نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، ص. ۳۱۳-۳۰۵

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 7, No. 4, 2012, p. 305-313

جداسازی پکتین‌لیاز از آسپرژیلوس نایژر و اثر آن در بهبود فرایند تخمیر در تولید چای سیاه

سیده مهسا دادپور[1*]- مرتضی خمیری[2]- حمیدرضاصادقی‌پور[3]- شیوا روفیگری حقیقت[4]- مهران اعلمی[5]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۲۵

چکیده

تخمیر یکی از فرایندهای مهم در تولید چای سیاه، می‌باشد که در این مرحله با قرار گرفتن سوبسترا در معرض آنزیم، واکنش اکسیداسیون اتفاق افتاده و ترکیبات تعیین کننده خصوصیات کیفی چای، تولید می‌شوند. یکی از عوامل افزاینده این ترکیبات، افزایش میزان تماس بین آنزیم و سوبسترا است که با افزودن آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی برگ میسر می‌گردد. پکتیناز یکی از مهم‌ترین این آنزیم‌ها است و آسپرژیلوس از مهمترین منابع میکروبی در تولید این آنزیم می‌باشد. در این تحقیق آنزیم پکتین‌لیاز از *Aspergillus niger* جداسازی گردید و به کمک روش جداسازی سه فازی از طریق افزودن t-بوتانول به عصاره خام حاوی آنزیم در حضور آمونیوم سولفات خالص‌سازی شد. بازده بدست آمده برای آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* ۵۲ درصد و مرتبه خلوص نهایی آنزیم ۱۶/۶۵ به‌دست آمد. به منظور تعیین اثر آنزیم بر خصوصیات کیفی چای ، آنزیم خام و خالص در مرحله تخمیر چای جهت بهبود پارامترهای کیفی چای به آن اسپری گردید. وزن مولکولی آنزیم خالص، pH اپتیمم و دمای اپتیمم آنزیم به ترتیب ۱۲KDa، ۸ و ۵۰°C مشاهده شد. از بین تیمارهای مورد بررسی، اثر عصاره خام آنزیمی روی پارامترهای کیفی چای بیشتر از آنزیم خالص مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پکتین‌لیاز، *Aspergillus niger* ، جداسازی سه فازی، چای سیاه

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها در طبیعت، دارای انرژی پتانسیل عظیمی هستند. آن‌ها گروه بسیار زیادی از آنزیم‌ها را تولید می‌نمایند که سال‌ها است بصورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند(Dayanand & Patil, 2003). یکی از پر اهمیت‌ترین آنزیم‌ها، پکتیناز می‌باشد که از منابع مختلفی بدست می‌آید پکتیناز میکروبی، ۲۵٪ از کل آنزیم‌های تولیدی در دنیا را تشکیل می‌دهد و می‌توان گفت که تقریبا بیشتر پکتینازهای تجاری تهیه شده از منابع قارچی به دست می‌آیند (Kapoor *et al*., 2001).

یکی از روش‌های جداسازی آنزیم از منابع قارچی، محیط تلقیح مایع حاوی پکتین می‌باشد. این روش شامل تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ مورد نظر در محیط مایع و گرمخانه گذاری آن تا زمان تولید حداکثر میزان آنزیم خام می‌باشد (Kapoor *et al*., 2001).

از روشهای کاربردی برای خالص سازی آنزیم‌ها، روش جداسازی سه فازی[6] می‌باشد که در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Dennison & Lovrein, 1997). جداسازی سه فازی به عنوان مرحله تغلیظ کننده نیز معرفی شده است، این روش همراه با خالص سازی آنزیم‌ها، در افزایش فعالیت کاتالیتیکی آن‌ها نیز نقش دارد (Saxena *et al*.,2007). در این روش، عصاره خام حاوی آنزیم در حضور سولفات آمونیوم با t-بوتانول مخلوط می‌گردد. در این حالت، آنزیم به صورت یک محلول در حد فاصل بین فاز آبی پایین و فاز t-بوتانول در بالا ظاهر می‌شود. فاکتورهای موثر در جداسازی بخش پروتئینی مورد نظر از فاز میانی، غلظت آمونیوم سولفات، حجم t-بوتانول و دما می‌باشد (Sharma & Gupta, 2001). این روش

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: (Email: Mahsa.dadpour@gmail.com
۲و۵- به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه گلستان، گرگان
۴- مربی پژوهش مر کز تحقیقات چای کشور، لاهیجان

6- Three Phase Partitioning(TPP)

Archive of SID
www.SID.ir

برای خالص سازی پروتئین در هر دو مقیاس کم و زیاد با صرف زمان یکسان کارایی دارد (Dennison & Lovrein, 1997).

آنزیم‌های پکتینولیتیک میکروبی پتانسیل عظیمی برای استفاده در صنعت دارند. یکی از کاربردهای مورد توجه این آنزیم در صنعت چای است. چای گیاهی اقتصادی و به عنوان یکی از مهمترین نوشیدنی‌ها در ایران و سایر کشورها محسوب می‌شود. چای سیاه متداولترین فرم مورد استفاده توسط بشر بوده و این نوع چای فرم تخمیر شده کامل برگ گیاه چای است. فرایند تخمیر چای، فرایندی شیمیایی بوده و طی مرحله پلاس و مالش، آنزیم و سوبسترا در معرض هم قرار گرفته و فرایند تخمیر صورت می‌گیرد. یک فرایند تخمیر ایده‌آل، منجر به ایجاد یک تعادل مناسب بین تئافلاوین[1] و تئاروبیگین[2] می‌گردد(Angayarkanni *et al*., 2002).

سرعت تخمیر بستگی به میزان تماس بین آنزیم و سوبسترای مربوطه دارد که هر دو در بافت برگ چای حضور دارند، اما آنزیم‌های پلی‌فنول‌اکسیداز درون سلول‌های اپیدرمی و آوندی قرار دارند، در حالی که سوبسترای کاتکین درون سلول‌های احاطه کننده آوندی وجود دارد (Murugesan *et al*., 2002).

