تحقیقات مهندسی صنایع غذایی/جلد۲۲ / شماره /۷٤ / بهار و تابستان / ۱٤۰۲ / ص ۱۸۱ -۱۹٤
سایت مجله: https://fooder.areeo.ac.ir

نوع مقاله: پژوهشی

تاثیر افزودنی‌ها ،حامل‌ها و متغیرهای فرایندخشک کردن به روش پاششی بر پایداری زایلاناز

حدیث متشفی[1*] و مریم هاشمی[2*]

[1] استادیار ، بخش فرآوری محصولات دامی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[2] استاد ، بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۷/۱۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

چکیده

آنزیم زایلاناز از آنزیم‌های مهم در صنایع غذایی، تغذیهٔ طیور و آبزیان و کاغذسازی است. هدف این پژوهش، ارائهٔ ترکیبی از افزودنی‌ها به‌منظور حفظ پایداری آنزیم زایلاناز در فرایند خشک‌کردن پاششی است. به این‌منظور، آنزیم زایلاناز توسط سویه *باسیلوس ساتیلیس* D3d با استفاده از پسماند مالت (BSG) و عصارهٔ مخمر به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن در فرمانتور ۱٤ لیتری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و طی ۳۵ ساعت تولید شد. بعد از جداسازی زیست‌توده و سوبسترای جامد با سانتریفیوژکردن، از روماند به‌عنوان منبع آنزیم با فعالیت زایلانازی ۳۵۰U/ml استفاده شد. از میان افزودنی‌های مورد آزمایش، یون منگنز در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بیشترین تاثیر را بر افزایش فعالیت آنزیمی تا حدود دو برابر داشت. از میان حامل‌های مورد بررسی، مانیتول و منیزیم سولفات کمترین کاهش فعالیت آنزیمی را نشان دادند. منیزیم سولفات و عصارهٔ مالت به‌عنوان پرکننده به‌ترتیب با غلظت (w/v) ۲۰ و ۵ درصد برای خشک کردن آنزیم به روش پاششی انتخاب شدند. با بررسی اثر دمای هوا و دبی خوراک ورودی در خشک‌کن پاششی مشخص شد در دمای ورودی ۱۲۰ درجه سلسیوس و دبی خوراک ورودی ٤ میلی‌لیتر بر دقیقه، فعالیت آنزیمی حفظ و پودری با رطوبت ٤/۵ درصد حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: پایداری، خشک‌کن پاششی، زایلاناز، فعالیت آنزیمی

مقدمه

آنزیم اندو-بتا ۱و۴ زایلاناز (EC 3.2.1.8) آبکافت‌کنندهٔ مواد همی‌سلولزی (دومین پلی‌ساکارید فراوان در طبیعت)، از آنزیم‌های صنعتی مهم در صنایع غذایی، خوراک دام، طیور و آبزیان، کاغذسازی، تولید سوخت زیستی، شوینده‌ها و نساجی است. زایلان مهم‌ترین پلی‌ساکارید غیر سلولزی تجدید پذیر در طبیعت، مولکولی است پیچیده و عمدتا از اتصال زایلوزها با پیوند بتا ۱-۴ گلیکوزیدی و استخلاف هایی مانند استیل، آرابینوزیل و گلوکورونوزیل تشکیل شده است. آنزیم‌های زایلونولیتیک دارای اثر هم‌افزایی[1] هستند، بدین صورت که تجزیه کامل سوبسترای مورد نظر در صنایعی مانند خوراک طیور، آبزیان و صنایع غذایی، نیازمند عملکرد همزمان مجموعه‌ای از آنزیم‌های زایلونولیتیک است که به سیستم زایلونولیتیک موسوم است. این سیستم شامل اندوزایلانازها، بتازایلوزیدازها و آنزیم‌های کمکی مانند استیل زایلان استراز، آلفا گلوکورونوزیداز، آلفا

[1] Synergistic

http://doi: 10.22092/FOODER.2023.360226.1345

Email: hadis.moteshafi@gmail.com /hashemim@abrii.ac.ir

© 2023,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

آرابینوفورانوزیداز و... اشت(Bhardwaj *et al*., 2019).

آگاهی مصرف‌کنندگان از مواد غذایی مغذی و غنی از فیبر، تولیدکنندگان را تشویق به تولید انواع نان‌های سبوس دار کرده‌است. خمیر تهیه شده با استفاده از آرد گندم کامل شبکه‌ای است پیچیده و پیوسته از نشاسته که در مخلوط پروتئین- گلوتن جای‌گرفته و کیفیت نان عمیقاً تحت تأثیر حضور فیبرهاست. استفاده از زایلاناز در دهۀ گذشته در صنعت نان، به دلیل پتانسیل آن در بهبود بافت نان، افزایش یافته است. استفاده از زایلاناز به طور قابل توجهی آرابینوزایلان محلول در آب را هیدرولیز می‌کند و در نتیجه بافت، ظرفیت نگهداری هوا و سرعت انبساط خمیر را بهبود می‌بخشد (Zhang *et al*., 2022). از مزایای استفاده از زایلاناز در این صنعت به کاهش چسبندگی خمیر (Butt *et al*., 2008) نیز اشاره شده است. زایلانازها در ترکیب با آنزیم‌های مختلف دیگر مانند لاکاز، α-آمیلاز، گلوکاناز و آرابینوفورانوزیداز نیز برای بهبود کیفیت محصولات پخته شده در صنعت نانوایی به کار گرفته شده اند (Bala and Singh, 2017).

زایلاناز در صنعت تولید آبمیوه نیز مورد توجه قرار گرفته است. آبمیوه‌های کدر پذیرش کمتری دارند و تغلیظ و پاستوریزاسیون آنها چالش برانگیز است. بنابراین، آبمیوه‌ها برای از بین بردن کدورت یا تیرگی نامطلوب و رسوبات با فرآیند شفاف سازی تصفیه می‌شوند. امروزه در صنعت به منظور غلبه بر کدورت آبمیوه، مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌کنندۀ دیواره سلولی گیاهی مانند آنزیم‌های پکتینولیتیک، سلولولیتیک و همی‌سلولولیتیک (زایلانازها) برای دستیابی به شفافیت و تولید ترکیبات پری‌بیوتیکی در آبمیوه استفاده می‌شود که برای مصرف‌کننده نیز جذبۀ بیشتری دارد(Madende and Madende, 2023).

