Archive of SID

مجله مهندسی بیوسیستم ایران
دوره ۳۹، شماره ۱، ۱۳۸۷ (۵۰-۴۳)

بررسی اثر تواماً امواج فراصوت و دما بر میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز جو جوانه زده

مریم یلداگرد[۱]، سید علی مرتضوی*[۲] و فریده طباطبایی[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد ، استاد و استادیار ،دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۳۰- تاریخ تصویب: ۸۷/۴/۱۲)

چکیده

آلفا آمیلاز یکی از آنزیمهای مهم موجود در دانه جو می باشد که طی مراحل مالت سازی فعال می شود. این آنزیم بدلیل مقاوم بودن در برابر حرارت و توانایی اختصاصی آن به مایع سازی نشاسته و تبدیل آن به قندهای ساده از اهمیت زیادی در صنعت و داروسازی برخوردار است. روشهای مختلفی از جمله افزودن هورمونهای رشد و یا دستکاریهای ژنتیکی برای افزایش فعالیت این آنزیم طی مراحل جوانه زنی گزارش شده است. در این مطالعه اثرات امواج فراصوت به عنوان یک فناوری نوین غیرحرارتی بر روی میزان فعالیت آنزیم ، بعد از جوانه زنی دانه جو با استفاده از سیستم هورن صوتی با در نظر گرفتن سه پارامتر تاثیر گذار دما (۳۰،۵۰ و۷۰ درجه سانتی گراد) و زمان (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) در شدتهای مختلف (۲۰٪، ۶۰٪ و ۱۰۰٪ از کل توان اسمی دستگاه) در فرکانس ثابت ۲۰kHz مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از تکنیک آماری تاگوچی و نرم افزار qualitek4 نقش پارامترهای مذکور بر فرآیند مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و تحلیل واریانس، سهم هر کدام از پارامترها، شرایط بهینه فعالیت آنزیم تعیین گردید. و در انتها ، فعالیت آنزیم به روش یدومتری سنجش شد. نتایج این بررسی کاهش فعالیت این آنزیم بعد از جوانه زنی با قرارگیری در معرض همزمان صوت و حرارت در مقایسه با نمونه شاهد می باشد.

واژه‌های کلیدی: امواج فراصوت، فعالیت آلفا آمیلاز ، جو جوانه زده، روش آماری تاگوچی

مقدمه

آمیلازها از آن دسته آنزیمهایی به شمار می آیند که بطور گسترده در میکروبها ، گیاهان و حیوانات یافت می شوند. و بصورت اختصاصی قادر به شکستن پیوندهای O– گلیکوزیدی در نشاسته می باشند. نشاسته، پلی ساکارید ذخیره ای دانه ها و غده های گیاهان مختلف بوده و از دو جزء اصلی، پلیمر خطی آمیلوز که از اتصال $\alpha-1,4$ گلوکز تشکیل شده و پلیمر شاخه ای آمیلوپکتین که در آن پیوندهای خطی $\alpha-1,4$ گلوکز ، با باندهای $\alpha-1,6$ اتصال دارند . شکستن پلیمر نشاسته با استفاده از آمیلازها اساس انجام برخی فرآیندهای صنعتی نظیر تهیه شربت گلوکز ، صنایع نانوایی و تولید آبجو می باشد (۱۰).آمیلازها نقش مهمی در جوانه زنی و رسیدن دانه ها داشته و عامل تجزیه نشاسته در بدن جانداران است و همچنین باعث تبدیل آن به قندهای ساده می شود که متعاقباً برای فعالیتهای متابولیکی مختلفی استفاده می شود.

با توجه به کاربرد های وسیع آلفا آمیلاز در صنایع مختلف و اهمیت تجاری قدرت هیدرولیتیکی مالت در محصولات غذایی نظیر ماء الشعیر تلاشهای زیادی برای افزایش فعالیت این آنزیم طی فرآیند جوانه زنی جو شده

* نویسنده مسئول: سیدعلی مرتضوی تلفن: ۰۵۱۱-۸۷۹۵۶۱۲ E-mail:mortaza1937@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

