بررسی تأثیر غلظت آنزیم در فرآیند استخراج آنزیمی– آبی روغن ارقام زیتون استان گلستان

محمد حسین حداد خداپرست[1]، علیرضا قدس ولی[2]، لیلا نجفیان[3]

۱– دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

۲– استادیار پژوهش بخش تحقیقات فنی و مهندسی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان.

۳– دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی

چکیده

در این تحقیق تأثیر واریته زیتون (کرونایکی، روغنی محلی ایران و مشین) و غلظت آنزیم پکتینکس اولترا اس پی–ال (غلظت صفر،۰/۰۲ و ۰/۰٤ درصد) روی میزان راندمان استخراج، اسیدیته، عدد پراکسید، عددیدی، کدورت، شاخص رنگ و میزان پلی فنل کل روغن استحصالی در آزمایشات فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تأثیر واریته روی کلیه فاکتورهای مورد بررسی معنی‌دار($p<۰/۰۱$) بود. اثر غلظت آنزیم روی راندمان استخراج روغن، رنگ، کدورت و پلی فنل کل اختلاف معنی-دار($p<۰/۰۱$) نشان داد در حالیکه تأثیر معنی‌داری($p<۰/۰۵$) روی اسیدیته، عدد پراکسید و عدد یدی مشاهده نگردید. میزان رنگ و ترکیبات فنلی روغن‌های استخراج شده به روش آنزیمی ـ آبی نسبت به روغن‌های شاهد با اختلاف معنی‌دار($p<۰/۰۱$) به ترتیب افزایش معادل۱۳/۰تا۶۲/۲ و۱۳/۹تا ۷۲/۶درصد را نشان داد. میزان کدورت با اختلاف معنی‌دار($p<۰/۰۱$)کاهش معادل۲۹/۶تا۶۷/٤درصد داشت. همچنین در میزان راندمان استخراج روغن با اختلاف معنی-دار($p<۰/۰۱$) نسبت به شاهد آزمایش افزایش معادل ۱/۳تا۲/٤ درصد مشاهده گردید. در صورت استفاده از آنزیم اولترا پکتینکس SP-L میانگین بازیابی روغن افزایشی معادل ۱/٦۹ درصد خواهد داشت و افزایش درآمد در رابطه با روغن اضافی استحصالی ۱۸/۸ برابر هزینه‌ی بالاسری تولید خواهد بود.

واژگان کلیدی: روغن زیتون، کمک فرآیند آنزیمی، راندمان استخراج، کیفیت روغن

مقدمه

روند تولید دانه‌های روغنی در دنیا به ویژه در دهه اخیر از رشد بالایی برخوردار بوده است. در صورتی که کشور ما با وجود نیاز مبرم به این ماده غذایی نقش چندانی در این توسعه نداشته و سالانه مقادیر زیادی از روغن مورد نیاز خود را (حدود۹۰درصد) وارد می نماید. با توجه به ارزش درخت زیتون و میوه آن، به منظور توسعه سطح زیرکشت این محصول اقدامات گسترده‌ای برای شناسایی اقالیم مناسب آغاز شده است از جمله طرح توسعه کشت زیتون در نواحی برخوردار که طبق این طرح در طی سه برنامه پنج ساله باید ۵۰۰ هزار هکتار از اراضی مستعد کشت زیتون در مناطق مناسب زیر کشت این گیاه قرار گیرد که استان گلستان با توجه به دارا بودن جمیع شرایط خصوصاً اقلیم مناسب، وجود مجموعه ارقام بومی و خارجی و اراضی شیب دار نقش محوری در طرح توسعهٔ کشت زیتون و تولید روغن مورد نیاز کشور دارد (۲). روشهای مختلفی برای بهینه‌سازی فرآیند استخراج روغن زیتون پیشنهاد شده است از جمله استفاده از پیش تیمار آنزیمی. آنزیم‌های مود نظر اختصاصی بوده و در درجه حرارت های نسبتاً پایین واکنش‌های مربوطه را کاتالیز می‌نمایند و با تخریب دیواره سلولی موجب بهبود بازده و کیفیت روغن استحصالی می گردند. آنزیم مورد استفاده بر اساس ساختار دیواره سلولی تعیین می گردند. این آنزیم‌ها در میوه زیتون نیز وجود دارند ولی مقادیر قابل توجهی از آنها در طی فرآیندهای معمول استخراج نابود می‌گردند. عملکرد کمپلکس آنزیمی سبب می‌شود که میزان زیادی از بخش روغنی سیتوپلاسم که با کلوئیدها تشکیل امولسیون می‌دهد، توسط عمل آنزیم‌ها آزاد گردیده و بنابراین درصد استخراج روغن افزایش یابد، همچنین به دلیل شکسته شدن امولسبون روغن-آب،روغن وارد بخش آبی گیاه نشده و به هدر نمی‌رود (۸). هدف از این تحقیق بررسی تأثیر غلظت آنزیم روی افزایش میزان استخراج روغن از زیتون و خصوصیات کیفی روغن استخراج شده از ارقام آزمایش با استفاده از آنزیم پکتینکس اولترا اس پی-ال می‌باشد.