لول کردن برگ چای از طریق غلتاندن، سبب می‌شود تا سلول‌ها دچار تخریب جزئی گردد، درنتیجه، فرایند اکسیداسیون در مرحله تخمیر به صورت ناقص صورت می‌گیرد، اما افزودن آنزیم به طور مصنوعی، دیواره سلولی برگ‌های چای را بیشتر شکسته، منجر به تخریب کامل سلول‌های برگ چای می‌گردد. بنابراین، کاربرد این آنزیم‌ها، سبب بهبود تخمیر توسط واکنش‌گرها می‌شود. گزارش شده است که آنزیم پکتیناز، فاکتور اصلی در تخریب بافت‌های گیاهی می‌باشد (Angayarkanni *et al*., 2002).

تحقیق صورت گرفته، شامل جداسازی و خالص سازی آنزیم پکتین‌لیاز از آسپرژیلوس نایژر[3] توسط روش جداسازی سه فازی، بررسی خصوصیات آنزیمی حاصل از این روش و کاربرد آنزیم در مرحله تخمیر چای جهت بهبود خواص کیفی چای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد و میکروارگانیسم‌ها

قارچ‌های *Aspergillus niger* بصورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروبی ایران خریداری شد. فعال سازی قارچ‌ها روی محیط پوتیتو دکستروز آگار[4] (PDA) بصورت اسلنت آگار و نگهداری در ۳۰°C صورت گرفت.

تهیه عصاره خام حاوی آنزیم

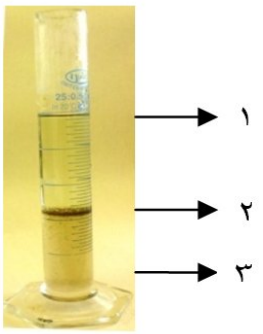
آنزیم پکتین لیاز در محیط تلقیح مایع حاوی پکتین ۱ گرم، L-آسپارژین ۰/۲ گرم، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۰۵ گرم و فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر با ۴/۵ =pH تولید گردید. ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور(دانسیته اسپور^{6}۱۰ ×۵ اسپور در هر میلی‌لیتر) از محیط اسلنت آگار بطور کاملاً استریل در ۱۰۰میلی‌لیتر محیط مایع در فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتر تلقیح گردید. فلاسک‌ها در شیکر- انکوباتور در دمای ۲۵°C تحت شرایط ثابت گرمخانه گذاری شدند. در روز چهارم (حداکثر تولید آنزیم براساس پیش آزمون‌های انجام شده در تحقیق حاضر)، کشت برداشته شد و سانتریفوژ (g × ۱۰۰۰۰، ۲۰ دقیقه، ۴°C) گردید. سوپرناتانت حاصل به عنوان عصاره خام حاوی آنزیم برای مرحله خالص سازی نگهداری شد (Yadav *et al*., 2007).

بررسی میزان رشد میکروارگانیسم

برای بررسی میزان رشد میکروارگانیسم در حین پروسه تولید آنزیم، از روش اسپکتروفتومتری و میزان جذب نور محیط در طول موج ۷۶۰nm استفاده شد.

خالص سازی به روش جداسازی سه فازی

در این مرحله نمک آمونیوم سولفات به نسبت۳۰٪ (وزنی-حجمی) به عصاره خام حاوی آنزیم در دمای ۲۵°C افزوده شد و تا حل شدن کامل نمک، مخلوط گردید، سپس t-بوتانول به نسبت ۱:۱ به مخلوط قبل اضافه گردید. مخلوط حاصل بعد از یک ساعت گرمخانه گذاری در ۲۵ °C ، سانتریفوژ(g× ۲۰۰۰، ۱۰ دقیقه) شد و فاز میانی به عنوان فاز حاوی آنزیم خالص شده، جدا گردید(Pike& Dennison, 1989- Ramalingam & Mulimani, 2004)



شکل۱- خالص سازی آنزیم به روش جداسازی سه فازی.
۱.فاز آلی بالایی(t-بوتانول)، ۲.آنزیم خالص شده، ۳. فاز مایع پایینی

تعیین وزن مولکولی

1- Theaflavin
2- Thearubigin
3 - *Aspergillus niger*
4- Potato Dexterose Agar

Archive of SID

www.SID.ir

خلوص و وزن مولکولی آنزیم توسط روش SDS-PAGE٪۱۲ تعیین گردید. رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بریلیانت بلو[1] R-250 جهت ظاهر شدن باندها صورت گرفت(Laemmli, 1970).

اندازه گیری میزان پروتئین

مقدار پروتئین محلول توسط روش برادفورد و استفاده از بووین سرم آلبومین به عنوان پروتئین استاندارد تعیین گردید(Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیمی پکتین لیاز از طریق اندازه‌گیری افزایش جذب در طول موج ۲۳۵ نانومتر در اثر تشکیل محصول غیر اشباع توسط اسپکتروفتومتر S2000 UV/VIS مدل WPA سنجیده شد. محلول آنزیمی(۰/۲ میلی‌لیتر) به مخلوط واکنش حاوی ۰/۸ میلی‌لیتر پکتین مرکبات(۱w/v٪) و ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار(pH: ۸) در دمای $37\ ^{\circ}C$ افزوده شد. دانسیته نوری در زمان صفر و بعد از ۲۰ دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم با احتساب ضریب خاموشی محصول غیراشباع $5500\ M^{-1}\ cm^{-1}$ بر حسب تولید میکرومولار محصول غیراشباع در هر دقیقه تعیین گردید(Yadav *et al*., 2007).

بررسی خصوصیات آنزیمی

آزمایش‌های انجام شده روی آنزیم شامل تعیین دمای بهینه، پایداری حرارتی، pH بهینه و پایداری آنزیم به pH بود (Yadav *et al*., 2007).