است. گزارشهای زیادی در رابطه با افزایش فعالیت آلفا آمیلاز در مقالات بیولوژی، ژنتیک مولکولی، فیزیولوژی و بیوشیمی ارائه شده اندکه همگی با تکیه بر اصلاح اندوسپرم و پروتوپلاست آلرون در ایجاد شرایط مناسب برای انجام واکنشهای آنابولیکی درناحیه های سنتز آمیلاز به منظور افزایش آنزیمهای آمیلولیتیک تاکید دارند (۱۷). علاوه بر آن از جمله تکنیک‌های جدیدی که در مالت‌سازی برای افزایش میزان فعالیت آنزیم ایجاد شده افزودن هورمون رشد گیاهی اسید جیبرلیک در مقیاس صنعتی و یا تاثیر اتیلن بر جو مرطوب می باشد (۳، ۱۶).

گزارشها مبنی بر افزایش فعالیت آنزیمهای خاص توسط اولتراسوند (۱، ۲، ۴، ۱۳) باعث گردید تا در این مطالعه اثرات این فناوری جدید را بر روی میزان فعالیت آلفا-آمیلاز از جو جوانه زده بررسی شود. در فرآیندهای بیوتکنولوژی روش اولتراسونیکاسیون بطور گسترده در سطح آزمایشگاهی استفاده می شود و نیاز به تجهیزات پیچیده و آموزش فنی بالایی ندارد . تیمار اولتراسونیک یکی از روشهای نوین می باشد که با تولید حبابهایی در داخل مایعات ایجاد نقاط داغ کرده و بدین ترتیب باعث افزایش انتقال گرما و انهدام میکروارگانیسمها و آنزیمها می شود. به منظور تشریح مکانیسمهای غیر فعال سازی آنزیم چندین فرضیه مطرح شده است. وقتی که امواج فراصوت به مایع اعمال می شوند تولید کاویتاسیون صوتی می کنند . و حبابها در مایع بطور مداوم شکل و اندازه خود را تغییر داده و تولید تنش برشی می نمایند (اثرات مکانیکی امواج فراصوت) و این اثرات آنزیمها را دچار دناتوراسیون می کند. انفجار کاویتاسیونی حباب در کاویتاسیون ناپایدار همچنین تولید دما و فشارهای خیلی بالا کرده که می توانند آنزیم را تخریب نمایند (اثرات شیمیایی امواج فراصوت) (۱۵). در مورد فعالیت آنزیمها گزارشهای زیادی مبنی بر کاهش فعالیت آنزیم توسط امواج فراصوت وجود دارد (۵، ۱۰) و گزارشهای دال بر افزایش فعالیت آنزیمهای آزاد در محیط آزمایشگاه[1] در حضور امواج فراصوت محدود می باشد. بطور غیر قابل انتظار در توان آکوسیتیکی پایین ، بعضی از آنزیمها مانند گلوکوآمیلاز و آلفا آمیلاز تثبیت شده در خلل و فرج سیلیکاژل و یا بصورت آزاد نه تنها در معرض تابش امواج فراصوت غیرفعال نشده بلکه فعال تر هم می شوند (۱۳). از این رو میزان شدت اولتراسوند نقش مهمی در فعال سازی یا غیر فعال سازی بیشتر آنزیمها دارد. گزارش های زیادی توسط محققان مختلف در مورد افزایش فعالیت آنزیمهای آزاد تحت شرایط تابش ملایم امواج فراصوت منتشرشده است. که از جمله به افزایش فعالیت آلفا کیموتریپسین بر روی کازئین در شدتهای پایین صوت و بعد از آن کاهش فعالیت این آنزیم در شدتهای بالا می توان اشاره نمود(۴). به نظر می رسد که فعالیت آنزیمها به عنوان کلید واکنشهای بیوشیمیایی با تنظیم خوب پرتو افکنی صوت افزایش می یابند.

هدف از این مطالعه بررسی اثرات امواج فراصوت بر روی میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بدست آمده از جو جوانه زده می باشد. شایان ذکر است که بر اساس دانش ما تا حالا هیچ مرجعی در نوشتجات در خصوص اثر امواج فراصوت بر میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بدست آمده از جو جوانه زده یافت نشده است.

مواد و روشها

مواد شیمیایی

کلیه مواد شیمیایی با درجه خلوص بالا شامل ید ، یدید پتاسیم ،فسفات پتاسیم مونو بازیک و فسفات پتاسیم دی بازیک و نشاسته قابل حل سیب زمینی با شماره(S-2630) از شرکتهای سیگما آلدریچ[2]، مرک آلمان و فلوکا خریداری شدند.