مواد و روش ها

مواد

سه واریته زیتون کروناپکی،روغنی و میشن که از باغ مجتمع کشاورزی مینودشت و مرکز تحقیقات کشاورزی گلستان برداشت شد.آنزیم پکتینکس اولترا اس پی-ال تهیه شده توسط سویه انتخابی *Aspergillus aculeatus* ،ساخت شرکت Novo Nordisk دانمارک، دارای فعالیت پکتولیتیکی، همی

سلولولیتیکی و سلولولیتیکی و دیگر فعالیت‌های جانبی که دمای مناسب فعالیت آن ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد است. غلظت های مورد نیازدر این تحقیق ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد (حجمی-وزنی) بوده است (۷).

روش ها

۱-نمونه برداری، درختان ارقام مشین، کرونایکی و روغنی در فصل بهار در باغات مورد نظر،انتخاب و علامت گذاری شدند و در فصل پاییز برداشت شدند.۲-آسیاب کردن (تهیه خمیر)، و نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش.۳- افزودن آنزیم، ۲۵۰ گرم خمیر زیتون را در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتر وزن نمودیم بشر را در حمام بخار قرار داده تا دمای خمیر به دمای مناسب فعالیت آنزیم (۴۰ درجه سانتی گراد) برسد، سپس بر اساس تیمار های مورد نظر در آزمایش،آنزیم را به خمیر زیتون اضافه می کنیم. نمونه شاهد نیز به وسیله توزین ۲۵۰ گرم نمونه در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتر آماده شد و کلیه مراحل استخراج روغن بدون تزریق آنزیم بر روی آن انجام گردید (۱). ۴- مالش دادن (مالاکسیون)، به مدت ۶۰ دقیقه با همزنی با۸۰ دور در دقیقه (۱۰) .۵- سانتریفوژ خمیربه مدت ۲۰ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه (۶) .۶-جداسازی فاز روغنی،فاز روغنی و آبی از تفاله جدا شده و با حلال هگزان مخلوط می گردد تا جداسازی فاز روغنی از فاز آبی راحت تر گردد که فاز روغنی و هگزان توسط دکانتور جدا و هگزان در آون ۵۰ در جه سانتی گراد تبخیر و روغن باقیمانده جهت آزمایش نگهداری شد.

تجزیه های شیمیایی

تعیین میزان رطوبت طبق روش AOCS (۶). تعیین میزان روغن طبق روش AOCS (۶). تعیین راندمان استخراج روغن طبق رابطه زیر:

راندمان = (درصد روغن خمیر) / (درصد روغن تفاله - درصد روغن خمیر) ×۱۰۰

عدد یدی طبق دستور العمل ۱۳-۱-۴۱ (AOAC) و از روش هانوس تعیین گردید (۵). عدد پراکسید طبق دستور العمل ۱۶-۱-۴۱ (AOAC) تعیین گردید (۵). اسیدیته طبق دستور العمل ۲۱-۱-۴۱ (AOAC) تعیین شد (۵). اندازه گیری رنگ طبق روش (AOCS, 1993; 1L,19 Methods: Aa 6-38, Cc 13c-50, S 2-64) و استفاده از روش اسپکتروفتومتری

$$C = 1.29A_{430} + 69.7A_{454} + 41.2A_{484} - 56.4A_{670}$$

تعیین کدورت طبق روش AOAC و بدین صورت که مقدار موم موجود در روغن با استفاده از تعیین کدورت روغن در دمای ۱۳۰ درجه سانتی گراد برحسب NTU (T_1) و کسر آن کدورت در ۵/۵ درجه سانتی گراد (T_2) بعد از گذشت یک ساعت به کمک منحنی استاندارد بدست آمد (۶).

