دراسة قابلية استهلاك البكتين المستخلص من قشور بعض الفواكه من قبل العزلة المحلية *Aspergillus sp.*

أسوان حمد الله البيار* تغريد إبراهيم خليل نادية نايف هجو*** ورود فوزي احمد****

*أستاذ مساعد - قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة بغداد .
** مهندس زراعي .
***أستاذ مساعد - قسم الثروة الحيوانية - كلية الزراعة - جامعة بغداد .

المستخلص

استخدم البكتين المستخلص من قشور النارنج وقواعد زهرة الشمس بطريقتي الاستخلاص المائي والكحولي في تنمية العفن المعزول محلياً *Aspergillus spp.* إذ حل محل السكروز مصدرا كاربونياً وحيداً في الوسط الغذائي Czapek-Dox والمتكون من $NaNO_3$ 0.2%، $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%، K_2HPO_4 0.1%، KCl 0.05%، $FeSO_4.7H_2O$ 0.001%، بطريقة تخمرات الحالة الصلبة بهدف انتاج أنزيم البولي كالاكتورونيز لتحليل البكتين المستخدم مصدراً كاربونياً، وقدرت فعالية انزيم البولي كالاكتورونيز في الأوساط الحاوية على انواع مختلفة من مستخلص البكتين المائي والكحولي من قشور النارنج وقواعد زهرة الشمس ووجد انه عند استخدام البكتين المستخلص من النارنج في وسط الانتاج ان اعلى فعالية تم الحصول عليها هي 51.56 وحدة /مل للنموذج O3 وباستخدام بكتين قواعد زهرة الشمس كمادة اساس لعمل الأنزيم، اما عند استخدام البكتين المستخلص من قواعد زهرة الشمس بلغت اعلى فعالية للأنزيم 94.375 وحدة/مل للنموذج O2 وباستخدام بكتين النارنج كمادة اساس لعمل الأنزيم. كما درست الخصائص المظهرية للبكتين المستخلص بالطريقتين المائية والكحولية ودراسة لزوجته النسبية ووجد ان اعلى لزوجة قد حققها البكتين المستخلص بالطريقة المائية من قواعد زهرة الشمس وافضل خصائص مظهرية كانت للبكتين المستخلص بالطريقة الكحولية من قواعد زهرة الشمس، وهذا يعني تفوق بكتين زهرة الشمس على بكتين النارنج من حيث الخصائص الفيزيائية.

الكلمات المفتاحية: البكتين ، المستخلص المائي ، المستخلص الكحولي ،قشور الحمضيات، Aspergillus .

المقدمة

إن قشور بعض الفواكه تمثل نصف كتلة الفاكهة وبسبب الأهمية الايجابية لانتاج العصير فان القشور تشكل مخلفات كبيرة للبيئة، لذا كان من الضروري ايجاد وسيلة مناسبة للتخلص من القشور بانتاج مواد مفيدة (Liu وآخرون ،2006). تحتوي الفواكه على كميات مختلفة من البكتين فالحمضيات والبرتقال والتفاح تحتوي على كميات من البكتين اكثر من الفواكه الطرية مثل العنب والتوت والفراولة، فتصل نسبة البكتين في قشور الحمضيات الى 30% والتفاح 1-1.5% والمشمش 1% والتوت 0.4%(Srivastava وMalviya،2011). ان عملية استخلاص البكتين هي عملية فيزيوكيميائية متعددة المراحل والتي فيها يحدث تحليل واستخلاص جزيئات البكتين من النسيج النباتي وتحدث الإذابة تحت تأثير عدة عوامل وبشكل رئيسي درجة الحرارة و pH والوقت (Pagan وآخرون،2001 ؛ Pinheiroوآخرون،2008).

- - - - - - - - - - - - - - -

تاريخ استلام البحث 29 / 5 / 2013 .

تاريخ قبول النشر 22 / 9 / 2013 .

لقد استخدمت العديد من المخلفات التصنيعية والنواتج العرضية لبعض الصناعات كمواد اولية لانتاج الأنزيمات بطريقة تخمرات الحالة الصلبة مثل باجاس البرتقال (Martins وآخرون ، 2000) وباجاس قصب السكر (Silva وآخرون، 2002)، وتعرف تخمرات الحالة الصلبة بانها تلك العمليات التي يحدث فيها نمو مايكروبي وتكوين المركبات على سطح المواد الصلبة بغياب الماء الحر، وبهذا المقدار من الماء المتوفر في الانتاج الحيوي فان معظم الأحياء المستخدمة هي من الأعفان (Pandey وآخرون، 2000 ؛ Zhen وShetty،2000). هناك نوعان من الأنزيمات المحللة للبكتين الحامضية والقاعدية وتستخدم الحامضية منها في المجال الصناعي في استخلاص وتنقية عصائر الفواكه (Rombouts و Pilnik ،1986) ، بينما تستخدم الأنزيمات القاعدية في ازالة الأصماغ من الألياف (Cao وآخرون،1992).