از نمونه جو کارون در کویر با رطوبت ۹ درصد و میانگین پروتئین ۱۱/۵ درصد در کلیه آزمایشات استفاده شد و برای جلوگیری از جذب رطوبت در یک مکان خشک در دمای ۲۵ درجه نگه داری شد. همچنین شایان ذکر است برای از بین بردن حالت غیرفعالی[3] دانه ها و افزایش قدرت رویشی آنها، دانه ها به مدت سه ماه بعد از درو در دمای ۳۵-۲۵ درجه سانتی گراد نگه داشته شدند.

1. vitro

2. Sigma-Aldrich, Australia
3. dormancy

www.SID.ir

Archive of SID

دستگاهها

سیستم هورن صوتیUP 200H با سونوترد S3 با داده های تکنیکی توان اسمی ۴۶۰ وات ، فرکانس عملیاتی ۲۰ کیلو هرتز با کنترل اتوماتیکی ، دامنه ۲۱۰ میکرومتر مربوط به ۱۰۰٪ فرکانس، طراحی شده بوسیله دکتر هلسشر جی ام ب اچ (ترپتو،آلمانی[1]) جهت اعمال امواج فراصوت استفاده گردید.

دستگاه گراهاردت وپودست ۳۰ گراهاردت کجلداترم[2] برای آنالیز پروتئین استفاده شد.

طراحی آزمایشات

بدلیل حساس بودن رفتار آنزیم برای بررسی و کنترل دقیق اثر پارامترها ، ۲۷ تیمار با سه تکرار با در نظر گرفتن پارامترهای دما، زمان و شدت صوت ، در فرکانس ثابت برروی جو جوانه زده انجام شد و نتایج در شکلهای۱، ۲و ۳نشان داده شده است . برای آنالیز نتایج بدست آمده از میان ۳ × ۲۷ نتیجه بدست آمده ۹ داده با سه تکرار طبق شرایط پیش بینی روش تاگوچی(ماتریس اورتوگونال L9) انتخاب شده و به نرم افزار Qualitek4 داده شد و تحلیل واریانس و سهم تاثیر هر کدام از پارامترها در نمودارهای۴ ، ۵و ۶ توسط نرم افزار مشخص شده است و در انتها با تعیین شرایط بهینه، آزمایش تایید با بازه‌های اطمینان ۹۰٪ و ۹۵٪ انجام شد.

فرآیند مالت سازی

نمونه های جو به صورت دستی در آزمایشگاه به روش زیر عملیات مالت سازی بر روی آنها انجام شد. نمونه ها بطور متناوب پس از خیساندن در دمای C° ۱۷-۱۶ برای شش ساعت به مدت ۸ ساعت هوادهی شدند و این عمل تا رسیدن نمونه ها به میزان رطوبت ۴۵ درصد ادامه یافت و سپس تقریباً به مدت ۹۶ ساعت با حفظ رطوبت ۴۵ درصد (با آب پاشی هر چهار ساعت روی نمونه ها) فرصت جوانه زنی داده شد پس از آن نمونه های جوانه زده به مدت بیش از ۲۰ ساعت در دمای۵۵ درجه سانتی گراد پس از افزایش دما به ۶۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ساعت دیگر در این دما و در ادامه بیش از ۶ ساعت در دمای C° ۷۵ و در نهایت در دمای ۸۲ درجه به مدت ۴ ساعت و با رسیدن به رطوبت ۴ درصد عملیات خشک کردن انجام گردید . سپس در مراحل بعدی با جدا کردن ریشه های خشک شده نمونه ها آسیاب شده و آرد مالت بدست آمده برای مراحل بعدی آماده گردید(۱۱).