زایلاناز از آنزیم‌های پرکاربرد در تغذیۀ طیور نیز هست. براساس مطالعات، بخشی از مواد مفید مانند نشاسته و پروتئین در رودۀ کوچک طیور هضم بیوشیمیایی نمی‌شوند. جوجۀ گوشتی جوان، از نظر تبدیل غذا به افزایش وزن بدن بسیار کارآمد است ولی تقریبا ۲۵ درصد از میزان انرژی و ۵۰ درصد از نیتروژن گرفته شده را از طریق مدفوع دفع می‌کند که این عامل به‌ویژه در جوجه‌های جوان می‌تواند ناشی از کمبود تولید آنزیم‌ها باشد. استفاده از آنزیم‌ها می‌تواند به کاهش اثرهای مخرب عوامل ضد تغذیه‌ای کمک کند. فراوان‌ترین پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در خوراک بر پایۀ غلات، سلولز، ۱-۳ و ۱-۴ بتا گلوکان‌ها و پنتوزان‌های نوع آرابینوزایلان هستند. بتاگلوکان‌ها و پنتوزان‌ها به‌دلیل استقرارشان در دیوارۀ سلولی و احاطه‌کردن اندوسپرم، عوامل ضد تغذیه‌ای در نظر گرفته می‌شوند. نکتۀ مهم‌تر انحلال‌پذیری بخشی از این پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای است. پلی‌ساریدهای غیر نشاسته‌ای حل شده ویسکوزیتۀ بالایی را در دستگاه گوارش ایجاد می‌کنند که باعث کاهش قابلیت جذب مواد مغذی می‌شود. به‌دلیل توانایی اندو-بتا گلوکانازها و اندو-بتا زایلانازها در هیدرولیز جزئی به ترتیب بتاگلوکان‌ها و پنتوزان های غلات، استفاده از مکمل‌های حاوی این آنزیم‌ها در جیرۀ طیور توصیه می‌شود (Hoeck *et al*., 2021) در جدول ۱ کاربردهای مختلف زایلاناز آورده شده است.

جدول ۱-کاربردهای آنزیم زایلاناز(Bajaj and Mahajan, 2019; Kaushal *et al*., 2021)

Table1- Applications of Xylanase (Bajaj and Mahajan, 2019; Kaushal *et al*., 2021)

صنعت Industry	کاربرد Application	عملکرد Function
تولید آب‌میوه و ماءالشعیر Production of fruit juice and beer	بهبود کیفیت Quality improvement	شفاف‌سازی آب‌میوه و کاهش گرانروی آن، بهبود استخراج و کیفیت محصول Clarifying fruit juice and reducing its viscosity, improving extraction and product quality
نانوایی Bakery	بهبود کیفیت محصولات نانوایی Improving the quality of bakeries	بهبود خواص فیزیکی و رئولوژیکی خمیر نان Improvement of dough rheological properties
تولید خوراک دام و طیور Feed production	بهبود هضم پذیری خوراک دام، طیور Feed digestibility increasement	کاهش مقدار پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای کاهش گرانروی محتویات روده و بهبود استفاده از پروتئین و نشاسته، افزایش قابلیت هضم Reducing the content of non-starch polysaccharides, reducing the viscosity of intestinal content, improving the use of protein and starch
پالایش زیستی/ تبدیل زیستی Bio refinery/ Bioconversion	استفادهٔ بهینه از پسماندهای کشاورزی و غذایی Agricultural and food waste usage	بازیافت پسماندها، تولید محصولات تخمیری، سوخت (اتانول زیستی) و مواد شیمیایی با ارزش افزوده Waste recycling, production of fermentation products, biofuels and value-added chemicals

در کاربردهای صنعتی بدون گذراندن مراحل خالص-سازی پیچیده، زمان‌بر و هزینه‌بر و تنها با بازیابی آنزیم‌ها از محیط کشت حاوی میکروارگانیسم می‌توان به ترتیب مراحل تغلیظ، فرمولاسیون و خشک کردن را به منظور تهیه پودر و یا ریزدانه[۲] آنزیمی طی کرد. با توجه به ماهیت پروتئینی آنزیم‌ها، باید از طریق فرمولاسیون مناسب فعالیت آنزیمی در مراحلی مانند خشک کردن و در دورل نگهداری و سپس در زمان کاربرد (به ویژه دما و pH فرایند صنعتی مورد نظر) حفظ شود. افزودنی‌ها و حامل‌هایی که در فرمولاسیون آنزیم‌ها به‌کار می‌روند، به ماندگاری ساختار و جلوگیری از انعقاد، تجمع و تغییرات کووالانتی کمک می-کنند. خشک کردن پاششی روش خشک‌کردن همرفتی با استفاده از هوای گرم برای انتقال گرما و حذف رطوبت است. با این روش، طی فرایندی کوتاه‌مدت حتی مواد حساس به حرارت مانند آنزیم‌های فرموله شده را می‌توان به پودر تبدیل کرد. روش خشک‌کن پاششی علاوه بر تبدیل فرم مایع به جامد و کاهش حجم محصولات، افزایش ماندگاری محصولات را نیز فراهم می‌کند. این روش معمولا برای ریزپوشانی کردن اجزای حساس توسط حامل‌ها و محافظت آنها از عوامل محیطی مانند اکسیداسیون به‌کار می‌رود. استفادهٔ گسترده از خشک‌کن پاششی برای خشک‌کردن مایعات و عصاره‌ها به‌علت بازده تبخیر بالا، زمان بسیار کوتاه تماس با هوای داغ خشک‌کننده، هزینه پایین فرایند، ظرفیت تولید بالا و کیفیت بالای محصولات است. بنابراین، روش خشک‌کردن پاششی روشی قدرتمند و اقتصادی برای تولید محصولات آنزیمی با کیفیت بالاست (Rezaul *et al*., 2017). عواملی مانند غلظت و دبی خوراک ورودی، شدت هوای اسپری کردن، دمای ورودی و خروجی محفظهٔ خشک کن، دبی جریان گاز خشک‌کننده و غیره بر ویژگی‌های پودر نهایی تاثیر می‌گذارد و برای هر کاربرد باید شرایط مناسب پودرکردن با اجرای آزمایش در شرایط مختلف تعیین شود. در این پژوهش، آنزیم زایلاناز در محیط حاوی سوبسترای لیگنوسلولزی پسماندمالت که از فراورده‌های جانبی شرکت-های تولیدکننده ماءالشعیر است، به‌عنوان تنها سوبسترای

[۲] Granule

کربنی در فرمانتور ۱۴ لیتری تولید و پس از آن ترکیبی از مواد افزودنی، حامل و پرکننده برای حفظ فعالیت آنزیم در فرایند خشک کردن پاششی معرفی شد. در ادامه، اثر دمای هوا در دو سطح ۱۴۰ و ۱۲۰ درجه سلسیوس و دبی خوراک ورودی در دو سطح ۴و ۶ میلی لیتر بر دقیقه در عملیات خشک‌کردن پاششی بر باقیماندهٔ فعالیت آنزیمی پودر، دمای هوای خروجی و رطوبت پودر بررسی شد.