البكتين هو احد مكونات جدار الخلية متعددة الوظائف فضلاً عن كونه مكونا غذائيا ذا قيمة وظيفية عالية ومصدراً للألياف الغذائية. ينتج بشكل مسحوق ذي لون ابيض او بني يستخلص بشكل رئيسي من الحمضيات، ويستعمل البكتين بشكل اساسي في صناعة الأغذية عامل لتكوين الجل للمربيات وانواع الجلي والأغذية الأخرى(El-Nawawi وHeinkel ،1997؛ Srivastava وMalviya،2011) . ان درجة الأسترة Degree of Esterification(DE) تمثل معدل وحدات حامض galacturonic المؤسترة الى وحدات حامض galacturonic الكلية في الجزيئة الواحدة (Kopjar وآخرون،2009). ان المصادر المستخدمة لاستخلاص البكتين للأغراض التجارية لازال محوداً بسبب اعتماد مقدرة البكتين على تكوين الهلام على الوزن الجزيئي ودرجة الأسترة (DE)،فالبكتين المستخلص من مصادر مختلفة لايمتلك القابلية نفسها في تكوين الهلام والتي تتغير بعدد كبير من العوامل (Srivastava وMalviya ،2011).

المواد وطرائق البحث

استخلاص البكتين

استخلص البكتين من قشور النارنج وقواعد زهرة الشمس حسب الطريقة التي اوردها ساجت (1988)، إذ جرت عملية الاستخلاص بالماء المقطر والكحول الأثيلي . تم ترسيب البكتين بالكحول الأثيلي المحمض بحامض الهيدروكلوريك ثم التجفيف تحت الضغط المخلخل بدرجة حرارة 45°م بعد غسله بالاسيتون والايثر . قدرت اللزوجة النسبية لمحلول البكتين المحضر بتركيز 0.5% في الماء المقطر لأنواع البكتين المستخلصة قيد الدراسة باستخدام جهاز اوستولد Ostwald حيث جرى قياس اللزوجة بمقارنة انسيابية المحلول البكتيني بانسيابية الماء المقطر ، كما درست الصفات المظهرية للهلام الناتج باستخدام البكتين المستخلص اعلاه (ساجت،1988).

انتاج أنزيم البولي كالاكتورونيز

استخدم الوسط الغذائي Czapek-Dox والمتكون من $NaNO_3$ 0.2%، $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%، K_2HPO_4 0.1%، KCl 0.05%، $FeSO_4.7H_2O$ 0.001% واستبدل المصدر الكاربوني السكروز بالبكتين المستخلص من مصدرين هما قواعد زهرة الشمس والنارنج وبطريقة الاستخلاص المائي وبواقع 10 غم/لتر مع تعديل الأس الهيدروجيني الى 6.8 ثم عقم بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة. استخدم الوسط في ترطيب العينات الموجودة مع قوالح الذرة المجروشة وبنسبة ترطيب 3:1 (مادة صلبة:مادة سائلة) وحضنت بدرجة حرارة 30°م لحين ظهور نموات مايكروبية . نقلت النموات الفطرية الى وسط Czapek-Dox Agar المحور باستبدال السكروز بالبكتين النقي بواقع 10 غم/لتر والمعقم للتحقق من مقدرتها على النمو في مثل هذا الوسط وحضنت الأطباق في درجة حرارة 30°م(Silva وآخرون،2002).

