مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1390 ، دوره سوم، شماره دهم، صفحه 52-45

بررسی اثر سلولاز جداسازی شده از قارچ آسپرژیلوس نایجر بر کیفیت چای شمال ایران

امیر آراسته[1]، ریحانه سریری[2]، فاضل نجفی یاسوری[2]، علی صالح زاده[1]، محمود نجفیان[3]

1. رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
2. رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
3. جهرم، دانشگاه آزاداسلامی واحد جهرم، گروه زیست شناسی

نویسنده مسؤول: امیر آراسته. دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی. a.arasteh@iaurasht.ac.ir

دریافت: 90/7/1 پذیرش: 90/9/6

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهمترین میکروارگانیزم های همزیست گیاه چای، آسپرژیلوس نایجر است. این قارچ با تولید خارج سلولی سلولاز موجب تجزیه و تخمیر برگهای چای در حین مرحله فرآوری شود. چای پر مصرف ترین نوشیدنی در جهان است و دامنهٔ تفاوت‌های موجود در طعم و کیفیت آن ناشی از رویدادهای متابولیکی پیچیده‌ای است که در حین فرآوری برگ ها رخ می دهد لذا بررسی اثر آنزیم های قارچی، اهمیت بالایی دارد. هدف از این تحقیق مطالعه برداشت آنزیمی این سد مکانیکی و اثر آن بر کیفیت چای می باشد.

روش بررسی: از روش سوموگی- نلسون برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. سایر فاکتور های سینتیکی شامل فعالیت، فعالیت ویژه، دما و pH بهینه و پایداری آنزیمی نیز برای آنزیم بدست آمده از قارچ آسپرژیلوس نایجر بدست آمده و برای نمونه های آنزیمی مختلف با هم مقایسه شد. تاثیر آنزیم به دو صورت عصاره خام و تخلیص شده بر روی میزان تقویت حضور فاکتور های کیفی چای، شامل تیافلاوین، تیاروبیجین، رنگ تام محلول و شفافیت محلول، در حین مرحله فرآوری بررسی شد.

یافته ها: با افزایش خلوص آنزیمی، فعالیت ویژه و محتوای پروتئینی همزمان افزایش یافت. همچنین فاکتور های کیفی نیز در هر مورد افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق مشخص شد که استفاده از آنزیم سلولاز قارچی در حین مرحله فرآوری موجب افزایش میزان فاکتور های کیفی چای می شود. در این مورد اثر آنزیم تخلیص شده بسیار بیشتر از آنزیم موجود در عصاره خام است.

واژه‌های کلیدی: کیفیت چای، سلولاز، آسپرژیلوس، اسپکتروفوتومتری، پلی فنول

www.SID.ir

مقدمه

امروزه چای بعنوان یکی از پرطرفدار ترین نوشیدنی ها در جهان مطرح است و ویژگی های کاربردی و اثرات فیزیولوژیکی آن بر روی سیستم های زنده، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است (1). از این رو بررسی عوامل مختلف بر روی کیفیت این محصول در سطح اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد (2). در سال 1965، تغییرات کمی پلی فنول های چای در حین پردازش برگ ها و ارتباط آن با ویژگیهای کیفی چای توسط باهاتیا و همکارانش بررسی شد (3) و در همان سال فاکتورهای کیفی چای توسط شخصی بنام ساندرسون از نظر شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. انواع چای براساس زمان فراوری شامل سه دسته سبز، قرمز و سیاه می باشد (4). چای سبز که کمترین زمان تخمیر را داراست، بلافاصله پس از چیده شدن برگ ها، تیمار حرارتی روی آن انجام می گیرد که شامل حرارت دادن و عرق گیری می باشد. دم کرده این چای، سبز رنگ است. در عوض چای قرمز، متوسط زمان فرآوری را تجربه کرده و پس از دم کردن برنگ قرمز در می آید (5).

