غلظت ٤۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه راندمان استخراج لیکوپن به ۷۹۳۰/٤۳۵ میلی‌گرم از هر ۱۰۰ گرم نمونه می‌رسد در حالی‌که در صورت استفاده از تیمار اتانولی و آنزیمی، این مقدار در غلظت و زمان اثر کمتر آنزیم یعنی ۳۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم و ٦۰ دقیقه به ۱۰۷٤٤/۵۷ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم می‌رسد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در صورت استفاده از تیمار اتانولی هم می‌توان مقدار مصرف آنزیم و هم‌زمان اثر آن را کاهش داد و به این ترتیب در صورت صنعتی شدن، زمان تولید را کاهش داد. از طرفی اتانول بعد از مصرف مجدداً قابل بازیافت است که این موضوع نیز می‌تواند برای صنعت مقرون به صرفه باشد. از طرفی با این پژوهش نشان داده شد که در صورت صنعتی شدن استخراج لیکوپن از پوست گوجه‌فرنگی به‌وسیله تیمار آنزیمی پکتیناز، گوجه‌فرنگی‌های کاشته شده در ایران گزینه بسیار خوبی می‌توانند باشند. بر این اساس استفاده از آنزیم پکتیناز و تیمار اتانولی باعث افزایش راندمان استخراج لیکوپن و خلوص آن در اولئورزین به‌دست آمده می‌شود.

سپاسگزاری

در این‌جا لازم است که از عوامل و کارکنان کارخانه کامنوش به‌دلیل کمک‌های بی‌دریغ‌شان، سپاسگزاری نمائیم.

منابع

Aravantinos-Zafiris, G., Oreopoulou, V., Tzia, C., and Thomopoulos, C.D. 1992. Utilization of orange by-products-orange peel carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59: 77-79.

Ausich, R.L., and Sanders, D.J. 1997. Process for the isolation and purification of lycopene crystals. United States Patent 5858700.

Bortlik, K., Mortezavi, L., and Saucy, F. 2001. A process for the extraction of lycopene. United States Patent 038443.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. 1995. Carotenoids. Basel, Boston, Birkhauser Verlag.

Bryant, J.D., Mc Cord, J.D., Unlu, L.K., and Erdman, J.W. 1992. Isolation and partial characterization of alpha-carotene-containing and beta-carotene-containing Carotenoprotein from carrot (*daucus-carota* L.) root chromoplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 545-549.

Choudhari, S.M., and Ananthanarayan, L. 2006. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, 102: 77-81.

DelgadoVargas, F., and ParedesLopez, O. 1997a. Enzymatic treatment to enhance carotenoid content in dehydrated marigold flower meal. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50: 163-169.

DelgadoVargas, F., and ParedesLopez, O. 1997b. Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (Tagetes erecta). *Food Chemistry*, 58: 255-258.

Delgado-Vargas, F., and Paredes-López Andreeva, O. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton, Florida, Pp: 44-71.

Jannat, M., N-Gutie´rrez, R., and Dolores Luque de Castro, M. 2007. Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 2. 8.

Lavecchia, R., and Zuorro, A. 2008. Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes. *European Food Research and Technology*, 228: 1. 153-158.

Lu, C.H.J., Engelmann, N., Ann Lila, M.W., and Erdman, Jr.J. 2009. Optimization of lycopene extraction from tomato cell suspension culture by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 17. 7710-7714.

Sadler, G., Davis, J., and Dezman, D. 1990. Rapid Extraction of Lycopene and β-Carotene from Reconstituted Tomato Paste and Pink Grapefruit Homogenates. *Journal of Food Science*, 55: 5. 1460-1461.

Sahlin, E., and Savage, G.P., and Lister, C.E. 2004. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 635-647.

Saltveit, M.Jr. 1989. Effect of alcohols and their interaction with ethylene on the ripening of epidermal pericarp discs of tomato fruit. *Plant Physiology*, 90: 167-174.

Shi, J., Maguer, M.L., Kakuda, Y., Liptay, A., and Niekamp, F. 1999. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Research International*, 32: 15-21.

Shi, J. 2001. Separation of carotenoids from fruits and vegetables. WO/2001/079355.

Socaciu, C. 2008. Food colorants chemical and functional properties. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton, 652p.

Soni, J. 2003. Separation of carotenoids from fruits and vegetables. US2003/0180435.

Waliszewski, A.K., Ovando, S., and Pardio. V. 2007. Effect of hydration and enzymatic pretreatment of vanilla beans on the kinetics of vanillin extraction. *Journal of Food Engineering*, 78: 1267-1273.

Zuorro, A., and Lavecchia, R. 2008. Process for the extraction of lycopene. WO/2008/055894.

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

EJFPP., Vol. 1 (3): 37-50
www.ejfpp.info

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

The Use of pectinase and ethanol treatment for lycopene purity and yield enhacement extracted from tomato peel

***A. Ranjbar[1], Y. Maghsoudlou[2], M. Ghorbani[3] and A.R. Sadeghi Mahounak[3]**

[1]M.Sc. Student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Lycopene is a natural and dominant pigment in tomato which today its extraction enhancement from tomato and tomato products is trying. In this study at first wed use pectinase at 25, 30, 35 and 40 ml/Kg concentration at 0, 30, 60, 90, 120 and 180 effecting time in 55 ^{0}C constant temperature incubation. Then before extraction half of samples were washed with 94% ethanol at 60 ^{0}C for 5 second. It has been shown that in these conditions lycopene concentration in oleoresins enhances with enzyme concentration and lycopene drived from ethanol treated samples were higher than samples untreated with ethanol ($P<0.01$). In samples treated with ethanol maximum lycopene in 110 g oleoresin was 10744.5 mg at 35 ml/Kg at 60 min whereas in samples untreated with ethanol lycopene concentration was 3524.63mg/ 100g oleoresin at 40ml/Kg at 180 min. Lycopene extraction yield from 100 g dried tomato peel in these conditions were 10744.5 and 7930.43 in samples treated and untreated with ethanol, respectively.

Keywords: Lycopene purity; Oleoresin; Tomato peel; Pectinase enzyme; Ethanolic treatment

* Corresponding Author; Email: aranjbar5264@gmail.com