تقدير فعالية الأنزيم

قدرت الفعالية الأنزيمية لأنزيم Polygalacturonase (PG) على أساس تحرير المجاميع المختزلة نتيجة التحلل المائي لحامض polygalacturonic acid (PGA) بفعل أنزيم (PG) باستخدام

كاشف 3,5-Dinitrosalicylic acid Reagent المحضر تبعاً لـ Whitaker و Bernhard (1978) . تم تحضير محلول حامض الكالاكتورونيك القياسي بتركيز 2ملغم/مل ، وحضر محلولي مادة التفاعل البكتين المستخلص من زهرة الشمس(P1) والبكتين المستخلص من النارنج (P2) بتركيز 0.5% لكل منهما في محلول خلات الصوديوم 0.03 مولاري الذي يحتوي على 0.06 مولاري NaCl وبأس هيدروجيني 5.0 . قدرت الفعالية لأنزيم PG باضافة 0.9 مل من محلول مادة التفاعل في انبوبة اختبار وحضن في حمام مائي على درجة حرارة 30°م لمدة 10 دقائق ، بدأ التفاعل باضافة 0.1 مل من المستخلص الأنزيمي وحضن على درجة حرارة 30°م لمدة 10 دقائق ، اوقف بعدها التفاعل باضافة 1مل من محلول الكاشف الى مزيج التفاعل ثم وضعت الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم برد تحت ماء الحنفية ، خفف الخليط باضافة 10مل من الماء المقطر ، اجري بعدها الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / الدقيقة ولمدة 15 دقيقة ، تم قراءة الامتصاص الضوئي للمحلول على طول موجي 540 نانومتر. عرفت وحدة الفعالية لأنزيم PG بأنها كمية الأنزيم التي ساعدت في تحرير 1مايكرومول من حامض Galacturonic بفعل التحلل المائي للآصرة الكلايكوسيدية في مادة التفاعل خلال دقيقة واحدة تحت ظروف التقدير .

النتائج والمناقشة

يوضح الجدول 1 فعالية انزيم البولي كالاكتورونيز Polygalacturonase في وسط التنمية باستخدام البكتين المستخلص من النارنج كمصدر كاربوني وحيد ، وقيست الفعالية باستخدام نوعين من البكتين الأول مستخلص من قواعد زهرة الشمس والثاني مستخلص من النارنج، يلاحظ ان اعلى فعالية

جدول.1 فعالية انزيم البولي كالاكتورونيز باستخدام بكتين النارنج كمصدر كاربوني في وسط الانتاج وباستخدام مصدرين للمادة الأساس.

النموذج	مصدر البكتين (المادة الأساس)	الفعالية (وحدة/مل)
O1	زهرة الشمس	29.6875
O1	النارنج	50.31
O2	زهرة الشمس	28.75
O2	النارنج	47.81
O3	زهرة الشمس	51.56
O3	النارنج	33.75
N1	زهرة الشمس	37.81
N1	النارنج	41.87
N2	زهرة الشمس	28.12
N2	النارنج	41.25

تم الحصول عليها للنموذج O3 وباستخدام بكتين قواعد زهرة الشمس كمادة أساس ، بينما نلاحظ في الجدول 2 الذي يبين فعالية الأنزيم باستخدام البكتين المستخلص من قواعد زهرة الشمس كمصدر كاربوني وحيد . ان أفضل فعالية أبداها النموذج O2 باستخدام البكتين المستخلص من النارنج كمادة أساس لعمل الأنزيم ، ونجد كذلك ان اغلب النماذج أعطت فعالية أعلى مقارنة باستخدام البكتين المستخلص من النارنج كمصدر كاربوني في وسط الإنتاج .

البكتين التجاري يستخلص من قشور الحمضيات ومخلفات عصير التفاح بطريقة الاستخلاص بالحامض ويبلغ معدل الإنتاج 25 إلى 12% بكتين على التوالي، بينما يحتوي كل من بقايا البنجر السكري ورؤوس زهرة الشمس 10 إلى 20% بكتين(Miyamoto وChang، 1992).

جدول 2. فعالية إنزيم البولي كالاكتورونيز باستخدام بكتين زهرة الشمس كمصدر كاربوني في وسط الانتاج وباستخدام مصدرين للمادة الأساس .

النموذج	مصدر البكتين (المادة الأساس)	الفعالية (وحدة/مل)
O1	زهرة الشمس	55.31
O1	النارنج	42.5
O2	زهرة الشمس	46.87
O2	النارنج	94.375
O3	زهرة الشمس	56.25
O3	النارنج	45.31
N1	زهرة الشمس	29.375
N1	النارنج	39.06
N2	زهرة الشمس	60.625
N2	النارنج	66.875

يوضح الجدول 3 نتائج تقدير لزوجة البكتين النسبية ويلاحظ ان لزوجة المحلول البكتيني المائي المستخلص من قواعد زهرة الشمس هي الأعلى وهذا يشير ويؤكد ان اللزوجة تختلف باختلاف مصدر البكتين وطريقة استخلاصه، ومن هذه النتائج نستدل على امكانية استخدام البكتين في زيادة كثافة الأغذية وتثخين المواد الناتجة وهذا يرتبط ايضاً بكفاءة الاحتفاظ بالماء وقدرة البكتين على حجز الماء بين جزيئاته.