صوت دهی دانه ها

دانه های جو بعد از جوانه زنی در یک بشر حاوی آب معمولی به روش مستقیم و با استفاده از دستگاه فراصوت با سونوترد گرد به قطر ۳۳ میلی متر در فرکانس ثابت ۲۰ کیلو هرتز صوت دهی شدند. نوک هورن معمولاً به اندازه ۹ میلیمتر به درون۸۰ میلی لیتر از محلول محتوی ۱۰ گرم نمونه جو فرو برده شد. برای جلوگیری از تشکیل هرگونه امواج ایستا و برای موثر واقع شدن عبور امواج صوت ،محتوای بشر مرتباً بهم زده شد. توان صوتی بطور دستی در سه شدت مختلف ۲۰،۶۰و ۱۰۰ درصد از کل توان خروجی دستگاه کنترل شد. و همچنین انرژی اولتراسونیک با استفاده از کنترل وظیفه[3] تعبیه شده در دستگاه به منظور کاهش تشکیل رادیکالهای آزاد پالسی شد (در روش پالسی نوسانات اولتراسونیک در سرعت یک پالس بر ثانیه منتقل می شوند). در این مطالعه سیکل پالسی بر روی ۵۰ درصد تنظیم شد و صوت دهی محلول حاوی نمونه با استفاده از هورن در سه دمای ۳۰،۵۰و۷۰ درجه سانتی گراد برای زمانهای ۵،۱۰و۱۵ دقیقه انجام شد.

استخراج آنزیم از مالت

جهت استخراج آنزیم از مالت ۰/۷۵ گرم مالت آرد شده در دو سری به داخل لوله های سانتریفوژ منتقل شده و بر روی آن ۴ میلی لیتر ماده استخراج کننده(بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=۸) تحت عمل همزدن اضافه شد. عمل استخراج به مدت ۳۰ دقیقه در دمای C° ۳۰ با همزدن منظم به مدت ۵ ثانیه در فاصله های زمانی ۵ دقیقه انجام شده و با سانتریفوژ کردن در ۲۸۲۶ g به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. محلولهای بدست آمده پس از صاف کردن به درون استوانه های مدرج منتقل شده و در سنجش آنزیم مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱).

1. Dr. Hielscher GmbH (Treptow, Germany)
2. Gerhardt Vapodest 30 instrument Gerhardt Kjeldatherm

3. duty cycle

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش فعالیت آلفا آمیلاز

مشخص کردن فعالیت آلفا آمیلاز براساس کاهش در شدت رنگ کمپلکس نشاسته-ید

میزان هیدرولیز نشاسته با آلفا آمیلاز با اندازه گیری کاهش رنگ آبی کمپلکس نشاسته در محلول با ید مشخص می شود. نشاسته با ید تشکیل رنگ کمپلکس آبی پررنگ داده و با افزایش تدریجی هیدرولیز نشاسته رنگ آن به زرد-قهوه ای تغییر می یابد. چندین روش کار برای مشخص کردن کمی آمیلاز بر این خاصیت پایه گذاری شده است. روش فاوا [1] فعالیت دکسترینی آلفا آمیلاز را در واکنش، در کاهش رنگ ید مشخص کرده و بازتاب درون شکنی مولکول نشاسته می باشد و بطور روتین برای سنجش آلفا آمیلاز بکار میرود. جهت مشخص نمودن فعالیت دکسترینی آلفا آمیلاز ،از نشاسته قابل حل به عنوان سوبسترا استفاده کرده و بعد از پایان یافتن واکنش با اسید کلریدریک رقیق ، محلول ید افزوده می شود. سپس کاهش در جذب در ۶۲۰ نانومتر در برابر نمونه شاهد اندازه گیری می شود. یک درصد کاهش در جذب به عنوان یک واحد از آنزیم در نظر گرفته می شود(۱۸).

روش سنجش

ابتدا ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته (۲۰ میلی گرم در یک میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم pH=7 به داخل لوله آزمایش منتقل شد سپس ۰/۵ میلی لیتر آنزیم استخراج شده از مرحله استخراج به آن اضافه شده و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد بوسیله ۱ میلی لیتر اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال واکنش را متوقف کرده و در ادامه یک میلی لیتر از معرف ید به آن اضافه شد. پس از آن حجم محتوی لوله را با آب مقطر به حدود ۱۰سی سی رسانده و میزان جذب رنگ را با استفاده از اسپکترفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده و با نمونه شاهد(محلول نشاسته با ید بدون افزودن آنزیم) مقایسه نموده و میزان جذب نمونه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد[۱۸].