چای سیاه عمومی ترین نوع تجاری چای است و با بیشترین میزان اکسیداسیون آنزیمی در حین فرآوری تهیه می شود و بیشترین زمان تخمیر را در حین تخمیر تجربه می کند. چای قرمز نوع دیگری از چای است که مدت زمان تخمیر در حین تهیه آن نسبت به چای سیاه کوتاهتر بوده و لذا ترکیبات پلی فنولی در آن اکسیداسیون کمتری را متحمل می شوند. چای سبز چایی است که تخمیری روی آن صورت نگرفته است و پس از چیده شدن برگ ها، تیمارحرارتی روی آن انجام می گیرد که شامل حرارت دادن و عرق گیری می باشد و پس از خشک شدن به صورت دم کرده مورد استفاده قرار می گیرد که سبز رنگ است. فرایند اکسیداسیون، در مرحلهٔ تخمیر و بلافاصله پس از چیدن برگ های سبز چای انجام می‌گیرد. در حین تخمیر با عملکرد آنزیم های سلولولیتیک مترشحه از انواع میکروارگانیزم ها، سد مکانیکی یا دیواره سلولی حایل بین آنزیم پلی فنول اکسیداز و پلی فنولهای موجود در سیتوپلاسم برگ چای برداشته شده و امکان انجام عمل پلمیریزاسیون اکسیداتیو بر روی پلی فنولهای چای فراهم می گردد. تیروزیناز (EC: 1,14,18,1) که یکی از انواع متالوآنزیم ها است (ساختمان آن حاوی مس است) از جمله این پلی فنول اکسیدازها محسوب می شود (6). کاتچین ها و سایر ترکیبات پلی فنولی موجود در برگ چای در طی این فرایند، پلیمریزه شده و ترکیبات قرمز مایل به قهوه ای بنام تیافلاوین و تیاروبیجین را بوجود می آورند که مسئول رنگ و بوی منحصر به فرد چای سیاه می‌باشند. تیافلاوین ها، کاتچین های دیمری هستند که در ایجاد رنگ زرد- نارنجی چای سهیم هستند و در طی فرایند تخمیر چای سیاه حاصل می شوند. این کار از طریق اکسیداسیون عامل هیدروکسی حلقهٔ B در کاتچین کینون ها مثل اپی کاتچین (EC) و یا یک گالوکاتچین کینون (حلقهٔB با سه عامل هیدروکسی) مثل اپی گالو کاتچین، صورت می گیرد. با این وجود تیافلاوین ها کاملا پایدار نیستند و می‌توانند به تیاروبیجین اکسید شوند. تیارو بیجین ها، گروه های هتروژن از پلیمرهای کاتچینی هستند که می توانند مستقیما از کاتچین‌ها بوجود آیند. البته در برگ چای علاوه بر پلی فنولها، ترکیباتی مثل کافئین، تئوفیلین، تئوبرومین، تانن، اسید اسکوربیک و برخی اسید های آمینه و نمک ها نیز وجود دارند (7-9). در روشهای سنتی فرآوری چای از فرایند CTC برای برداشتن سد مکانیکی بین آنزیم پلی فنول اکسیداز و سوبسترای پلی فنولی آن استفاده می شود (10).

سلولز پلیمر کریستالین از D-گلوکز است که با نظم خاصی در طبیعت و بافت های سلولزی کنار هم چیده شده است. در این حالت اکثر میکروارگانیزم ها قادر به تجزیه آن نیستند و فقط بعضی از آنها قادر به تولید سلولاز های تجزیه کنندهٔ سلولز کریستالین می باشند. محصول این سلولازها، سلولز آمورف می باشد که توسط گروه دوم سلولازها مورد تجزیه قرار می گیرد و تولید محصولاتی با تعداد منومر های قندی مختلف می‌نمایند. مرحلهٔ آخر تجزیهٔ سلولز، تبدیل این محصولات چند قندی به واحدهای دو قندی بنام سلوبیوز و تجزیهٔ سلوبیوز توسط سلوبیاز است. سلولازها که پیوندهای گلیکوزیدی در سلولز را هیدرولیز می کنند، می توانند به چهار خانوادهٔ پروتئینی مختلف، تقسیم بندی شوند. اندوبتاگلوکاناز پیوندهای گلیکوزیدی را بصورت تصادفی و از درون یک زنجیرهٔ سلولزی هیدرولیز می کند درحالیکه اگزوبتاگلوکاناز پیوندهای گلیکوزیدی را از انتهای غیر احیاء کنندهٔ سلولز هیدرولیز می کند. سلوبیوهیدرولاز (CBH) پیوندهای گلیکوزیدی را از انتهاهای غیر احیاء کنندهٔ زنجیرهٔسلولز میکروکریستالین هیدرولیز می کند و محصول آن سلوبیوز می باشد و نهایتا بتا گلوکوزیداز یا سلوبیاز که مسئول هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی در سلوبیوز می باشد و محصول آن گلوکز است. در این تحقیق، آنزیم های سلولولیتیک مورد نیاز از قارچ