مقدار موم برحسب PPM = ۳۳/۳۳ ×(T_2-T_1)

تعیین پلی فنل کل طبق روش AOCS و بدین صورت که ۱۰ گرم روغن در ۵۰ میلی لیتر هگزان حل شد و سه بار با حجم های ۲۰ میلی لیتر متانل ۶۰ درصد در آب استخراج گردید. عصاره های الکلی به هم افزوده و در دمای۴۰ درجه سانتی گراد در دستگاه اواپراتور دوار تحت خلاء تبخیر گردید. باقیمانده در یک میلی لیتر متانل حل و در ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری شد. افزودن ۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰) به ۰/۴-۰/۱ میلی لیتر از عصارهٔ الکلی در بالن ژوژهٔ ده میلی لیتری. پس از ۳ دقیقه یک میلی لیتر محلول سدیم کربنات اشباع (۳۵ درصد) اضافه و با آب مقطر به حجم رسانده شد. غلظت پلی فنل کل در طول موج ۷۲۵ نانومتر در برابر شاهد و بر حسب اسید کافئیک و در محدوده ۱۰۰µg/۱۰ ml-۰ محاسبه گردید.

نتایج و بحث

پلی فنل کل

ارقام زیتون مورد بررسی از نظر میزان پلی فنل کل اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) داشتند. با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها تاثیر غلظت آنزیم روی میزان پلی فنل کل معنی دار($P < ۰/۰۵$) بود چنانکه با اعمال سطوح غلظت (۰/۰۲ و ۰/۰۴درصد،حجمی-وزنی) به ترتیب افزایش معادل ۳۴/۶ و ۴۲/۹ درصد نسبت به شاهد مشاهده گردید(جدول۲). نتایج این تحقیق نشان داد که اثر متقابل رقم× غلظت آنزیم برپلی فنل کل معنی دار($p<۰/۰۱$) بود و بیشینه میزان ترکیبات فنلی مربوط به تیمار اعمال غلظت آنزیمی ۰/۰۴ درصد(حجمی-وزنی) روی زیتون رقم کرونایکی بود. مطالعات نشان داده‌اند که اضافه کردن آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی تشکیل کمپلکس بین ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها را کاهش داده و لذا غلظت فنل های آزاد در خمیر،آزاد شدن آنها را در روغن و بخش آبی گیاه را در حین فرآوری بهبود می بخشد (۱۰).

جدول۱ - مقایسه میانگین (آزمون دانکن P<۰/۰۵) خصوصیات اندازه گیری شده تحت تاثیر رقم زیتون

منابع تغییر (رقم)	اسیدیته (درصد،برحسب اسید اولئیک)	عدد پر اکسید (میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم)	عدد یدی (روش هانوس)	شاخص رنگ	کدورت (واحد نفلومتری)	پلی فنل کل (میلی‌گرم بر کیلوگرم بر حسب اسید کافئیک)	راندمان استخراج (درصد)
کرونایکی	۰/۲۴۳ c	۱/۳۱۱ c	۸۰/۴۷۲ c	۱۴/۹۶۷ a	۳۸/۱۴۲ a	۲۵۵/۱۱۱ c	۷۱/۲۵۶ a
روغنی	۰/۲۶۰ b	۲/۲۱۱ b	۹۰/۷۱۴ b	۶/۱۷۸ b	۳۲/۳۹۸ b	۳۳۴/۷۷۸ a	۶۷/۳۸۹ b
میشن	۰/۴۳۳ a	۳/۰۳۳ a	۹۱/۰۰۰ a	۴/۵۲۲ c	۳۲/۵۸۲ b	۲۶۲/۲۲۲ b	۶۳/۸۲۲ c

اختلاف معنی‌دار آماری بین میانگین های با حروف یکسان وجود ندارد

کدورت

دراین تحقیق اثر تیمار رقم روی میزان کدورت روغن های استحصالی آزمایش معنی دار (P<۰/۰۱) بود. مقایسه میانگین داده ها نشان داد که تاثیر سطوح غلظت آنزیم بر میزان کدورت معنی دار(P<۰/۰۱) بود چنانکه بر طبق جدول ۲ با اعمال غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد(حجمی-وزنی) به ترتیب به طور متوسط کاهش معادل ۴۱/۱ و ۶۲/۷ درصد نسبت به شاهد مشاهده شد. نتایج تحقیقات نشان می دهد که دلیل بالا بودن مقدار تیرگی و کدورت روغن های شاهد می تواند به دلیل بالا بودن میزان ذرات کلوئیدی از روغن باشد که احتمالا با اعمال تیمار آنزیمی از میزان این ذرات در روغن کاسته شده در نتیجه کدورت کاهش می یابد پارامتر های رنگ وکدورت دارای اثرات عمده ای روی پذیرش مشتری دارد (۹).