مواد و روش ها

تولید آنزیم زایلاناز

در این پژوهش، از سویهٔ *باسیلوس سابتیلیس* D3d کلکسیون‌های میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران استفاده شده است. از محیط کشت نوترینت آگار برای نگهداری سویه مطابق راهکار شرکت سازنده استفاده شد.

برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح از محیط نوترینت براث[۳] استفاده و باکتری در این محیط و در شرایط ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۱۸ساعت کشت داده‌شده و به‌عنوان مایهٔ تلقیح استفاده شد. آنزیم زایلاناز در بیوراکتور ۱۴ لیتری BioFlo310 در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اکسیژن محلول ۵۰ درصد و pH برابر با ۷±۰/۲ تولید شد. تودهٔ زیستی و سوبسترای جامد با سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴درجه سلسیوس و RCF[۴] ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند و روماند در لوله‌های آزمایشگاهی ۵۰ میلی‌لیتری توزیع و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس به‌عنوان منبع آنزیم برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (Moteshafi *et al.*, 2016). اجزای محیط کشت تولید آنزیم در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

جدول۲- محیط کشت تولید آنزیم(Moteshafi *et al.*, 2019).

Table2. Medium of Enzyme Production(Moteshafi et al., 2019)

اجزا Ingredients	غلظت (لیتر/گرم) Concentration (g/l)
پسماند مالت/ Malt Extract	75
عصارهٔ مخمر/Yeast Extract	5
کلسیم کلراید ۲ آبه/$CaCl_2.2H_2O$	0.5
منیزیم سولفات ۷ آبه/$MgSO_4.7H_2O$	0.3
دی پتاسیم هیدروژن فسفات/K_2HPO_4	1.0

سنجش فعالیت آنزیم زایلاناز

بر اساس تعریف، یک واحد فعالیت آنزیم زایلاناز مقدار آنزیمی است که موجب تولید یک میکرومول قندهای کاهنده در مدت زمان یک دقیقه از سوبسترای زایلان شود. فعالیت آنزیم زایلاناز بر اساس روش ارائه شده توسط میلر با اندازه‌گیری قندهای کاهندهٔ آزاد شده از زایلان توسط شناساگر ۵،۳ – دی‌نیتروسالسیلیک اسید (DNS) اندازه-گیری شد(Miller, 1959). جذب نوری نمونه‌ها بادستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و غلظت قندهای کاهنده آزاد شده با استفاده از نمودار استاندارد (قند زایلوز)، به‌دست آمد. فعالیت آنزیم در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و pH برابر ۷ اندازه‌گیری و با واحد U/mL بیان شده است(Bailey *et al.*, 1992).

انتخاب افزودنی‌های مناسب برای حفظ فعالیت آنزیمی

افزودنی‌های مناسب برای افزایش و حفظ فعالیت آنزیمی در فرایند خشک‌کردن و همچنین افزایش جامدات انحلال‌ناپذیر ضروری هستند. با افزودن برخی یون‌های فلزی در غلظت های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار، میزان فعالیت باقیمانده نسبت به نمونهٔ شاهد سنجیده شد. اثر قندهای

[۳] Nutrient broth

[۴] Relative Centrifugal Force

ساکارز و ترهالوز و پلی ال‌ها مانند سوربیتول و مانیتول و نمک‌های کلسیم کلراید و منیزیم سولفات در غلظت ۱۰ درصد برای انتخاب حامل آنزیم در فرمولاسیون برای تهیه پودر آنزیم به روش خشک‌کن پاششی بر میزان فعالیت آنزیم آزمایش شد. درصد مناسب عصارهٔ مالت به‌عنوان پرکننده در فرمولاسیون نیز تعیین شد. درصد باقیمانده فعالیت آنزیم در هر آزمایش (فعالیت ثانویه) براساس رابطهٔ (۱) نسبت به فعالیت اولیه محاسبه شد.

رابطهٔ (۱)

درصد باقیمانده فعالیت آنزیمی

=(فعالیت آنزیمی اولیه / فعالیت آنزیمی ثانویه)*۱۰۰

تهیهٔ پودر آنزیم به روش خشک‌کردن پاششی

بعد از تهیهٔ فرمولاسیون مناسب در فرم مایع، برای تهیهٔ پودر آنزیمی از خشک‌کن پاششی آزمایشگاهی ساخت شرکت فناوری دارویی درسا به ساز (درساتک) مجهز به نازل تمام استیل (۳۰۴) با قطر ۰/۷ میلی‌متر استفاده شد(شکل ۱). خوراک ورودی به نسبت ۱ به ۱ از کوکتل آنزیمی و منیزیم سولفات و عصارهٔ مالت توسط یک پمپ پریستالتیک به‌محفظه وارد و از نازل اسپری می‌شود. برای اختلاط خوراک ورودی از مگنت و دستگاه همزن استفاده شد. با توجه به چند آزمایش اولیه برای بررسی محدوده متغیرهای موثر، ماده خشک خوراک ورودی ۲۵ درصد ، شدت جریان هوای پاششی۸/۵ لیتر بر دقیقه و دبی هوای گرم ۶۰ درصد ظرفیت دستگاه انتخاب شدند. راندمان بازیابی فعالیت آنزیمی بر اساس رابطه (۲) محاسبه شد.

رابطهٔ (۲)

راندمان بازیابی فعالیت آنزیمی

=(فعالیت آنزیمی در خوراک ورودی / فعالیت آنزیمی در پودر)*۱۰۰

اندازه‌گیری رطوبت پودر

برای اندازه‌گیری رطوبت از روش AOAC 984.25- 1984 استفاده شد. دو نمونه ۰/۵ گرمی از هر پودر در اون ۱۰۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و تا زمان ثابت شدن روند کاهش وزن، اندازه‌گیری وزن ادامه داشت. متوسط نسبت تغییر وزن به دلیل کاهش رطوبت هر دو نمونه به وزن اولیه، به‌عنوان درصد وزنی رطوبت پودر ثبت شد (Li *et al.*, 2021)

آنالیز آماری

آزمایش‌ها در طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا و وجود اختلاف معنادار بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن با سطح معناداری (۰/۰۵ > p) با نرم افزار SPSS 23 بررسی گردید و نمودارها با نرم افزار اکسل رسم شدند.