www.SID.ir
Archive of SID

آسپرژیلوس نایجر همزیست با چای جداسازی شده و برای بهبود کیفی چای استفاده شد.

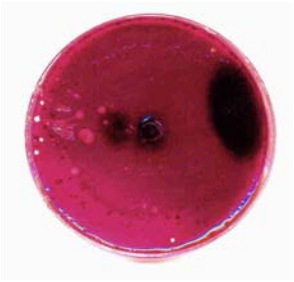
روش بررسی

برای جداسازی قارچ های جنس آسپرژیلوس همزیست با گیاه چای به ترتیب از محیطهای کشت نوترینت آگار، سابورو دکستروز آگار و محیط سورانژیوم که محیط کشت اختصاصی تست تشکیل هاله برای سنجش فعالیت سلولاز است استفاده گردید. محیط کشت سورانژیوم شامل نمک های نیترات پتاسیم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم، سولفات منیزیم، کلرید کلسیم و کلرید آهن و نیز آگار و آب شهری است که تنها منبع کربن آن پودر سلولز میکروکریستالین (Merck, Germany) بوده و بر روی آن فقط میکروارگانیزم های سلولاز مثبت قادر به رشد هستند. مقادیر کمی ترکیبات تشکیل دهنده این محیط بعنوان محیط اختصاصی جداسازی در جدول 1 آورده شده است.

جدول 1. اجزای محیط کشت سورانژیوم

اجزای محیط کشت	میزان کمی برحسب گرم بر لیتر
KNO_3	1/5
K_2HPO_4	1/5
$Mg\ SO_4$	0/2
$CaCl_2$	0/1
$FeCl_3$	0/02
Agar	15
Cellulose	10
Tap water	1 لیتر

از خیسانده برگ چای در آب شهری بعنوان منبع میکروبی استفاده شد. جدا سازی اولیه به مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتی گراد بر روی محیط نوترینت آگار صورت گرفته و تمامی گونه های قارچی حاصل از این مرحله در محیط سابورو دکستروز آگار و با روش کشت خالص با فیلدوپلاتین خالص سازی شدند. شناسایی قارچ جنس آسپرژیلوس از بین قارچ های سلولاز مثبت خالص شده بر روی محیط سابورو دکستروز آگار به روش Slide culture انجام شده. علاوه بر این، اسلاید تهیه شده از کلنی های خالص با میکروسکوپ نوری و با عدسی 10x مورد مطالعه قرار گرفته و با اطلس تصویری میکروبیولوژی (Burton E. Pierce 2004) مقایسه شد. از کلنی‌های خالص شده بعنوان منبع میکروبی جهت کشت در محیط جامد سورانژیوم استفاده گردید. نمونه ها برای مدت 8 روز در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار گرفته و در طی این مدت قارچ های تولید کننده سلولاز از تنها منبع کربنی موجود در محیط استفاده کرده و مجال رشد پیدا کردند. از تست تشکیل هاله و رنگ قرمز کنگو برای اثبات حضور سلولاز در محیط استفاده گردید که مبنای آن بر انتشار سلولاز در محیط کشت جامد حاوی آگار و سلولوز و تشکیل هالهٔ قرمز شفاف در اطراف کلنی‌های رشد کرده در یک زمینه کدر است (11).