فراوری چای

فرآوری در مرکز تحقیقاتی کارخانه کاشف روی برگ سبز چای نوع هیبرید بومی منطقه فشالم(ایستگاه تحقیقاتی فشالم) واقع در ۱۰۰ کیلومتری جاده رشت- فومن در ۷- متری از سطح آزاد دریا و عرض جغرافیایی 37°، ۲۵ و طول جغرافیایی 49°، ۲۵ در برداشت تابستانه ، انجام شد. نوع برگ‌هایی که برای بررسی و آزمایش انتخاب شدند، یک جوانه و دو برگ انتهایی از ساقه‌های نورسته گیاه چای بود که پس از چیدن به‌ترتیب خشک شده ، خرد گردید و در معرض دو منبع آنزیمی خام و خالص شده نسبی از نمونه قارچ آسپرژیلوس نایژر قرار گرفتند.

اندازه‌گیری پارامترهای کیفی چای

در این مرحله، پارامترهای تئافلاوین، تئاروبیگین، رنگ کل، شفافیت (Mahanta & Barouah, 1992)، کافئین(Lakin, 1989) روی چای سیاه تولید شده اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

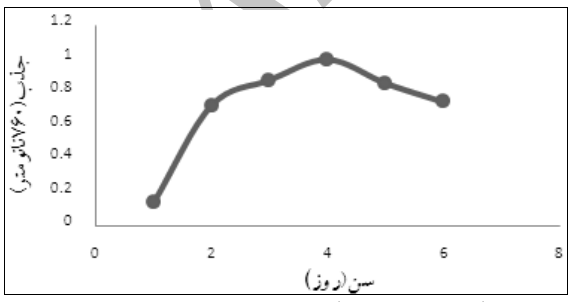
تجزیه وتحلیل آماری بر اساس طرح کاملا تصادفی با ۶ تیمار در ۳ تکرار و با استفاده از نرم افزار SAS انجام پذیرفت، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

رشد میکروارگانیسم در پروسه تولید آنزیم

بررسی رشد آسپرژیلوس نایژر در زمان تولید آنزیم پکتین لیاز در محیط تلقیح نشان داد که حداکثر رشد در طول دوره ۶ روزه تلقیح در نمونه قارچی مربوط به روز چهارم می‌باشد. نتایج نشان داد که با شروع فرایند تولید آنزیم، میزان کدورت محیط نیز افزایش یافته و همزمان با تولیدات پروتئینی و آنزیمی در محیط، رشد میکروارگانیسم نیز وجود داشت و این افزایش کدورت تا پایان دوره تولید آنزیم بصورت صعودی ادامه داشت. بیشترین کدورت در زمان حداکثر تولید آنزیم یعنی در چهارمین روز تلقیح مشاهده گردید.

با توجه به شکل۲و۳ می‌توان اظهار داشت که آسپرژیلوس نایژر در دوره ۶ روز تلقیح در محیط مایع حاوی پکتین، قادر به تولید آنزیم پکتین لیاز می‌باشد و بیشترین فعالیت آنزیمی در روز چهارم تلقیح در زمان حداکثر رشد مشاهده گردید. فاوول و اودونفا(۲۰۰۳) اثر فاکتورهای مختلف بر تولید آنزیم‌های پکتینی از *Aspergillus niger* را بررسی نمودند و بیان کردند که بر اساس سن کشت، در میزان تولید آنزیم‌ها اختلاف‌هایی وجود دارد و بیشترین میزان تولید آنزیم در چهارمین روز کشت صورت می‌گیرد. حداکثر تولید آنزیم های پکتیکی در کپک های مختلف از ۱ تا ۶ روز متغیر می باشد(Ghildyal *et al*, 1981) .



شکل۲- منحنی رشد *Aspergillus niger* در دوره تلقیح

1- Coomassie brilliant blue R-250

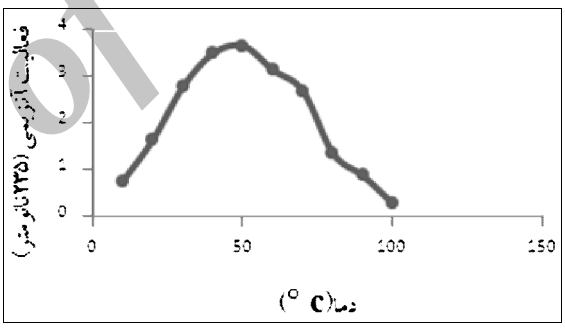
Archive of SID

www.SID.ir

شکل۳- فعالیت آنزیمی پکتات لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در دوره تلقیح، دمای۲۵°C

بررسی فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز در دماهای مختلف

فعالیت آنزیم‌های مفید، چه به صورت درون‌زا و چه به صورت افزوده شده، نیاز به تعیین دمای بهینه واکنش دارد. این دمای بهینه برآیندی از افزایش شدت واکنش و حداقل غیر فعال شدن آنزیم را نشان می‌دهد. فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از در دماهای مختلف در شکل(۴) نشان داده شده است.