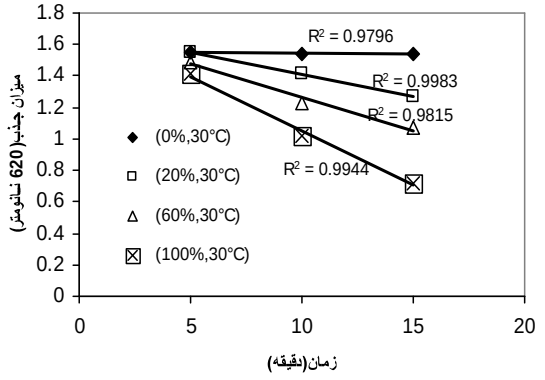
$$\text{میزان جذب} = \left(OD_{sample} - OD_{control}\right)$$

OD_{sample} میزان جذب رنگ بوسیله نمونه

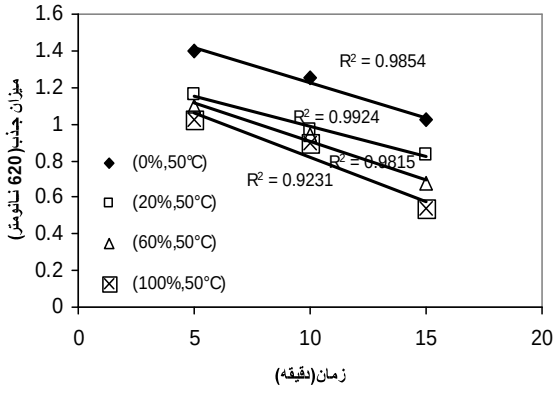
$OD_{control}$ میزان جذب رنگ بوسیله شاهد

نتایج

به منظور بررسی اثرامواج فراصوت به همراه تیمار گرما بر روی فعالیت آلفا آمیلاز جو جوانه زده ، آزمایشات در رنج شدت صوت ۲۰ تا ۱۰۰٪ از توان اسمی دستگاه در دماهای ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد در بازه زمانهای مختلف انجام شد. نتایج در شکلهای ۱،۲و۳ نشان داده شده است.همچنین میزان اثرات پارامترهای مورد مطالعه بر میزان جذب نور در سه سطح مختلف در کل پروسه صوت دهی به روش آماری تاگوچی در شکلهای ۵،۴و۶ نشان داده شده است.



شکل۱- نمودار میزان جذب توسط آنزیم آلفا آمیلاز استخراجی از دانه جو صوت دهی شده بعد از جوانه زنی در دمای ثابت۳۰ درجه

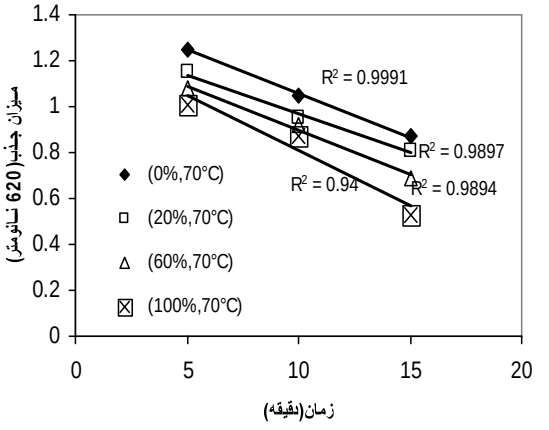


شکل۲- نمودار میزان جذب توسط آنزیم آلفا آمیلاز استخراجی از دانه جو صوت دهی شده بعد از جوانه زنی در دمای ثابت۵۰ درجه