شکل 1. تست تشکیل هاله برای سنجش فعالیت سلولاز

محیط اختصاصی آسپرژیلوس با شرایط و ترکیبات بهینه جهت تولید سلولاز استفاده گردید. قبل از آن نمونه ها در یک محیط پیش کشت حاوی آب، نمک های مختلف و پپتون تکثیر شده و سپس یک دهم حجم از آن در شرایط استریل به محیط کشت اصلی وارد شد. در این محیط نمونه ها برای 54 ساعت در دمای 35 درجه سانتی گراد با دور 100 rpm قرار گرفتند. جدول 2 مقادیر کمی ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت اصلی را نشان می دهد.

جدول 2. اجزای محیط اصلی تولید سلولاز

اجزای محیط کشت	میزان کمی برحسب گرم بر لیتر
Cellulose	30
L-glutamic Acid	0/3
NH_4NO_3	1/4
Tween 80	2 میلی لیتر
$KH_2\ PO_4$	2
$CaCl_2$	0/3
$MgSO_4$	0/3
Peptone	0/75
$FeSO_4, 7H_2O$	0/005
$MnSO_4,H_2O$	0/0016
$ZnSO_4,7H_2O$	0/0014
$CoCl_2$	0/002
Distilled water	1 لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

اولین منبع آنزیمی یا همان عصاره خام از سانتریفوژ محیط کشت در دمای 25 درجه سانتی گراد تهیه شده و منبع آنزیمی غنی تر از رسوبدهی با حلال آلی (نسبت 2 به 1 از اتانول و استون) بدست آمد. رسوب حاصل از حلال آلی پس از جداسازی و خشک شدن با استفاده از ستون کروماتوگرافی 45 سانتی متری حاوی سفادکس G_{100} تخلیص گردید. فعالیت بیولوژیکی سلولاز با روش کالریمتری سوموگی- نلسون (11-12) و میزان پروتئین کل به روش لوری اندازه گیری شد (13) و وزن مولکولی آنزیم بروش الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) و با استفاده از مارکر وزن مولکولی اندازه گیری و مورد تائید قرار گرفت. جهت تعیین دمای اپتیمم، مخلوط 1 به 1 از آنزیم و سوبسترا بمدت 30 دقیقه در دماهای مختلف (بین90-30 درجه) قرار داده و سپس فعالیت آنها اندازه گیری شد. به منظور تعیین پایداری حرارتی، نمونه ها را در دماهای مختلف از 50 تا 90 درجه سانتی گراد و قبل از مخلوط نمودن آنزیم با سوبسترا بمدت 15 دقیقه در بافر فسفات 0/1 مولار با pH برابر 6 قرار داده و پس از سرد کردن سریع و افزودن سوبسترا، میزان فعالیت آنزیمی به روش سوموگی- نلسون تعیین شد (11). در این تحقیق از دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل (ultra spec 3000) از شرکت pharmacia، استفاده شد. ویژگی های سلولاز جداسازی شده از قارچ های همزیست چای در عصاره خام و پس از رسوبدهی با حلال آلی (یک حجم استون و دو حجم اتانول) در جدول 3 نشان داده شده است.

یک جوانه و دو برگ انتهایی ساقه های نورسته گیاه چای پس از خردشدن، مورد تیمار آنزیمی با دو منبع بدست آمده قرار گرفتند. هر دو نمونهٔ آنزیمی (عصاره خام و منبع حاصل از رسوب دهی با حلال آلی) بر روی برگها اسپری شده و نمونه ها برای مدت 45 دقیقه در دمای اتاق جهت تأثیر گذاری آنزیم قرار گرفتند. برای متوقف کردن اثر آنزیم از دمای 120 درجه سانتی گراد بمدت 20 دقیقه استفاده شد تا نمونه ها برای سنجش کمی پلی فنول ها آماده شوند (3). برای تعیین وزن خشک، 15 گرم از برگ های خرد شده به دقت وزن شده و برای حداقل 16 ساعت در دمای 103 درجه سانتی گراد قرار گرفت و میزان درصد وزن خشک برگ ها (DM) محاسبه گردید (3).