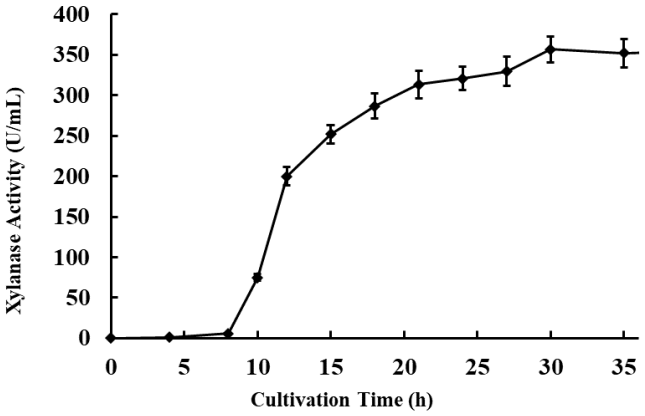
شکل ۱- دستگاه خشک کن پاششی آزمایشگاهی

Fig.1- Laboratory Spray Dryer

نتایج و بحث

تولید آنزیم زایلاناز در فرمانتور آزمایشگاهی

روند افزایشی تولید آنزیم زایلاناز توسط سویهٔ *باسیلوس ساتیلیس* D3d در فرمانتور ۱۴ لیتری و تحت شرایط کنترل شده در شکل ۳ مشاهده می‌شود. بعد از حدود ۸ ساعت از آغاز کشت، تولید آنزیم آغاز شد و تا ساعت ۳۰ ام روند افزایشی دارد. میزان تولید آنزیم طی ۳۵ ساعت به ۳۵۰ U/mL رسیده است.



شکل۲- روند تولید آنزیم زایلاناز توسط *باسیلوس سابتیلیس* D3d در محیط کشت حاوی پسماند مالت

2- The profile of xylanase production by *Bacillus subtilis* D3d in culture medium containing BSG.Fig

در جدول۳ تولید آنزیم زایلاناز توسط برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها با استفاده از پسماندهای لیگنوسلولزی آورده شده است. مدت زمان لازم برای تولید آنزیم در کشت قارچ بیشتر از کشت باکتری است. تولید آنزیم قارچی در فرمانتور به‌دلیل تنش‌های حاصل از هم‌زدن و از بین رفتن توده‌زیستی بازدهی کمتری دارد. با توجه به نتایج به دست آمده به‌نظر می‌رسد تولید آنزیم توسط سویهٔ *باسیلوس سابتیلیس* D3d با استفاده از پسماند مالت می‌تواند در مقیاس بالاتر نیز مورد توجه قرار گیرد.

فرمولاسیون آنزیم زایلاناز و بررسی تاثیر افزودنی‌ها

آنزیم‌ها، پروتئین‌هایی متشکل از زنجیره های پلی پپتیدی تاشده از اسیدهای آمینه هستند که برای انجام مجموعه ای از عملکردهای بیولوژیکی ضروری هستند. فعالیت بیولوژیکی آنزیم‌ها به ساختار سه بعدی آن‌ها بستگی دارد. ساختار فضایی آنزیمی در روند تولید، نگهداری و در زمان کاربرد دچار دناتوره شدن می‌شود. دناتوره شدن شامل باز شدن تاخوردگی‌های ساختار پروتئین است که باعث کاهش یا از دست رفتن کارایی آن خواهد شد. بنابراین دستیابی به آنزیم‌های پایدار و فعال، غالباً یک تلاش چالش برانگیز است زیرا آنها به طور طبیعی برای شرایط محیط‌های صنعتی که مورد استفاده قرار گیرند، تکامل نیافته اند(Silva et al., 2018). کاربردهای صنعتی آنزیم‌ها فقط در صورتی که این کاتالیزورها در برابر دما، pH اسیدی یا قلیایی، نمک‌ها و انواع مواد موجود در واکنش تثبیت شوند، امکان‌پذیر است.

اثر یون های فلزی بر افزایش فعالیت آنزیم زایلاناز

یون‌های فلزی به‌دلیل ایجاد کمپلکس با ساختار آنزیمی می‌توانند اثر افزایش دهندهٔ فعالیت یا کاهش آن را داشته باشند. به‌دلیل حضور برخی یون‌های فلزی در فرایندهای صنعتی (برای مثال حضور یون سدیم در فرایند تولید خمیر و نان صنعتی) و همچنین برای افزایش بازدهی فرایندهای

جدول۳- مقایسهٔ تولید تولید زایلاناز باکتری‌ها/ قارچ‌های مختلف از پسماندهای لیگنوسلولزی
Table3- Comparison of xylanase production of different bacteria/fungi from lignocellulosic waste

باکتری/ قارچ Bacteria/Fungi	سوبسترا Substrate	تولید آنزیم Enzyme Production (U/mL)	مدت زمان Time (h)	مرجع Ref
باسیلوس ساتیلیس D3d *Bacillus subtilis* D3d	۷/۵ ٪ پسماند مالت 7.5% BSG	350	30	پژوهش‌حاضر Present work
آسپرژیلوس نیجر KK2 *Aspergillus niger KK2*	۳٪ ساقه برنج و ۱٪ سبوس گندم 3% rice straw, 1% wheat bran	620	96	(Min et al., 2007)
پنی سیلیوم سیترینوم *Penicillium citrinum*	باگاس سورگوم Sorghum bagasse	800	48	(Bagewadi et al., 2016)
لیزینی‌باسیلوس فوزیفرمیس *Lysinibacillus fusiformis*	۱/۵ ٪ غلاف آجیل کولا 1.5% Kola nut husk	100	24	(Olatidayo et al., 2022)
آسپرژیلوس فوتیدس *Aspergillus foetidus*	سویا Soya	13.98	168	(Cunha et al., 2018)