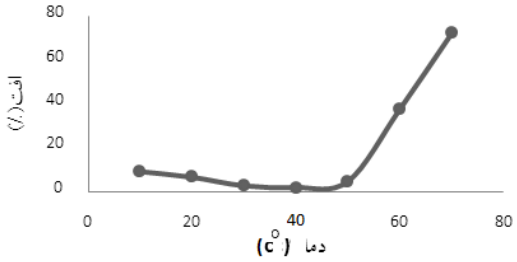


شکل۴- فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در دماهای مختلف

نتایج بدست آمده نشان داد که قرار دادن آنزیم پکتین لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر به مدت ۲۰دقیقه در دماهای مختلف، سبب حفظ بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۵۰ °C گردید و در دماهای بالاتر ۵۰ °C فعالیت آنزیمی بطور مشخصی کاهش یافت. نتایج بدست آمده از مطالعات پیشین، دمای بهینه آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر را در دامنه ۶۰-۴۰ °C تایید نمودند(Fawole & Ramanujam *et al*., -Yadav *et al*., 2007- Odunfa, 2003 .(Rasheedha *et al*., 2010- 2008

بررسی مقاومت آنزیمی پکتین‌لیاز در دماهای مختلف

آنزیم‌ها در دماهای مختلف فعالیت آنزیمی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. در دماهای بالا، آنزیم‌ها ناپایدار بوده و فعالیت خود را از دست می‌دهند. دمای غیر فعال شدن آنزیم تقریبا همیشه به دناتوره شدن ساختار پروتئینی آنزیم نسبت داده شده است(Dixon &Webb, 1979). مقاومت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* به دماهای مختلف در شکل ۵، نشان داده شده است.



شکل۵- افت فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از Aspergillus niger در دماهای مختلف.

براساس شکل۵، می‌توان بیان نمود که آنزیم حاصل از آسپرژیلوس نایژر کمترین افت فعالیت آنزیمی را در دمای ۵۰°C نشان داد که میزان افت ۲/۰۲۴٪ بدست آمد. در دماهای پایین‌تر از ۵۰°C فعالیت آنزیمی با شیب کمتری کاهش یافت، یعنی آنزیم مورد نظر مقاومت خود را در دماهای پایین‌تر از ۵۰°C به میزان بیشتری حفظ نمود، اما در دماهای بالاتر از ۴۰°C افت شدیدی در فعالیت آنزیمی مشاهده شد و در دماهای بالای ۷۰°C فعالیت آنزیمی مشاهده نشد و آنزیم غیر فعال شد.

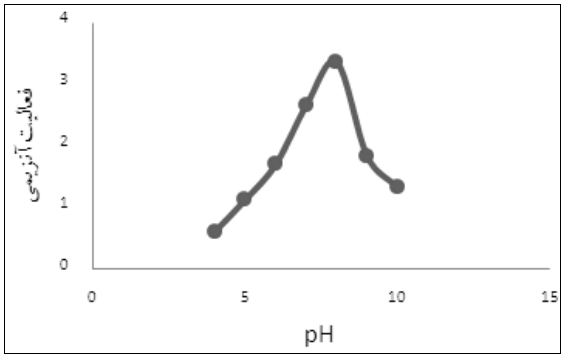
بررسی فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز در pH های مختلف

فعالیت آنزیم به نحو قابل توجهی از pH تاثیر می‌پذیرد. این امر به این علت است که اتصال سوبسترا و کاتالیزور غالباً به توزیع بار، هم بر روی سوبسترا و هم مولکول آنزیم بستگی دارد. توزیع بار روی پروتئین‌ها توسط حالت زنجیره‌های قابل یونیزه در اسیدهای آمینه تشکیل دهنده آن‌ها تعیین می‌شود که این امرخود به pH بستگی دارد و می‌تواند مستقیما بر اتصال سوبسترا و خاصیت کاتالیزوری تاثیر بگذارند. روشن است که حالت یونیزاسیون زنجیره‌های جانبی اسیدآمینه در خارج از جایگاه فعال آنزیم نیز می‌تواند اثر قابل توجهی بر فعالیت آن داشته باشد. برخی آنزیم‌ها فعالیت خود را در گستره وسیعی از pH دارای بهترین فعالیت به عنوان pH بهینه می‌باشند و این pH بهینه بین آنزیم‌های مختلف متفاوت است(شهیدی وحسینی نژاد، ۱۳۸۹).

فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر در pH های مختلف در شکل ۶، نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



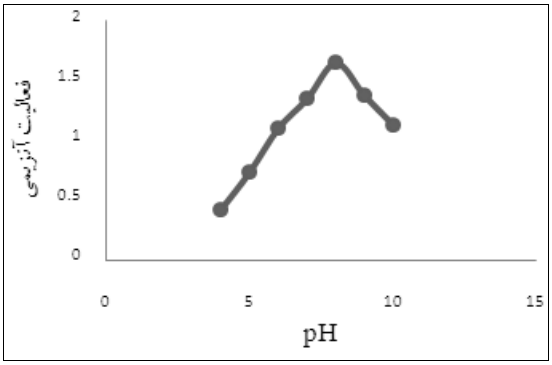
شکل ۶- فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در pH های مختلف

همانطور که در شکل نشان داده شده است، در آنزیم حاصل از آسپرژیلوس نایژر ، pH اپتیمم ۸ بوده و در pH بالاتر و پایین تر از ۸ فعالیت آنزیمی بطور مشخصی کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیمی در pH بالاتر از ۸ (قلیایی) نسبت به pHهای پایین تر از ۸ محسوس‌تر بود. وقتی pH از میزان اپتیمم فاصله پیدا کند، خواص عملکردی و کارآمد آنزیم تغییر می‌یابد و این امر را می‌توان به کاهش اشباعیت آنزیم با سوبسترا به علت کاهش وابستگی و یا اثر pH روی مقاومت آنزیم نسبت داد(Dixon and Webb., 1979).

نتایج بدست آمده از مطالعات پیشین، pH بهینه آنزیم پکتین‌لیاز از آسپرژیلوس نایژر را در رنج ۸-۶ تایید نمودند (Hamdy, 2005-- Rasheedha *et al*., 2010 Yadav *et al*., 2007).

بررسی مقاوت آنزیمی پکتین‌لیاز در pH های مختلف

pH علاوه بر کم کردن فعالیت کاتالیتیکی، بر پایداری آنزیم نیز اثر مشخصی به جای می‌گذارد. بدین سبب آنزیم‌ها نه‌تنها از نظر امکان فعالیت بلکه از نظر پایداری یک گستره محدود pH دارند. نتایج مقاومت آنزیمی پکین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در pH های مختلف در شکل ۷، نشان داده شده است.