برای آنالیز محتوای تیافلاوین تام به روش فلاووگنوست میزان 9 گرم از برگ های چای خرد شده را در 375 میلی لیتر از آب جوش دم کرده و پس از 10 دقیقه تکان دادن، توسط یک پارچهٔ کتانی تمیز صاف گردید. فرایند استخراج با حلال توسط ایزوبوتیل متیل کتون به نسبت یک به یک با محلول سرد شده چای انجام شده و محلول رویی برای تست سنجش کمی تیافلاوین استفاده گردید. برای این کار 2 میلی لیتر محلول بدست آمده با 4 میلی لیتر از اتانول و 2 میلی لیتر از معرف فلاووگنوست مخلوط گردید. از این محلول پس از 15 دقیقه به عنوان نمونه فتومتریک استفاده گردید. میزان میکرومول بر گرم از تیافلاوین در نمونهٔ چای خردشده از فرمول زیر قابل محاسبه می باشد (3, 14).

$$\text{میکرومول بر گرم تیافلاوین} = A_{625} \times 47/9 \times 100 / DM$$

اندازه گیری رنگ تام محلول بر روی 5 میلی لیتر از محلول صاف شدهٔ دم کرده چای انجام شد. محلول حاصله در یک فلاسک 100 میلی لیتری به شدت تکان داده شده و سپس جذب محلول حاصله در مقابل آب مقطر بعنوان بلانک در 460 نانومتر خوانده شد (3, 15). میزان رنگ تام محلول در دم کرده چای با استفاده از فرمول زیر قابل محاسبه است.

$$\text{رنگ تام محلول} = (A_{460} \times 10) / (DM/100)$$

روش روبرت و اسمیت (3, 15) برای تعیین میزان درصد تیاروبیجین تام استفاده شد. در این روش با سنجش میزان جذب در طول موج 460 نانومتر، میزان درصد شفافیت محلول چای با استفاده از فرمول زیر قابل محاسبه می باشد:

$$\text{درصد تیاروبیجین تام} = (375 \times 0/02 \times 6/25 [2A_D + A_A - A_C]) / (0/733 \times 9 \times DM/100)$$

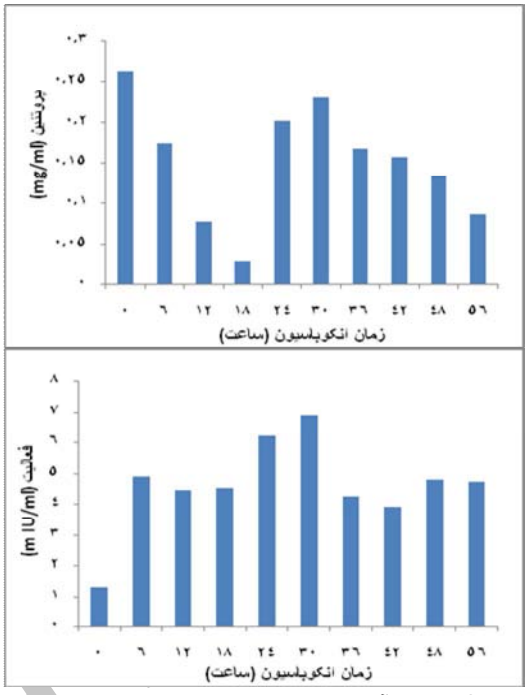
میزان درصد شفافیت محلول چای با تعیین میزان جذب در طول موج 460 نانومتر و با استفاده از فرمول زیر قابل محاسبه می باشد (3).