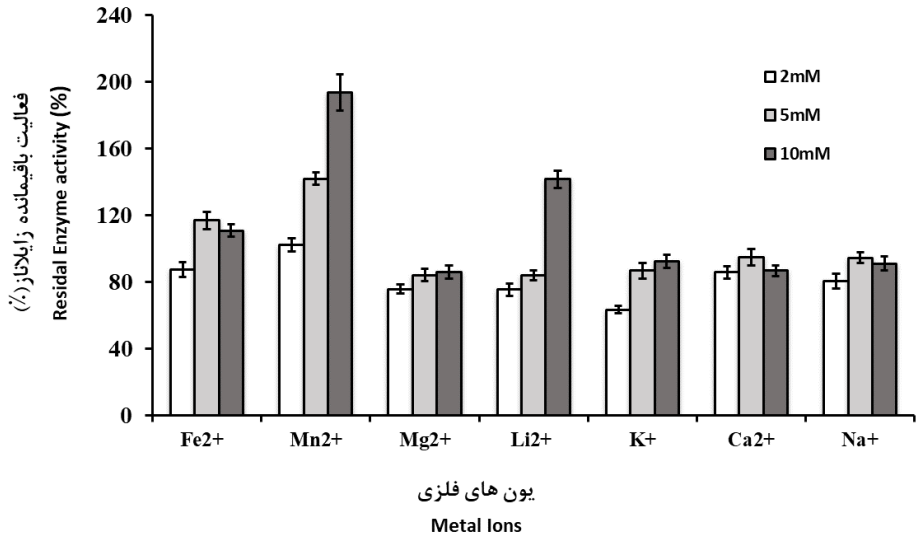
آبکافت آنزیمی، بررسی اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم‌ها ضروری است(Vasconcellos *et al*., 2016). یون‌های Fe^{2+} ، Mn^{2+} و Li^{2+} تاثیری مشابه بر زایلاناز *باسیلوس لیچنیفورمیس*[۵] P11(C) داشته‌اند (Bajaj K and Manhas, 2012). افزودن یون منگنز در غلظت ۱۰ میلی مولار برای افزایش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده ترکیبات لیگنوسلولزی توصیه شده است (Vasconcellos *et al*., 2016). در این پژوهش به مظور افزایش فعالیت آنزیمی، اثر برخی یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم زایلاناز بررسی شد. در شکل ۳ درصد باقیمانده فعالیت زایلاناز در حضور برخی یون‌های فلزی در غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نسبت به نمونهٔ شاهد دیده می‌شود. براساس نتایج به‌دست آمده، یون‌های Fe^{2+}، Mn^{2+}و Li^{2+}، حتی در غلظت ۱۰میلی‌مولار نیز محرک فعالیت آنزیم زایلاناز بوده اند. در حضور ۱۰ میلی‌مولار $Mg2+$ و $K+$ فعالیت زایلانازی به ترتیب ۸۶ درصد و۹۳ درصد حفظ شد. در حالی‌که در غلظت ۱۰ و ۵ میلی‌مولار Na^{+} و ۵ میلی‌مولار Ca^{2+} حدود ۹۴ درصد فعالیت نسبت به نمونهٔ شاهد باقی مانده است. با توجه به تاثیر مثبت معنادار یون منگنز بر فعالیت آنزیم زایلاناز می‌توان از آن به‌عنوان محرک فعالیت زایلاناز در فرمولاسیون آنزیم تولید شده در این پژوهش استفاده کرد.

انتخاب حامل و پرکننده برای فرمولاسیون آنزیم زایلاناز

برای به حداقل رساندن اثر آبزدایی[۶] و حفظ فعالیت آنزیمی در فرایند خشک کردن و نگهداری و البته افزایش مادهٔ خشک، حامل‌ها و پرکننده‌های متفاوتی با کوکتل آنزیمی مخلوط و به‌کار گرفته می‌شوند. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در حضور (w/v) ۱۰ درصد مانیتول، منیزیم سولفات و کلسیم کلراید به ترتیب در حدود ۸۰ ، ۷۵ و ۷۳ درصد از فعالیت آنزیمی حفظ می‌شود در حالی‌که از نظر آماری اختلاف معناداری ($p<۰,۰۵$) برآورد شده است. هرچند حضور مانیتول در حفظ فعالیت زایلانازی موثرتر از دیگر مواد مورد بررسی در این پژوهش است، اما با توجه به مقدار مصرف حامل در فرمولاسیون به نظر می‌رسد گزینهٔ مناسب‌تر برای حامل آنزیم زایلاناز باکتریایی از نظر اقتصادی، منیزیم سولفات است.

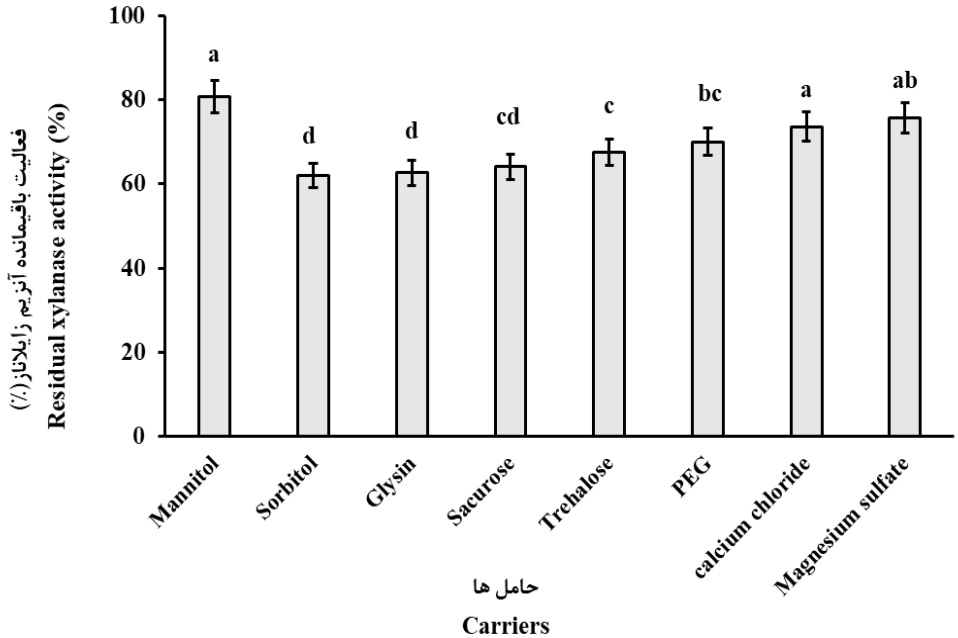
[۵] *Bacillus licheniformis*

[۶] Dehydration



شکل۳- اثر یون‌های فلزی در غلظت‌های ۵،۲ و ۱۰ میلی‌مولار بر فعالیت آنزیم زیلاناز باکتریایی