شکل۷- مقاومت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در pH های مختلف

نتایج بدست آمده نشان داد که آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر در۸=pH بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸/۹۹٪ فعالیت آنزیمی خود را حفظ نمود. بیشترین مقاومت این آنزیم در دامنه ۱۰-۴=pH مشاهده گردید.

در آنزیم حاصل از آسپرژیلوس نایژر افت فعالیت آنزیمی در pH پایین‌تر از ۸ (ناحیه اسیدی) و pH بالاتر از ۸ (ناحیه قلیایی) مشاهده شد. این امر می‌تواند به این صورت نتیجه‌گیری شود که ناحیه اسیدی منجر به تخریب و ویرانی ساختار سه گانه آنزیم می‌گردد و در طرف قلیایی، کاهش اشباعیت آنزیم از سوبسترا منجر به افت فعالیت آنزیمی می‌شود (Hamdy, 2005).

خالص سازی آنزیم پکتین‌لیاز به روش جداسازی سه فازی

نتایج خالص سازی آنزیم پکتین‌لیاز توسط روش جداازی سه فازی در جدول(۱) نشان داده شده است.

همانطور که در جدول ۱، نشان داده شده است، آنزیم خام حاصل از آسپرژیلوس نایژر در چهارمین روز کشت دارای فعالیت آنزیمی ۳/۳۷ واحد در هر میلی‌لیتر و میزان پروتئین ۰/۱۹ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود. بازده فعالیت در هر نمونه آنزیمی خام ۱۰۰٪ بدست آمد.

جدول۱- خالص سازی آنزیم پکتین لیاز از *Aspergillus niger* به روش جداسازی سه فازی

نمونه		فعالیت آنزیمی (*U/ml)	پروتئین (mg/ml)	اکتیویته کل (U)	پروتئین کل (mg)	اکتیویته ویژه (U/mg)	بازده (٪)	مرتبه خلوص
Aspergillus niger	آنزیم خام	۳/۳۷±۰/۲۵	۰/۱۹±۰/۰۵۲	۳۳۷/۳±۲۵/۱۵	۱۹۰±۵/۲۹	۱۷/۷۹±۵/۰۹	۱۰۰	۱
	آنزیم خالص	۱/۷۷۹±۰/۰۱۴	/۰۰۶±۰/۰۰۱ ۰	۱۷۷/۹۴±۰/۱۴	۰/۰۶±۰/۰۱۷	۲۹۶/۳±۷۵/۱۴	۵۲	۱۶/۶۵

* هر واحد U برابرست با فعالیت آنزیمی صورت گرفته برای تشکیل۱ میکرومولار محصول غیر اشباع در هر دقیقه.

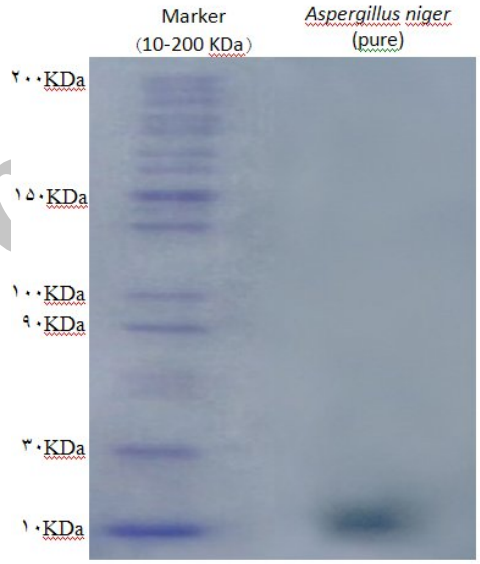
Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از خالص سازی آنزیم پکتین‌لیاز از آسپرژیلوس نایژر نشان داد که فعالیت آنزیمی تا میزان ۱۷/۷۹واحد در هر میلی‌لیتر افزایش یافت. مقدار پروتئین آنزیم خالص نیز به مقدار ۰/۰۰۶ رسید. بازده فعالیت در آنزیم حاصل ۵۲٪ گردید و مرتبه خلوص آنها به ترتیب ۱۶/۶۵ بار بدست آمد. نتایج خالص سازی آنزیم پکتیناز توسط روش جداسازی سه فازی توسط شارما و گوپتا (۲۰۰۱) ، بازده خالص سازی را ۷۶٪ و مرتبه خلوص نهایی را ۱۰ برابر بیان نمودند.

وزن مولکولی

نتایج SDS-PAGE مشخص نمود که وزن مولکولی آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر معادل ۱۲ کیلودالتون می‌باشد (شکل۸).

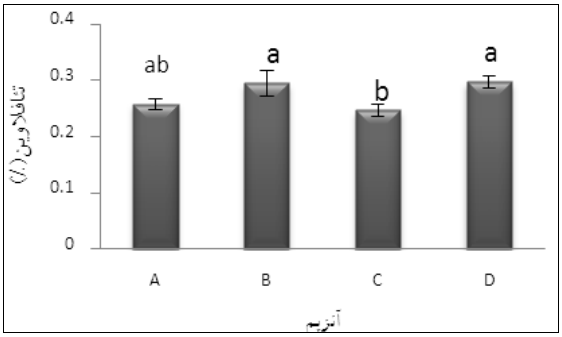


شکل۸- تعیین وزن مولکولی آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از Aspergillus niger توسط روش SDS-PAGE

نتایج حاصل از آزمون‌های کیفی چای فراوری شده

اثر آنزیم بر میزان تئافلاوین

مقدار تئافلاوین تولید شده، درجه شفافیت چای را تعیین می‌کند. رنگ چای دم کرده که معمولاً بین قرمز تا قهوه‌ای تغییر می‌کند به علت حضور تئافلاوین است. میزان تئافلاوین در چای فرآوری شده در شکل (۹) نشان داده شده است.