$$\text{درصد شفافیت محلول چای} = (100 \times A_C) / (A_A + 2A_B)$$

یافته ها

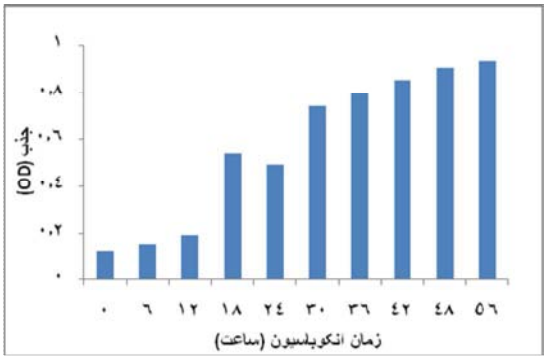
میزان کمی پروتئین در محیط کشت اصلی در زمان های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و همانطور که در شکل 2 نشان داده شده است، بیشترین میزان پس از گذشت 30 ساعت از آغاز تولید سلولاز مشاهده شد.

Archive of SID
www.SID.ir



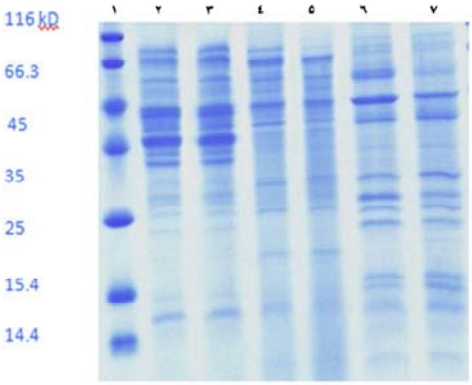
شکل 2. فعالیت آنزیم و میزان کمی پروتئین در حین فرایند تولید آنزیم

به منظور تأیید حضور آنزیم از تست فعالیت آن در محیط کشت اندازه گیری شد که نتایج آن در تائید حضور آنزیم در محیط است. کمترین میزان فعالیت مربوط به شروع دورهٔ تولیدی آنزیم بود که نظیر این میزان در طی تولید مشاهده نشد. بررسی فتومتریک رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر نیز به منظور تأیید نتایج دو تست قبلی انجام شد. همانطور که در شکل شماره 3 نشان داده شده است، با شروع فرایند تولید، میزان کدورت محیط نیز افزایش یافته و همزمان با تولیدات پروتئینی و آنزیمی در محیط، رشد میکروبی نیز وجود داشته است.



شکل 3. تست رشد میکروارگانیزم ها بروش کدورت سنجی در حین فرایند تولید آنزیم

با توجه به تائید حضور بالاترین میزان آنزیم پس از گذشت 30 ساعت از زمان شروع تولید، از آنزیم های بدست آمده در این مرحله هم بعنوان عصارهٔ خام و هم جهت رسوب دهی با حلال استفاده شده و میزان فعالیت آنزیمی بر حسب (IU/ml) و پروتئین تام موجود بر حسب (mg/ml) اندازه گیری شد. شکل 4 تصویر مربوط به ژل SDS Page را همراه با مقادیر وزن مولکولی مارکر نشان میدهد. همانطور که در شکل مشخص است، حضور آنزیم در محدوده 42-45 کیلو دالتون تائید می شود.



شکل 4. تصویر مربوط به ژل SDS Page همراه با مارکر وزن مولکولی (ستون شماره 1 مربوط به مارکر وزن مولکولی و ستون های 2 و 3 مربوط به استخراج با اتانول، ستون های 4 و 5 مربوط به استخراج با استون و ستون های 6 و 7 مربوط به روش استخراج با نسبت 2 به 1 از اتانول و استون می باشند)

فعالیت بیولوژیکی آنزیم در حالت خام و تخلیص شده در جدول 3 با هم مقایسه شده اند. میزان دمای بهینه برای فعالیت آنزیم حدود 50 درجه سانتیگراد است و مقادیر K_m و V_m برای هر دو شکل آنزیمی مشابه یکدیگر بوده و به ترتیب 2/5 میلی گرم بر میلی لیتر و 32 IU/ml می باشد.