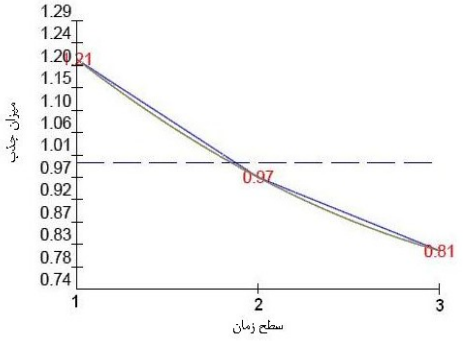
1. fuwa

www.SID.ir

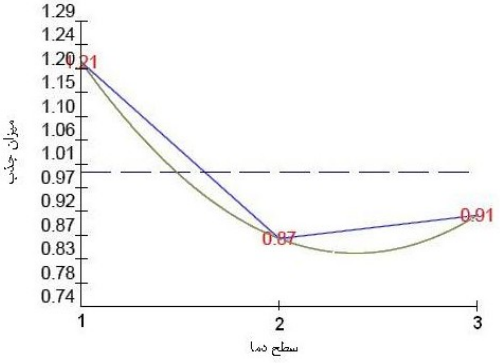
Archive of SID



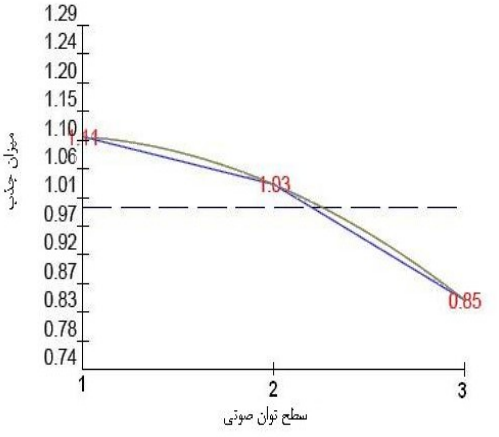
شکل۳- نمودار میزان جذب توسط آنزیم آلفا آمیلاز استخراجی از دانه جو صوت دهی شده بعد از جوانه زنی در دمای ثابت ۷۰ درجه



شکل۵- میانگین اثرات زمان محاسبه شده توسط نرم افزار qualiteik4برای دانه جو صوت دهی شده بعد از جوانه زنی



شکل۶- میانگین اثرات دمای محاسبه شده توسط نرم افزار qualitek4 برای دانه جو صوت دهی شده بعد از جوانه زنی



شکل۴- میانگین اثرات شدت صوت محاسبه شده توسط نرم افزار qualitek4 برای دانه جو صوت دهی شده بعد از جوانه زنی

تحلیل آماری واریانس برای تعیین سهم هر یک از عوامل تحت بررسی در فرآیند در جدول ۱ نشان داده شده است.

بررسی مربوط به شدت اثر عوامل و چگونگی تأثیر پاسخ با تغییر عوامل شرایط بهینه فعالیت آنزیم با انجام محاسبات آماری توسط نرم‌افزاردر جدول ۲ مشخص گردیده است.

جدول ۱- تحلیل واریانس

شماره	فاکتورها	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس	نسبتF	مجموع خالص	درصد
۱	شدت صوت	۲	۰/۳۲۸	۰/۱۶۴	۱۶۴/۲۴۹	۰/۳۲۶	۱۹/۴۲۱
۲	زمان	۲	۰/۷۱۰	۰/۳۵۵	۳۵۵/۲۲۷	۰/۷۰۸	۴۲/۱۴۲
۳	دما	۲	۰/۶۲۲	۰/۳۱۱	۳۱۱/۰۷۵	۰/۶۲۰	۳۶/۸۸۹
بقیه/خطا		۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۰۰			۱/۵۴۸
کل		۲۶	۱/۶۸۰				٪ ۱۰۰/۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- شرایط بهینه پیش بینی شده فعالیت آنزیم توسط نرم افزار qualitek4 با توجه به شرایط عملیاتی سیستم

شماره	فاکتورها	توضیح سطح	سطح	سهم
۱	شدت صوت	۲۰	۱	۰/۱۱۳
۲	زمان	۵	۱	۰/۲۱۲
۳	دما	۳۰	۱	۰/۲۱۳
سهم کل از همه فاکتورها	-	-	-	۰/۵۳۸
میانگین بزرگ جاری از عملکرد	-	-	-	۰/۹۹۵
نتایج قابل انتظار از شرایط اپتیمم	-	-	-	۱/۵۳۳