جدول ۳-۴-مقایسه میانگین (آزمون دانکن P < ۰/۰۵) خصوصیات اندازه‌گیری شده تحت اثر غلظت آنزیم

منابع تغییر	اسیدیته (درصد،برحسب اسید اولئیک)	عدد پر اکسید (میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم)	عدد یدی (روش هانوس)	شاخص رنگ	کدورت (واحد نفلومتری)	پلی فنل کل (میلی‌گرم بر کیلوگرم بر حسب اسید کافئیک)	راندمان استخراج (درصد)
شاهد	۰/۳۱۳ a	۲/۱۷۸ a	۸۷/۴۱۰ a	۷/۳۲۲ c	۵۲/۵۸۲ a	۲۲۷/۰۰۰ c	۶۶/۲۲۲ b
غلظت کم	۰/۳۱۳ a	۲/۱۶۷ a	۸۷/۳۸۱ a	۸/۹۲۸ b	۳۰/۹۱۷ b	۳۰۵/۶۶۷ b	۶۸/۰۵۶ a
غلظت زیاد	۰/۳۱۲ a	۲/۲۱۱ a	۸۷/۳۹۵ a	۹/۴۱۷ a	۱۹/۶۲۴ c	۳۲۴/۴۴۴ a	۶۸/۱۸۹ a

اختلاف معنی دار آمار ی بین میانگین های با حروف یکسان وجود ندارد

شاخص رنگ

نتایج این تحقیق نشان دادکه تیمار واریته تاثیر معنی‌دار (P<۰/۰۵) روی رنگ نمونه ها داشت و بیشینه مقدار آن در رقم کرونایکی مشاهده شد (جدول۱). تاثیر غلظت آنزیم بر شاخص رنگ اختلاف معنی

دار (P<۰/۰۵) نشان داد چنانکه با اعمال سطوح غلظت۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد به ترتیب به طور متوسط افزایش معادل ۱۳/۰و ۱۶/۰درصد نسبت به شاهد مشاهده گردید (جدول۳). در این تحقیق اثر متقابل رقم ×غلظت آنزیم در نمونه های مورد مطالعه تاثیر معنی دار(P<۰/۰۵) روی شاخص رنگ داشت (جدول۳) چنانکه شاخص رنگ افزایش بین ۶۲/۲ -۱۳/۰ درصد نشان داد رقم روغنی با غلظت ۰/۰۲ درصد،کمینه و رقم میشن با غلظت ۰/۰۴ درصد، بیشینه بودند.

جدول۳-۶-مقایسه میانگین (آزمون دانکن ۰/۰۵ > P) داده‌ها تحت تاثیر رقم×غلظت آنزیم

منابع تغییر	اسیدیته (درصد،برحسب اسید اولئیک)	عدد پر اکسید (میلی اکی والان اکسیژن در کیلوگرم)	عدد یدی (روش هانوس)	شاخص رنگ	کدورت (واحد نفلومتری)	پلی فنل کل (میلی‌گرم بر کیلوگرم بر حسب اسید کافئیک)	راندمان استخراج (درصد)
کروناپکی							
پکتینکس							
شاهد	۰/۲۴۷ de	۱/۳۶۷ e	۸۰/۴۰۰ c	۱۲/۹۰۰ b	۵۹/۹۹۳ a	۱۷۹/۰۰۰ h	۶۹/۷۰۰ c
متوسط	۰/۲۴۳ e	۱/۳۰۰ f	۸۰/۴۹۰ c	۱۵/۸۵۰ a	۳۳/۸۸۳ h	۲۷۷/۳۳۳ f	۷۱/۹۳۳ b
بالا	۰/۲۴۰ de	۱/۲۶۷ f	۸۰/۵۲۷ c	۱۶/۱۵۰ a	۲۰/۵۵۰ d	۳۰۹/۰۰۰ c	۷۲/۱۳۳ a
روغنی							
پکتینکس							
شاهد	۰/۲۶۰ bc	۲/۱۶۷ d	۹۰/۷۷۳ b	۵/۶۳۳ d	۵۲/۷۷۳ b	۳۰۲/۳۳۳ d	۶۶/۰۶۷ f
متوسط	۰/۲۵۳ cd	۲/۲۰۰ d	۹۰/۷۰۳ b	۶/۳۶۷ e	۲۷/۲۰۷ f	۳۴۴/۳۳۳ b	۶۸/۰۰۰ e
بالا	۰/۲۶۷ b	۲/۲۶۷ c	۹۰/۶۶۷ d	۶/۵۳۳ e	۱۷/۲۱۷ i	۳۵۷/۶۶۷ a	۶۸/۱۰۰ d
میشن							
پکتینکس							
شاهد	۰/۴۳۳ a	۳/۰۰۰ b	۹۱/۰۵۷ a	۳/۴۳۳ f	۴۴/ 980 c	۱۹۹/۶۶۷ g	۶۲/۹۰۰ i
متوسط	۰/۴۳۷ a	۳/۰۰۰ b	۹۰/۹۳۳ a	۴/۵۶۷ e	۳۱/۶۶۰ e	۲۹۵/۳۳۳ e	۶۴/۲۳۳ h
بالا	۰/۴۳۰ a	۳/۱۰۰ a	۹۰/۹۵۰ a	۵/۵۶۷ d	۲۱/۱۰۷ g	۳۰۶/۶۶۷ cd	۶۴/۳۳۳ g