جدول3. ویژگی های دو نمونه آنزیمی

ویژگی آنزیمی	در عصاره خام	پس از رسوبدهی با حلال
دمای اپتیمم (°C)	50	50
pH اپتیمم	7/5	7
پایداری حرارتی (°C)	87	92
K_m (mg/ml)	2/5	2/4
V_m (IU/mg)	33	30
وزن مولکولی (kDa)	40-42	40-42

Archive of SID

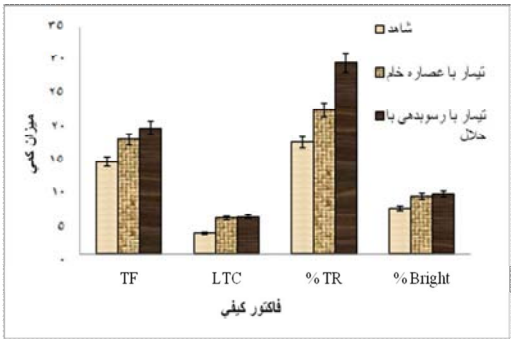
www.SID.ir

در جدول 4 میزان پروتئین تام، فعالیت کل و فعالیت ویژه سلولاز در نمونه خام و با مقادیر مربوط به نمونه تخلیص شده مقایسه شده است. گرچه روش تخلیصی استخراج با اتانول منجر به خالص سازی کامل آنزیم نشده است ولی مشاهده می شود که میزان فعالیت ویژه در این شکل تخلیص شده حدود پنج برابر آنزیم خام می باشد (0/133 نسبت به 0/026). با توجه به قیمت نسبتا ارزان تخلیص نسبی آنزیم می توان این روش در مقیاس صنعتی نیز سود جست.

جدول 4. مقایسه مؤلفه‌های فعالیت و غلظت دو نمونهٔ آنزیمی

نمونه آنزیمی	حجم (ml)	فعالیت (IU/ml)	غلظت پروتئین (mg/ml)	فعالیت کل (IU)	غلظت کل (mg)	فعالیت ویژه (IU/mg)
عصاره خام	20	0/006	0/230	0/120	4/6	0/026
رسوب داده شده با اتانول	5	0/008	0/060	0/040	0/3	0/133

شکل 5 تاثیر سلولاز را در عصاره خام و پس از رسوبدهی با حلال آلی بر روی مقادیر کمی هر یک از فاکتورهای کیفی نشان می دهد.



شکل 5. میزان کمی فاکتورهای کیفی چای برای حالات مختلف تیمار آنزیمی (TF: تیافلاوین، LTC: رنگ تام محلول در چای، %TR: درصد تیاروبیجین تام و %Bright: درصد شفافیت محلول چای)

بحث

میزان فعالیت آنزیم هر 6 ساعت یکبار در حین تولید سنجش شد که بالاترین آن مربوط به ساعات 24-30 می باشد. سنجش پروتئین تام نیز برای محاسبهٔ میزان فعالیت ویژه، در همین دوره زمانی انجام شد. این مطلب موید افزایش واقعی میزان تولید آنزیم در حین فرایند تولید می باشد (16). با مقایسهٔ مقادیر فعالیت ویژه در نمونهٔ آنزیمی مورد استفاده در این تحقیق، مشخص شد که محتوای آنزیم نسبت به حالت خام، چند برابر شده است از این رو تاثیرات قوی تری بر روی پارامتر های کیفی چای دارد. این مطلب را می توان به تجزیه بیشتر رشته های سلولزی در دیواره سلولی برگهای چای در حین فرایند فراوری نسبت داد. فاکتورهای کیفی چای شامل میزان میکرومول برگرم از تیافلاوین، رنگ تام محلول در چای، درصد تیاروبیجین تام، و میزان درصد شفافیت محلول چای برای دو نمونه آنزیمی محاسبه و با نمونه شاهد (بدون اثر تیمار) مورد مقایسه قرار گرفتند. با توجه به نتایج تمامی فاکتور های کیفی چای در مورد نمونه های تیمار شده با شکل تخلیص شده آنزیمی نسبت به حالت تیمار شده با عصاره خام پیشرفت بیشتری داشته اند. البته زمان فرآوری و نیز میزان تولید آنزیم توسط میکروارگانیزم های همزیست گیاه چای در حین فرآوری در این مورد اهمیت فراوانی دارد. قارچ آسپرژیلوس نایجر بعنوان یکی از فعال ترین میکروارگانیزم های همزیست در این میان نقش اساسی را داشته است زیرا حتی با افزایش زمان فرآوری نیز می توان به نتایج خوبی دست یافت (17).