شکل۹- اثر آنزیم بر میزان تئافلاوین

شاهد: A ، آنزیم پکتیناز تجاری: B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*: C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*: D

نتایج اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور تئافلاوین نشان داد که آنزیم مورد بررسی قادر به افزایش درصد تئافلاوین است. از بین تیمارهای صورت گرفته، آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر بیشترین اثر را روی مقدار تئافلاوین به میزان ۰/۲۹۷۶ ٪ از خود نشان داد. عصاره خالص آنزیم حاصل از آسپرژیلوس نایژر و پکتیناز تجاری به ترتیب سبب افزایش مقدار تئافلاوین به میزان ۱۵/۰۷٪ و ۱۴/۴۳٪ شدند، اما اثر آنزیم خام حاصل از آسپرژیلوس نایژر اثر افزایشی بر میزان تئافلاوین نداشت. چون میزان فعالیت ویژه در نمونه آنزیمی خالص، بیشتر از آنزیم خام است، دیواره سلولی بیشتر تخریب شده، درنتیجه قرار گرفتن سوبسترا‌های کاتکینی چای در برابر آنزیم پلی‌فنول اکسیداز بیشتر می‌شود که این امر اثر بیشتر آنزیم خالص نسبت به خام را روی این فاکتور تایید می‌کند. سریری و همکاران (۲۰۰۶) اثر آنزیم سلولاز را در مرحله تخمیر برگ چای روی فاکتورهای کیفی آن مورد بررسی قرار دادند، نتایج آن‌ها نیز اثر بیشتر آنزیم خالص را نسبت به خام روی چای تایید نمود.

اثر آنزیم بر میزان تئاروبیگین

نتایج اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص پکتین لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور تئاروبیگین در شکل ۱۰، نشان داده است.

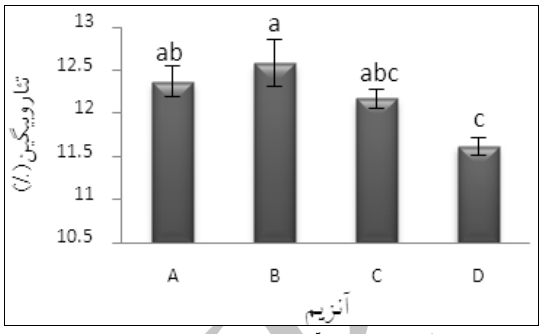
از بین تیمارهای صورت گرفته، تنها آنزیم پکتیناز تجاری (۱۲/۵۸۵۱٪) اثر افزایشی روی مقدار تئاروبیگین از خود نشان داد. اما آنزیم خام و خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر اثر افزایشی بر میزان تئاروبیگین نداشت.

چون بین دو فاکتور تئافلاوین و تئاروبیگین همبستگی وجود دارد و پیش‌سازهای پلی‌فنولی برای تولید این دو ماده مشترک است (Obanda *et al*., 2004)، اثر کم تیمارهای انجام شده روی فاکتور

Archive of SID

www.SID.ir

تئاروبیگین را می‌توان تنها بـه شـرایط زمـان و دمـای مرحلـه تخمیـر نسبت داد، زیرا میزان تبدیل تئافلاوین به تئاروبیگین تحت تاثیر دما و طول مدت تخمیر نیز می‌باشد (Obanda *et al*., 2004).

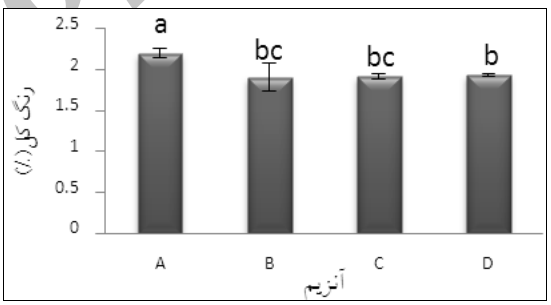


شکل ۱۰- اثر آنزیم بر میزان تئاروبیگین

شاهد: A ، آنزیم پکتیناز تجاری: B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*: C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*: D

اثر آنزیم بر میزان رنگ کل

نتایج اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور رنگ کل در شکل ۱۱، نشان داده شده است.



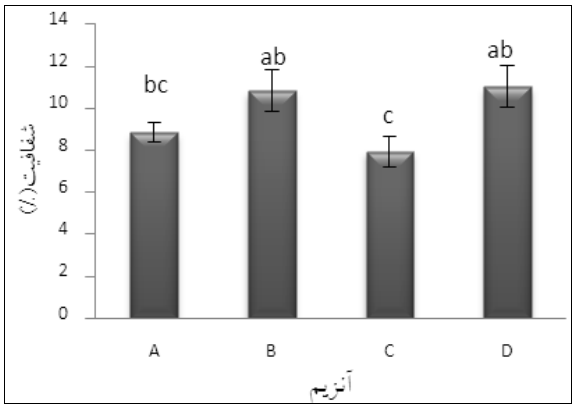
شکل ۱۱- اثر آنزیم بر میزان رنگ کل

شاهد: A ، آنزیم پکتیناز تجاری: B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*: C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*: D

رنگ کل فـاکتوری اسـت کـه مقـدار آن تحـت تـاثیر دو فـاکتور تئافلاوین و تئاروبیگین می‌باشد. معمولاً حدود ۳۰٪ از رنگ کل نهایی به تئافلاوین و بقیه به تئاروبیگین نسبت داده مـی‌شـود(Obanda *et al*., 2004- Owuor &Reeves, 1986). درنتیجـه عـدم افـزایش درصد رنگ کل در اثر تیمارهـای انجـام شـده را مـی‌تـوان بـه مقـدار تئاروبگین نسبت داد. عوامل دیگری کـه باعـث افـزایش ایـن صـفت می‌شوند، تنها محصولات اکسیداسیون نیستند بلکه پیگمان‌های رنگی دیگری مانند کاروتنوئید، تئـوفیلین و تئوفوربایـد نیـز در ایجـاد رنـگ نوشابه چای تاثیر دارند. دو ترکیـب آخـر حاصـل تجزیـه کلروفیـل در مرحله خشک می‌باشند که در ایجاد رنگ سـیاه و قهـوه‌ای در نوشـابه چای نقش دارند (Owuor & Obanda, 2001). از آنجا که تیمارهای مورد آزمون اثری روی افزایش تئـاروبیگین نداشـت، مـی‌تـوان دلیـل کاهش درصد رنگ کل را نیز توجیه نمود.