جدول 3. لزوجة البكتين النسبية الناتج .

النموذج	اللزوجة النسبية(ملي بويز)
بكتين النارنج الكحولي	1.0236
بكتين النارنج المائي	1.1318
بكتين زهرة الشمس الكحولي	1.2814
بكتين زهرة الشمس المائي	1.3267

وهذا بدوره يعتمد على درجات الحرارة وpH المادة الغذائية فعند ارتفاع درجة الحرارة أو pH المادة الغذائية يحدث شطر لسلاسل البكتين وانخفاض اللزوجة بسرعة وكذلك صفات التهلم(Srivastava و Malviya،2011)، وتبعاً لما ذكرته منظمة FAO فان البكتين يعد مضافاً أمينا يمكن استهلاكه بشكل يومي بدون حدود(FAO ، 1969).

أما الخصائص المظهرية الخارجية للهلام المصنع من انواع البكتين المستخلصة من النارنج وقواعد زهرة الشمس فيمكن ملاحظتها في الجدول 4 حيث يظهر ان البكتين المستخلص بالكحول من قواعد زهرة الشمس اعطت افضل الصفات المظهرية إذ تكون هلام ذو قوام جيد ولون اصفر زاهٍ ، لقد استخدم مجموعة من الباحثين البكتين المستخرج من قشرة الموز كعامل للتهلم gelling agent واوضحت النتائج بان درجة الميثلة Methylation لهذا البكتين ذات مدى واسع ويعد من اهم المعايير المستخدمة لمعرفة قوة التهلم، وهذا يشير الى امكانية استخدام هذا البكتين في تكوين الهلام مع الكالسيوم او مع التراكيز العالية من السكر في ظروف حامضية (Emaga وآخرون،2008؛ Rombouts وThibault ،1986). اجري التقويم الحسي للنماذج الأربعة من قبل 7 من ذوي الاختصاص ولوحظ ان افضل نتائج يمكن الحصول عليها في صناعة الجلي باستخدام بكتين المستخلص الكحولي من زهرة الشمس إذ اعطى مظهراً وقواماً جيدين فضلاً عن النكهة واللون، وهذا يتفق مع ماذكره احد الباحثين عن الصفات الفيزياوية للبكتين المنتج من الحمضيات الذي يكون ذا لون كريمي فاتح الى قصديري فاتح بينما يكون البكتين المنتج من مخلفات عصير التفاح ذا لون اغمق، وذكر ان هناك مصادر اخرى يمكن اختيارها لغرض استخلاص البكتين مثل مخلفات صناعة السكر من البنجر السكري ومخلفات المانجو ورؤوس زهرة الشمس(Srivastava و Malviya ،2011). نستدل من النتائج اعلاه ان لظروف الاستخلاص تأثيراً على الناتج المستخلص وصفاته كما اشار احد الباحثين الى ان ظروف الاستخلاص تؤثر على نسبة استخلاص البكتين وصفاته الفيزيوكيميائية ولكنه ليس له تأثير على تركيبه الكيميائي (Norazelina وآخرون،2012).

جدول 4.الخصائص المظهرية للبكتين الناتج .

النموذج	الخصائص
بكتين النارنج الكحولي	هلام خفيف جدا ذو لون اصفر فاقع ولزوجة واطئة
بكتين النارنج المائي	هلام متوسط القوام ذو لون اصفر معتم ولزوجة واطئة
بكتين زهرة الشمس الكحولي	هلام جيد ذو لون اصفر زاهي ولزوجة جيدة
بكتين زهرة الشمس المائي	هلام متوسط القوام ذو لون فاتح جدا ولزوجة متوسطة

المصادر

ساجت، احمد صالح.1988. استخلاص البكتين من قشور النارنج ودراسة خواصه . رسالة ماجستير. قسم الصناعات الغذائية . كلية الزراعة . جامعة بغداد.

Cao, J., L., Zheng and S., Chen.1992. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of rammie. *Enzyme and Microbial Technology* 14,1013±1016.

El-Nawawi S.A. and Y.A., Heinkel.1997.Factors affecting gelation of high ester citrus pectin. *Process Biochemistry*,32: 381–385.