نتیجه گیری

بطورکلی نتایج حاصل موید این مطلب است که میزان کمی فاکتورهای کیفی در تیمار با آنزیم حاصل از رسوبدهی با حلال آلی، بیشترین میزان را نشان می دهد و کمترین میزان مربوط به حالت بدون تیمار (شاهد) می باشد که موید اثرات تقویت کننده آنزیم سلولاز می باشد. این نتایج برای تمامی فاکتور های کیفی چای مورد مطالعه در این تحقیق تائید شده و نشان می دهد هرچه میزان خلوص آنزیمی بالاتر باشد، شاهد میزان ارتقای بیشتری در فاکتور های کیفی چای هستیم.

تشکرو قدردانی

از تمامی دانشجویان و کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه گیلان نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Owuor PO, Wachira FN, Ng'etich WK. *Influence of region of production on relative clonal plain tea quality parameters in Kenya*. Food chemistry. 2010;119:1168-74.
2. Danrong Z, Yuqiong C, Dejiang N. *Effect of water quality on the nutritional components and antioxidant activity of green tea extracts*. Food chemistry. 2009;113:110-4.
3. Murugesan G, Angayarkanni J, Swaminathan K. *Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea*. Food chemistry. 2002;79:411-7.
4. Fraser K, Harrison SJ, Lane GA, Otter DE, Hemar Y, Quek SY, Rasmussen S. *Non-targeted analysis of tea by hydrophilic interaction liquid chromatography and high resolution mass spectrometry*. Food chemistry. 2012.
5. Chen Y, Jiang Y, Duan J, Shi J, Xue S, Kakuda Y. *Variation in catechin contents in relation to quality of 'Oolong tea at various growing altitudes and seasons*. Food chemistry. 2010;119:648-52.
6. Muñoz-Muñoz JL, Garcia-Molina F, Berna J, Garcia-Ruiz PA, Varon R, Tudela J, et al. *Kinetic characterisation of o-aminophenols and aromatic o-diamines as suicide substrates of tyrosinase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2012;1824:647-55.
7. Kuroda Y, Hara Y. *Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 1999;436:69-97.
8. Han C. *Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols*. Cancer letters. 1997;114:153-8.
9. Graham HN. *Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry*. Preventive medicine. 1992;21:334-50.
10. Dangour AD, Dodhia SK, Hayter A, Allen E, Lock K, Uauy R. *Nutritional quality of organic foods: a systematic review*. The American journal of clinical nutrition. 2009;90:680.
11. Sharrock KR. *Cellulase assay methods: a review*. Journal of biochemical and biophysical methods 1988;17:81.
12. Breuil C, Saddler J. *Comparison of the 3, 5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity*. Enzyme and microbial technology. 1985;7:327-32.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of biological chemistry. 1951;193:265-75.
14. Wright LP, Mphangwe NIK, Nyirenda HE, Apostolides Z. *Analysis of the theaflavin composition in black tea (Camellia sinensis) for predicting the quality of tea produced in Central and Southern Africa*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2002;82:517-25.
15. Zhang H, Lin LZ, He XG, Petteruti MP. *Analytical Methods for the Active Components in Tea Products*. Vol. 803: ACS Publications. 2002:214-29.
16. Irwin DC, Spezio M, Walker LP, Wilson DB. *Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects*. Biotechnology and bioengineering. 1993;42:1002-13.
17. Sariri R, Najafi F, Arasteh A. *The effect of cellulase extracted from symbiotic tea fungies on the quality of Iranian tea*. Enzyme and microbial technology. 2006;39:308-10.

Archive of SID

www.SID.ir