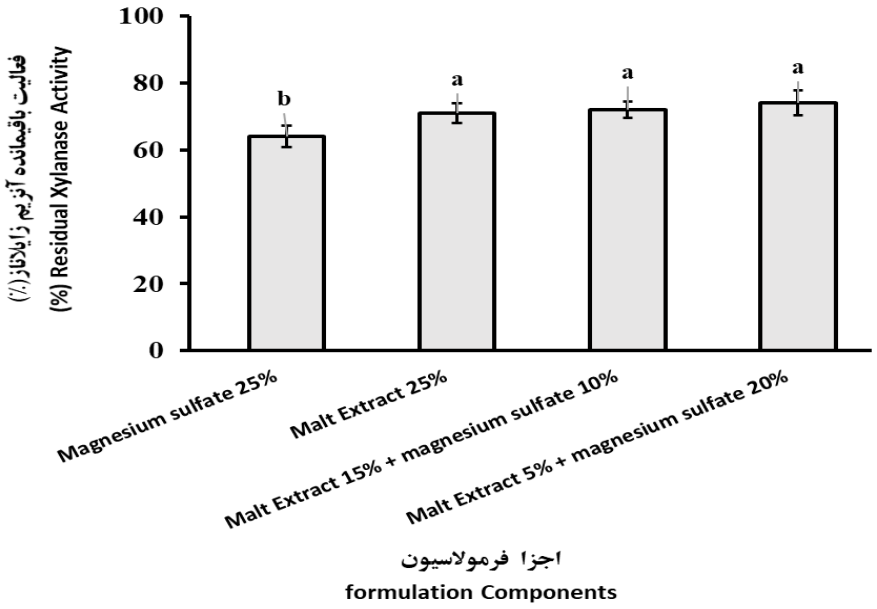
Figure. 3- The effect of metal ions in concentrations of 5, 2 and 10 mM on the activity of bacterial xylanase



شکل٤- اثر حامل های مختلف بر فعالیت آنزیم زایلاناز باکتریایی (میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنادار هستند (p<۰/۰۵))

Fig.4- The effect of different carriers on the activity of bacterial xylanase (means with different letters have significant differences (p<0.05))

پرکننده‌ها مانند عصاره مالت و مالتودکسترین می‌توانند اثرهای محیطی نامطلوب برای آنزیم را تا حدودی تعدیل کنند. در ادامه، از عصارهٔ مالت به‌عنوان پرکننده در ترکیب با منیزیم سولفات استفاده شد. چهار تیمار شامل فرمولاسیون (۱) : ۲۵ درصد نمک منیزیم سولفات، (۲): ۲۵ درصد عصارهٔ مالت، (۳): ۱۰ درصد عصارهٔ مالت و ۱۵ درصد منیزیم سولفات و (۴): ۵ درصد عصارهٔ مالت و ۲۰ درصد منیزیم سولفات بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، درصد باقیمانده فعالیت زایلاناز در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ اختلاف معنادار ندارند در حالی که تیمار حاوی ۲۵ درصد منیزیم سولفات کمترین حفظ فعالیت آنزیمی را داشته است. براساس نتایج این پژوهش، فرمولاسیون آنزیم زایلاناز باکتریایی با استفاده از عصارهٔ مالت و منیزیم سولفات برای تهیهٔ پودر آنزیمی به روش خشک‌کردن پاششی به حفظ فعالیت آنزیم طی فرایند خشک‌کردن منجر شده است.



شکل ۵- بررسی اثر ترکیب عصارهٔ مالت و منیزیم سولفات بر فعالیت آنزیمی
(میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنادار هستند (p<۰/۰۵))

Fig.5- Investigating the effect of the combination of malt extract and magnesium sulfate on enzyme activity (means with different letters have significant differences (p<0.05)

خشک کردن آنزیم زایلاناز به روش پاششی

عواملی مانند دمای هوای ورودی، دبی خوراک و هوا بر فرایند خشک کردن به روش پاششی و کیفیت پودر نهایی موثر هستند. تعیین دمای مناسب هوای ورودی برای افزایش مقیاس فرایند از مهم‌ترین عوامل است. از طرفی دمای هوای خروجی نتیجه انتقال حرارت و جرم در محفظهٔ خشک‌کن است و بنابراین نمی‌توان آن را در ابتدای فرایند مانند دمای هوای ورودی تنظیم کرد. در این پژوهش، ترکیبی ثابت از فرمولاسیون آنزیم با استفاده از منیزیم سولفات و عصارهٔ مالت در دماهای ورودی ۱۲۰ و ۱۴۰ درجه سلسیوس و دبی خوراک ورودی ۴ و ۶ میلی‌لیتر بر دقیقه با استفاده از خشک‌کن پاششی خشک شدند. در جدول۴، اثر تیمارها بر راندمان بازیابی فعالیت آنزیمی، دمای هوای خروجی و درصد رطوبت پودر مشاهده می‌شود.

در دمای ۱۴۰ درجه سلسیوس هرچند رطوبت پودر به خوبی کاهش یافته است اما فعالیت آنزیمی بازیابی نشده است. در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس در هر دو دبی خوراک ورودی فعالیت آنزیمی به خوبی بازیابی شده است. با توجه

به نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد شرایط دمای هوای ورودی ۱۲۰ درجه سلسیوس و دبی ورودی خوراک (دقیقه/میلی لیتر) ۴ و ۶ نتایج مطلوبی را از نظر فعالیت آنزیمی و درصد رطوبت پودر فراهم می‌کنند. هرچند پودر حاصل شده از تیمار ۱ در پژوهش حاضر از نظر یکنواختی مناسب‌تر از پودر حاصل از تیمار ۲ است.

جدول٤- تاثیر پارامترهای دمای هوای ورودی و دبی خوراک بر راندمان بازیابی فعالیت آنزیمی دمای هوای خروجی و درصد رطوبت پودر
Table4- The effect of parameters of inlet air temperature and feed flow rate on enzyme activity recovery efficiency, outlet air temperature and powder moisture percentage

تیمارها Treatments	دمای هوای ورودی Inlet Air Temperature (◦C)	دبی خوراک Feed Flow Rate (ml/min)	راندمان بازیابی فعالیت آنزیمی Enzyme activity recovery efficiency(%)		دمای هوای خروجی Outlet Air Temperature (◦C)		رطوبت پودر Powder Moisture(%)	
1	120	4	113 ± 4.55	b	2±87	a	4.55 ± 0.14	b
2	120	6	146 ± 5.12	a	85±2	a	5.36 ± 0.20	c
3	140	4	30 ± 1.35	d	108±2	b	3.73 ± 0.17	a
4	140	6	50 ± 2.27	c	105±2	b	4.88 ± 0.12	b

میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنادار (p<۰/۰۵) هستند
The means with different letters within the columns, have significant differences (p<0.05).

براساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌ها، برای خشک کردن آنزیم آمیلاز قارچی دو عامل دما و دبی ورود خوراک بر حفظ فعالیت آنزیم پس از خشک شدن موثر بودند به‌طوری‌که دمای هوای ورودی کمتر و سرعت ورود خوراک بیشتر، موجب حفظ فعالیت آمیلازی بیشتری در پودر گزارش شده است (Samborska *et al*., 2005) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر، دمای هوای ورودی ۱۱۰ درجه سلسیوس برای خشک‌کردن پاششی پروتئاز از *باسیلوس سوبتیلیس* نوترکیب، که به‌عنوان دمای مناسب گزارش شده است و دمای هوای ورودی بیشتر موجب کاهش فعالیت آنزیم و تغییر ساختاری آنزیم عنوان شده است(Taylor *et al*., 2007). لی و همکاران (Li *et al*., 2021) در پژوهشی اثر دمای هوای ورودی در محدودهٔ ۱۲۰-۱۶۰ درجه سلسیوس و دبی خوراک در محدودهٔ ۱۲-۸ لیتر برساعت را بر خشک کردن پاششی آنزیم ناتوکیناز بررسی کردند و نشان دادند با افزایش دمای هوای ورودی، کاهش رطوبت پودر و کاهش فعالیت ناتوکیناز مشاهده شده است و با افزایش دبی خوراک ورودی رطوبت پودر نیز افزایش یافته است. شرایط بهینهٔ خشک کردن ناتوکیناز دمای هوای ورودی ۱۴۰ درجه سلسیوس و دبی خوراک ۸ لیتر بر ساعت برای تولید پودر با فعالیت آنزیمی بیشتر و رطوبت ۴/۱ درصد گزارش شده است. در پژوهشی دیگر دمای هوای ورودی ۱۲۰ درجه سلسیوس و دبی خوراک ورودی ۳۵ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان شرایط بهینهٔ خشک کردن پاششی آنزیم زایلاناز و آمیلاز معرفی شده است. رطوبت پودر در شرایط بهینهٔ این مطالعه ۵/۷ درصد گزارش شده است(Suresh *et al*., 2019). با افزایش دبی خوراک ورودی رطوبت بیشتری در پودر باقی می‌ماند که در تطابق با نتایج این پژوهش است.

میزان رطوبت یکی از ویژگی‌های مهم محصولات پودری است. اگرچه آب معمولاً برای حفظ یکپارچگی مولکول‌های زیستی و پروتئین‌ها مورد نیاز است، اما مکانیسم‌های تخریب فیزیکی و شیمیایی متفاوتی را در فرایندهای خالص‌سازی و نگهداری پروتئین‌ها فعال می‌کند. بر این اساس، برای حفظ پایداری فیزیکی، شیمیایی و میکروبی محصول، مقادیر کم رطوبت مطلوب‌تر است. نوع حامل‌ها نیز

می‌تواند علاوه بر شرایط عملیاتی خشک‌کردن بر رطوبت محصول اثر گذار باشد. در تحقیقی روی خشک کردن لیپاز با استفاده از نانو خشک‌کن پاششی ، کمترین درصد رطوبت (۱/۶ درصد) در حضور مانیتول و بیشترین درصد رطوبت (۶/۴ درصد) در حضور لاکتوز گزارش شده‌است (Abdel-mageed et al., 2021) . در این پژوهش، استفاده از ترکیب منیزیم سولفات و عصارهٔ مالت موجب حفظ فعالیت آنزیم در فرایند خشک کردن پاششی و همچنین تولید پودر با درصد رطوبت مناسب شده است.

نتیجه گیری

آنزیم زایلاناز از آنزیم‌های مهم در صنایع غذایی و تغذیهٔ طیور محسوب می‌شود. در این پژوهش، آنزیم زایلاناز توسط سویه *باسیلوس سابتیلیس* D3d تولید و ترکیبی از mM ۱۰سولفات منگنز، (w/v) ۲۰ درصد منیزیم سولفات و (w/v) ۵ درصد عصارهٔ مالت برای حفظ فعالیت آنزیمی در فرایند خشک کردن پاششی استفاده شد. در عملیات خشک‌کردن پاششی، آنزیم زایلاناز فرموله شده در دمای ورودی ۱۲۰ درجه سلسیوس، دبی خوراک ورودی ۴ میلی لیتر بر دقیقه و دبی هوای پاششی ۸/۵ لیتر بر دقیقه، فعالیت آنزیمی حفظ می‌شود و پودری با رطوبت ۴/۵ درصد به‌دست می‌آید. بررسی عملکرد پودر آنزیمی حاصل از این پژوهش در بهبود بافت نان، شفاف‌سازی آب‌میوه و تولید پری‌بیوتیک‌های زایلوالیگوساکاریدی و همچنین فرمولاسیون آنزیم زایلاناز سویه *باسیلوس سابتیلیس* D3d به نحوی که در شرایط اسیدی دستگاه گوارش طیور پایداری مناسبی داشته باشد، می‌تواند در مطالعات آتی مورد توجه قرار بگیرد.

قدردانی

این پژوهش با هزینه کرد پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکروبی اجرا شده است. بدین‌وسیله از همهٔ کسانی که در روند تصویب، تامین اعتبار و اجرای این پژوهش مساعدت کرده‌اند قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر تبعیت کرده و از موارد سوء اخلاق از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

منابع

Abdel-Mageed, H.M., Fouad, S.A., Teaima, M.H., Radwan, R.A., Mohamed, S.A., and AbuelEzz, N.Z., 2021. Engineering Lipase Enzyme Nano-powder Using Nano Spray Dryer BÜCHI B-90: Experimental and Factorial Design Approach for a Stable Biocatalyst Production. Journal of Pharmaceutical Innovation. 16, 759–771.

Bagewadi, Z.K., Mulla, S.I., and Shouche, Y., 2016. Xylanase production from Penicillium *citrinum* isolate HZN13 using response surface methodology and characterization of immobilized xylanase on glutaraldehyde-activated calcium-alginate beads. 3 Biotech 6, 1–18.

Bailey, M., Biely, P., and Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology. 23(3): 257–270.