Emaga, T. H., S. N. Ronkart, C. Robert, B. Wathelet, M. Paquot.2008. Characterization of pectins extracted from banana peels (Musa AAA) under different conditions using an experimental design. *J. Food Chemistry*, Vol. 108, Issue 2, pp.463–471.

FAO. 1969. Nutrition meetings of the FAO, pp. 133.

KOPJAR M., V. PILIŽOTA, N. N. TIBAN, D. ŠUBARIĆ, J. BABIĆ, D. AČKAR and M. SAJDL.2009.Strawberry Jams: Influence of Different Pectins on Colour and Textural Properties. *Czech J. Food Sci*. Vol. 27, No.1:20–28.

Liu, L., M.L. Fishman, K.B. Hicks, M. Kende and G. Ruthel.2006. Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: Synthesis and in vivo evaluation. *Drug Delivery*, 13:417-423.

Martins, E.S., R. Silva and E.Gomes.2000.Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem*., 37, 949-954.

Miyamoto,A. and K.C. Chang.1992.Extraction and physicochemical characterization of pectins from sunflower head residue. *Can. Inst. Food Technol*. 57: 1439-1445.

Norazelina Sah Mohd Ismail,Nazaruddin Ramli, Norziah Mohd. Hani and Zainudin Meon.2012.Extraction and Characterization of Pectin from Dragon Fruit (Hylocereus polyrhizus) using Various Extraction Conditions. *Sains Malaysiana* 41(1): 41–45

Pagan J., A. Ibarz, M. Llorca, A. Pagan, G.V. Canovas 2001. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, Vol. 34, No. 7, pp. 605-612(8).

Pandey, A., C. R. Soccol, P. Nigam, and V.T. Soccol.2000.Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. *Bioresource Technol*., 74, 69-80.

Pinheiro, E. R., Iolanda M D A Silva, Luciano V Gonzaga, Edna R Amante, Reinaldo F. Teófilo, Márcia M. C. Ferreira and Renata D. M. C. Amboni.2008.Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (Passiflora edulis flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology*; 99(13):5561-6.

Rombouts F.M. and J. F. Thibault.1986. Sugar Beet Pectins: Chemical Structure and Gelation through Oxidative Coupling .Chemistry and Function of Pectins, Volume 310, American Chemical Society.

Rombouts,F.M. and W. Pilnik1986.Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis* 2,79±89.

Silva, D., E. S. Martins, R. Silva, and E. Gomes.2002.Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Braz. J. Microbiol*.,33(4): 318-324.

Srivastava,P. and R. Malviya.2011.Sources of Pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry- An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, Vol.2 (1)pp.10-18.

Whitaker,J.R. and Bernhard, R.A.(1972).Experiments for an introduction to enzymology. The Whiber press, Davis.

Zhen, Z. and K. Shetty.2000.Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochem.*, 35, 825-830.

STUDY OF CONSUMING ABILITY OF EXTRACTED PECTIN FROM SOME FRUITS PEELS BY LOCAL ISOLATE *Aspergillus sp.*

Aswan H. Al-Bayar Taghreed I. Khalil Nadia N. Hejo Wurod Fawzi

*Food Science Dept.- College of Agriculture – University of Baghdad – Republic of Iraq.

ABSTRACT

Extracted pectin samples from citrus peels and sunflower heads by aqueous and ethanolic methods were used only as a carbon source instead of sucrose for cultivation a local isolate of *Aspergillus sp.*in czapek-Dox medium which contains 0.2% $NaNO_3$, 0.05% $MgSO_4.7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% KCl, 0.001% $FeSO_4.7H_2O$, by solid state fermentation methods for polygalacturonase production. Polygalacturonase activity was estimated in different mediums contain different pectin extracts (aqueous and ethanolic) of citrus and sunflower heads. It is found that, by using citrus pectin in production medium, and sunflower heads pectin as a substrate for polygalacturonase activity signed by (O_3)treatment, the enzyme activity was 51.56 U/ml., while by using sunflower extracted pectin for polygalacturonase production, achieve highest activity 94.375 U/ml. for (O_2) by using citrus pectin as a substrate. Morphological properties for the aqueous and ethanolic extracts were studied also, including relative viscosity, it was found that the aqueous extracted pectin from sunflower bases gives the highest viscosity, while the best morphological properties was obtained by ethanolic extracted pectin from sunflower bases, which mean the progression of sunflower pectin on citrus pectin in physical properties.

Key words: Pectin, aqueous extract, ethanolic extract, citrus peels, Aspergillus, physical properties.