اختلاف معنی دارآمار ی بین میانگین های با حروف یکسان وجود ندارد

راندمان استخراج

نتایج این تحقیق نشان دادکه تیمار واریته تاثیر معنی‌دار(P<۰/۰۱) روی میزان استخراج روغن دارد. همچنین اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) بین دو سطح غلظت آنزیم وجود ندارد ولی بین دو سطح غلظت آنزیم با شاهد اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۱) وجود داشت چنانکه غلظت های ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد آنزیم به ترتیب به طور متوسط افزایش ۱/۸ و۲/۰درصد نسبت به شاهد نشان دادند و اثر متقابل رقم× غلظت آنزیم(p<۰/۰۵) اختلاف معنی دار نشان نداد.

نتیجه گیری کلی

جهت نیل به راندمان بالاتر استحصال روغن بهتر است از آنزیم با غلظت ۰/۰۲ درصد (حجمی-وزنی) استفاده شود ولی برای دستیابی به کیفیت بالاتر روغن‌های استحصالی غلظت‌های بیشتری از آنزیم (۰/۰۴ درصد حجمی-وزنی) پیشنهاد می‌گردد. در صورت استفاده از آنزیم اولترا پکتینکس SP-L میانگین بازیابی روغن افزایشی معادل ۱/۶۹ درصد خواهد داشت. در این صورت هزینه بالاسری تولید ۱/۲۵ دلار بازای ۱۰۰ کیلوگرم میوه‌ی زیتون می‌باشد، در حالی که درآمد حاصله افزایشی معادل ۲۳/۵ دلا خواهد داشت. به عبارت دیگر، افزایش درآمد در رابطه با روغن اضافی استحصالی ۱۸/۸ برابر هزینه‌ی بالاسری تولید خواهد بود.

منابع

۱. استاندارد ملی ایران.(۱۳۷٦).روش تهیه متیل استرهای اسیدهای چرب.شماره استاندارد ایران ٤۰۹۰.

۲. قدس‌ولی،ع، (۱۳۸٤)،افزایش راندمان استخراج روغن از طریق کاربرد آنزیم در صنایع روغن-کشی،گزارش طرح پژوهشی وزارت کشاورزی، مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی.

۳. مقصودی،ش، (۱۳۸٤)،تکنولوژی زیتون و فرآورده‌های آن،(تألیف هوی. وای. اچ)،انتشارات فرهنگ و قلم.

٤. میرنظامی ضیابری،س،ح، (۱۳۷۷)،خواص درمانی زیتون، انتشارات دانش نگار.

5. AOAC. (2005). *Official Methods of Analyses* , 14 ed ; Associa on of official Anal cal Chemists: Washington , DC,USA.
6. American oil chemist's society. (1993). *Official methods and Recommended Practices of the American oil chemist's Society*, 5th end , Ba 6-84. The American oil chemist's society , Champaign.
7. h p:// www. novozymes.com/en.(2001). Pec nex ultra SP.
8. Ranalli, A., and De Mat a, G. (1997). characteris on of olive oil producted with a new enzyme processing aid. *Journal of American Oi Chemist'sSociety*,74,1105-1113.
۹. Ranalli, A. Malfa , A, and Cabras, p. (2001). Composi on and quality of pressed virgin olive oils extracted with a new enzyme processing aid. *Journal of Food Science*, 66, 592-603.
10. Vierhuis, E., servill, M., Baldioli , M., Schols, H. A. Voragen, A. G. J., and Montedoro, G. F. (2001). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysacchorieds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 1218-1223.