Bajaj K, B., and Manhas, K., 2012. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. Biocatalyst and Agricultural Biotechnology. 1(4): 330–337.

Bajaj, P., and Mahajan, R., 2019. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. Applied

Microbiology and Biotechnology. 103, 8711–8724.
Bala, A., and Singh, B., 2017. Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould Sporotrichum thermophile in solid state fermentation and their applicability in bread making. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 33, 1-10.
Bhardwaj, N., Kumar, B., and Verma, P., 2019. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. Bioresource and Bioprocessing. 6, 1-36.
Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., and Sultan, M.T., 2008. Xylanases and their applications in baking industry. Food Technology and Biotechnology. 46(1): 22–31.
Cunha, L., Martarello, R., Souza, P.M. De, Freitas, M.M. De, Vanio, K., Barros, G., Ximenes, E., Filho, F., Homem-de-mello, M., and Magalhães, P.O., 2018. Optimization of Xylanase Production from *Aspergillus foetidus* in Soybean Residue. Enzyme Research. 2018, 7–14.
Hoeck, V. Van, Wu, D., Somers, I., Wealleans, A., Vasanthakumari, B.L., Sanchez, A.L.G., and Morisset, D., 2021. Xylanase impact beyond performance: a prebiotic approach in broiler chickens. Journal of Applied Poultry Research. 30, 100193–100210.
Kaushal, J., Khatri, M., Singh, G., and Arya, S.K., 2021. A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: An elaborate review on xylanase. International Journal of Biological Macromolecules. 193, 1350–1361.
Li, G., Li, T., He, F., Chen, C., Xu, X., Tian, W., Yang, Y., He, X., Li, H., Chen, K., Hao, N., and Ouyang, P., 2021. Microencapsulation of nattokinase from fermentation by spray drying: Optimization, comprehensive score, and stability. Food Science and Nutrition. 9(7): 3906–3916.
Madende, M., and Madende, P., 2023. Chapter 14 - Application of enzymes in producing bioactive oligosaccharides and peptides for the beverage industry, in: Kuddus, M., Hossain, M.B.T.-V.-A. in B. through E.T. (Eds.), Academic Press, pp. 235–250.
Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid for the determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3), 426–428.
Min, B.J., Park, Y.S., Kang, S.W., Song, Y.S., Lee, J.H., Park, C., Kim, C.W., Kim, and S.W., 2007. Statistical optimization of medium components for the production of xylanase by *Aspergillus niger* KK2 in submerged cultivation. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12, 302.
Moteshafi, H., Mousavi, S.M., and Hashemi, M., 2019. Aeration challenge in high BSG suspended fermentation: Impact of stirred-tank bioreactor scale. Biomass and Bioenergy 130, 1–6.
Moteshafi, H., Mousavi, S.M., and Hashemi, M., 2016. Enhancement of xylanase productivity using industrial by-products under solid suspended fermentation in a stirred tank bioreactor, with a dissolved oxygen constant control strategy. RSC Advances. 6(42): 35559–35567.
Olatidayo, S., Bukola, T., Oluwadare, A., Oladiti, O., and Juwon, D., 2022. Production and biochemical characterization of partially purified cellulase-free, thermo-acidophilic endoxylanase from *Lysinibacillus fusiformis* strain TB7 using kola nut husk as feedstock. Heliyon 8(10): 11106–11116.
Rezaul, M., Shishir, I., and Chen, W., 2017. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. Trends Food Science Technology. 65, 49–67.
Samborska, K., Witrowa-Rajchert, D., and Gonçalves, A., 2005. Spray-drying of α-amylase - The effect of process variables on the enzyme inactivation. Drying Technology. 23(4): 941–953.
Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J., and Cavaco-Paulo, A., 2018. Practical insights on enzyme stabilization. Critical Reviews in Biotechnology. 38(3): 335–350.
Suresh, G., Santos, D.U., Rouissi, T., Brar, S.K., Mehdi, Y., Godbout, S., Chorfi, Y., and Ramirez, A.A., 2019. Production and in-vitro evaluation of an enzyme formulation as a potential alternative to feed antibiotics in poultry. Process Biochemistry. 80, 9–16.
Taylor, P., Namaldi, A., Çalik, P., Uludag, Y., Namaldi, A., and Pinar, C., 2006. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. Drying Technology. 24(11):1495-1500
Vasconcellos, V.M., Tardioli, P.W., Giordano, R.L.C., and Farinas, C.S., 2016. Addition of metal ions to a (hemi) cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and

efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. New Biotechnology. 33(3): 331–337.

Zhang, Y., Liu, C., Yang, M., Ou, Z., Lin, Y., Zhao, F., and Han, S., 2022. Characterization and application of a novel xylanase from Halolactibacillus miurensis in wholewheat bread making. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 1–12.

Food Engineering Research/Vol.22/No.74/Spring & Summer 2023/P: 181-194

Journal Home page: https://fooder.areeo.ac.ir/

Original Research

The effect of additives, carriers, and variables of Spray Drying Process on the Stability of Xylanase

H. Moteshafi[1*], M. Hashemi[2*]

*** Corresponding Author**: [1]Assistant Professor, Animal Product Processing department, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [2] Professors, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Email: moteshafi@asri.ir, hashemim@abrii.ac.ir
Received:9 October 2022 **Accepted**: 14 March 2023
http://doi: 10.22092/FOODER.2023.360226.1345

Abstract:

Xylanase is one of the critical enzymes in the food, poultry feed as well as paper industries. This research aims to provide formulation and operating conditions suitable for spray drying of xylanase enzyme while maintaining enzyme activity. For this purpose, the xylanase was produced by *Bacillus subtilis* D3d strain using Brewers' spent grain (BSG) and yeast extract as carbon and nitrogen source in a 14-liter fermenter. After separating biomass and solid substrate by centrifuge, the supernatant was used as an enzyme source with a xylanase activity of 350 U/ml. Among the additives, manganese ions at a concentration of 10 mM had the most significant effect on increasing enzyme activity. Among the examined carriers, mannitol and magnesium sulfate showed the slightest decrease in enzyme activity. Magnesium sulfate and malt extract were selected as carrier and binder in concentrations of 20 and 5, (w/v) respectively. In the spray drying operation with an inlet temperature of 120°C, and an inlet feed flow rate of 4 ml/min, the enzyme activity was maintained and the powder with the 4.5% of moisture content was obtained.

Keywords: Stability, Spray dryer, Xylanase, Enzyme activity