اثر آنزیم بر شفافیت

نتایج اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص پکتین لیـاز حاصـل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور شفافیت نشان داد کـه آنـزیم دارای اثـر افزایشی بر میزان شفافیت می‌باشد (شکل۱۲).



شکل۱۲- اثر آنزیم بر شفافیت

شاهد: A ، آنزیم پکتیناز تجاری: B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*: C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*: D

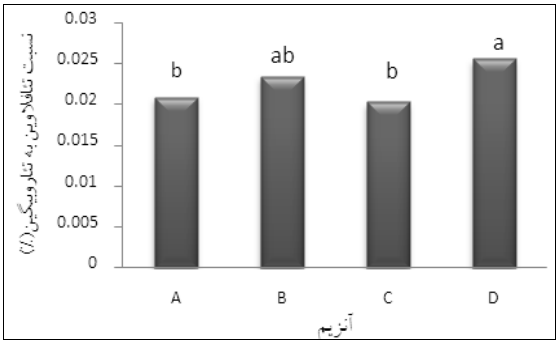
از بـین تیمارهـای صـورت گرفتـه، آنـزیم خـالص حاصـل از آسـپرژیلوس نـایژر بیشـترین اثـر را روی درصـد شـفافیت بـه میـزان ۱۱/۰۲٪ از خود نشان داد. آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نـایژر و پکتیناز تجاری به ترتیب سـبب افـزایش مقـدار تئـافلاوین بـه میـزان ۲۴/۶۲٪ و ۲۲/۳۹٪ شدند. اما اثر آنـزیم خـام حاصـل از آسـپرژیلوس نایژر اثر افزایشی بر میزان شفافیت نداشت. فاکتور شفافیت نیز تحـت تاثیر تئافلاوین می‌باشد. هرچه میزان تئـافلاوین در چـای استحصـالی بیشتر باشد، شفافیت چای نهایی نیز افزایش می‌یابد(Obanda *et al*, 2004- Owuor & Reeves, 1986).

اثر آنزیم بر نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین

یک فرآیند تخمیر ایده‌آل، منجر به ایجاد یک تعادل مناسـب بـین تئافلاوین و تئاروبیگین مـی‌گـردد (Angayarkanni *et al*., 2002). نسبت بین تئافلاوین و تئاروبیگین اثر مستقیم روی رنـگ چـای دارد. نتایج اثر عصاره خام آنزیمـی و آنـزیم خـالص پکتـین لیـاز حاصـل از آسپرژیلوس نایژر بر نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین در شکل۱۳، نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱۳- اثر آنزیم بر نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین.

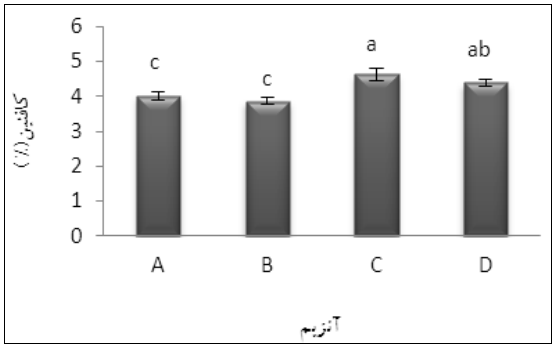
شاهد: A ، آنزیم پکتیناز تجاری: B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*: C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*: D

با توجه به شکل۱۳ ، مشخص گردید که آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر بیشترین اثر را روی نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین (۰/۰۲۵۶٪) داشت. آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر و پکتیناز تجاری به ترتیب سبب افزایش نسبت تئافلاوین به تئاروبگین به میزان ۲۲/۷۷٪ و ۱۲/۴۴٪ شدند. اما اثر آنزیم خام حاصل از از آسپرژیلوس نایژر اثر افزایشی بر این فاکتور نداشت. چون میزان فعالیت ویژه در نمونه آنزیمی خالص، بیشتر از آنزیم خام است، دیواره سلولی بیشتر تخریب شده، درنتیجه قرار گرفتن سوبستراهای کاتکینی چای در برابر آنزیم پلی‌فنول اکسیداز بیشتر می‌شود که این امر اثر بیشتر آنزیم خالص نسبت به خام را روی این فاکتور تایید می‌کند.

اثر آنزیم بر میزان کافئین

مکانیسم تغییر میزان کافئین در فرایند چای سیاه توسط تیمارهای انجام شده، مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج در شکل۱۴، نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که تخمیر چای توسط عصاره خام آنزیمی، آنزیم خالص پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر می‌تواند میزان کافئین چای را افزایش دهد. از بین تیمارهای انجام شده، عصاره خام آنزیمی آسپرژیلوس نایژر با مقدار کافئین ۴/۶۲۷٪ بیشترین اثر را روی چای از خود نشان داد. اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص روی چای، به ترتیب سبب افزایش کافئین چای به میزان ۱۱/۴٪ و ۴/۶٪ شدند. نتایج بدست آمده در این پژوهش با نتایج آنگایارکانی، همکاران(۲۰۰۰)، مورگسان و همکاران(۲۰۰۲) و وانگ و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت داشت.



شکل۱۴- اثر آنزیم بر میزان کافئین.

شاهد: A ، آنزیم پکتیناز تجاری: B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*: C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*: D

نتیجه گیری

در این بررسی، استفاده از روش جداسازی سه فازی در خالص سازی آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر میزان خلوص ۱۶/۶۵۲ و بازده فعالیت ۵۲٪ را نشان داد. این متد تنها نیازمند یک ساعت زمان جهت خالص سازی بوده، بنابراین فرایندی کارامد و اقتصادی محسوب می گردد و دارای پتانسیل بالایی برای خالص سازی آنزیم ها در مقیاس صنعتی می‌باشد. همچنین اثر آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر نسبت به عصاره خام آنزیمی روی افزایش درصد فاکتورهای تئافلاوین، شفافیت و نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین بیشتر بوده، اما تیمارهای آنزیمی اثر افزایشی روی فاکتورهای تئاروبیگین و رنگ کل از خود نشان ندادند، اما اثر عصاره خام آنزیمی نسبت به آنزیم خالص روی فاکتور کافئین بیشتر بود.

قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت محترم وقت مرکز تحقیقات چای کشور که انجام این پروژه بدون حمایت و همکاری ایشان مقدور نبود، قدردانی می‌گردد.

منابع

شهیدی. ف.، و حسینی نژاد. م. ۱۳۸۹. در ترجمه آنزیم ها در صنایع غذایی. توکر. ج.ا.، اف. و.، و وود. ژ (مؤلف). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۴۱-۱۵

Angayarkanni, J., Palaniswami, M., Murugesan, S. & Swaminathan, k., 2002, Improvement of tea leaves fermentation with Aspergillus spp. pectinase. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(4), 299-303

Bradford, M.M., 1976, A Rapid & Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing

Archive of SID

www.SID.ir

the Principle of Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72, 248–254
Dayanand, A. & Patil S. R., 2003, In: Detection of potential fungal isolates for the production of pectinase from deseeded dried sunflower head
Dennison, C. & Lovrein, R., 1997, Three phase partitioning : concentration and purification of protein. Protein Expr purify, 11,149-16
Dixon, M., and Webb, E.C. (1979). Enzyme kinetics, In: Enzymes, 3rd edition, Academic press, New york, Publishers. Logman group, p. 47
Ghildyal, N.P., Ramakrishna, S.V., Nirmala, P., Devi, B.K. & Lowsane Asthana, H.A., 1981, "Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation". Journal of Food Science and Technology, 18, 243-251
Hamdy, H.S., 2005, Purification and characterization of the pectin lyase produced by Rhizopus oryzae grown on orange peels. Annals of microbiology. 55(3), 205-211
Kapoor, M., Beg, QK., Bhushan, B., Singh, K., Dadhich, KS & Hoondal, GS., 2001, Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from Bacillus sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (Boehmeria nivea) and sunn hemp (Crotalaria juncea) bast fibers. Process Biochemistry. 36, 803–807
Kashyab, D.R., Vohra, P.K., Chopr, S. & Tewari, R, 2001, Applications of pectinases in commercial secor:A review. Bioresour Technoogyl. 77, 215-227
Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227, 680-685
Lakin, A., 1989. Food Analysis, Practical Handout. Reading University, UK.
Mahanta, P., & Barouah, S., 1992, Changes in pigments and phenolics and their relationship with black tea quality. Journal of Science and Food Agricalture, 59,21-26
Murugesan, G. S., Angayarkanni, J. & Swaminathan, K., 2002. Effect of Tea fungal enzymes on the quality of black tea. Food Chemistry, 79, 411-17
Obanda, M., Owuner, P.O., Oka, R.M. & Kavoi, M.M., 2004, Change in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variation in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total color. Food Chemistry, 85:163-173
Owuor, P. O. & Obanda, M., 2001, Comparative responses in plain black tea quality parameters of different tea clones to fermentation temperature and duration. Food chemictry, 72,319-327
Owuor, P. O. & S. G. Reeves., 1986, Optimising fermentation time in black tea manufacture. Food Chemistry, 21(3), 195-203
Pike, R.N. & Dennison, C., 1989, Protein fractionation by three –phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures. Biotechnology of Bioengineer, 33,221–228
Ramalingam, G. & Mulimani, V.H., 2004, purification and characterization of guar galactomannann degrading α-galactosidase from Aspergillus oryzae DR-5. Journal of Microbial Biotechnology, 11,863-867
Ramanujam, P.K., N, S., andf Subramanian, P. 2008. Production of pectin lyase by solid state fermentation of sugarcane bagasse using Aspegillus niger. Research Article. 30-33
Rasheedha, A., Kalpana Devi, M., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V. & Palaniswamy, M., 2010, Production and characterization of pectinase enzyme from penicillum chrysogenum. Indian Journal of Science and Thechnology, 3, 377-381
Sariri, R., Najafi, A., and Araste, A. 2006. The effect of Cellulase extracted from symbiotic tea fungies on the quality of Iranian tea. Enz. Microbial Technol, 39(20), 308-310
Saxena, L., Lyer, B.K. & Ananthanaraan, L., 2007. Three-phase partitioning as a novel method for purification of ragi bifunctional amylase/protease inhibitor. Process biochemistry, 42,491-495
Sharma, A. & Gupta MN., 2001, purification of pectinases by three-phase partitioning. Biotechnology Letters, 23, 1625-1627
Wang, X.G., Hu, S.X., Wan, X.C. & Pan, C.Y., 2005, Effect of microbial fermentation on caffeine content of tea leaves. Journal of Agriculture Food Chemistry, 53, 7238-7242
Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D. & Yadav, K. D. S., 2007, Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from Aspergillus flavus. Process Biochemistry, 43(5), 547-552.

Archive of SID

www.SID.ir