بحث

غیر فعال سازی آنزیم آلفا آمیلاز در ۳۰ درجه سانتی گراد

موثر بودن امواج فراصوت بر روی میزان غیر فعال سازی آنزیم در شدت های ۲۰،۶۰و۱۰۰٪ از کل توان ورودی نشان داد که با افزایش شدت صوت میزان فعالیت آنزیم کاهش می یابد از آنجا که آنزیم آلفا آمیلاز درحرارت۳۰ درجه سانتی گراد از بین نمی رود بنابراین کاهش فعالیت آنزیم و در نتیجه کاهش میزان جذب صرفاً به واسطه اثرات امواج فراصوت می باشد مقایسه منحنی تیمارگرما (متناسب با صفر درصداز توان صوتی در نمودارهای مربوطه) با منحنی های تیمار شده با صوت نشان می دهد میزان جذب از مقدار ۱/۵۵ در تیمار گرما به ۰/۷۲ در تیمار صوت دهی با شدت صوت ۱۰۰٪ در پایان ۱۵ دقیقه زمان فرآیند کاهش می یابد. اثرات امواج فراصوت بر روی آنزیمها اغلب با چندین فرآیند مکانیکی و سونوشیمیایی که بوسیله کاویتاسیون ایجاد می شود نسبت داده می شود. میکروجت های مایع تولید شده بوسیله فروپاشی متقارن حبابهای کاویتاسیون، تنشهای برشی در مایع صوت دهی شده و میکروجریانهایی که معلول حبابهای نوسان کننده پایدار می باشند قادر به رساندن آسیب مکانیکی به تمامیت ساختمان پروتئین می باشند و باعث افت فعالیت آنزیم می شوند. مکانیسم دیگری که در آن آنزیمها طی صوت دهی غیرفعال می شوند بواسطه تغییر وتحول[1] و یا آسیب ساختار مولکولی آنزیم می باشد. رادیکالهای آزاد که ذراتی با الکترونهای جفت نشده و با فعالیت واکنش پذیری خیلی بالا هستند توزیع بار بر روی سطح پروتئین را تغییر داده و باعث رساندن آسیب جدی به هندسه ناحیه فعال آنزیم شده بنابراین میل ترکیبی[2] آنزیم به سوبسترا را از بین می برند. بنابراین در این مقوله دلیل غیر فعال سازی آلفا آمیلاز جو به رادیکالهای آزاد و نیروهای برشی، که باعث تغییر وتحول و آسیب به ساختار مولکولی آلفا آمیلاز می شوند نسبت داده می شود. بدیهی است که در سطوح شدت صوت بالا آسیب بیشتری به ساختار آلفا آمیلاز وارد شده و منتج به غیر فعال سازی بیشتری خواهد شد.

غیر فعال سازی آنزیم آلفا آمیلاز در دمای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد

منحنی میزان جذب و غیر فعال سازی آنزیم در دماهای مختلف نشان می دهد که میزان غیر فعال شدن آنزیم در دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی گراد بسیار بیشتر خواهد بود. و بیشترین تفاوت در شدت های مختلف در زمانهای نسبتاً طولانی حاصل شده است این اثرات را می توان به اثرات سونوشیمیایی و مکانیکی ناشی از حبابهای کاویتاسیون نسبت داد. طبق فرآیندهای فوق گرادیانهای فشار بالای بوجود آمده توسط امواج فراصوت در درون مایع باعث پارگی و تکه تکه شدن[3] مولکولهای پروتئین و تغییر شکل ساختار آن می شوند در حالی که گرادیانهای دمای بالا منجر به غیر فعال سازی گرمایی پروتئین یا پرولیز پیوندهای آن می شوند (اثرات مکانیکی صوت) و طبق مکانیسم اثرات سونوشیمیایی صوت هر حباب کاویتاسیون تولید شده بوسیله امواج فراصوت به منزله میکروراکتور کوچکی عمل می کند که تولید نقاط داغ موضعی نموده و دما و فشار در داخل این حبابها حدوداً به۵۰۰۰ کلوین و فشار ۱۰۰۰ بار می رسد(۱۴) و این دماها و فشارهای بالا

1. modification

2. affinity

3. fragmentation

www.SID.ir

Archive of SID

ساختمان آنزیم را دچار غیر فعال سازی می نمایند.مطلب دیگری که از نمودارهای ۲و۳ مشخص می شود اختلاف ناچیز شیب این منحنی ها در دمای ۵۰ و ۷۰ درجه می باشد نتایج آزمایشگاهی بطور آشکار بیان می کنند که بازده غیر فعال سازی امواج فراصوت با افزایش دما تا نزدیکی های ۷۰ درجه کاهش می یابد بطور نمونه در صوت دهی ۱۰۰٪ وقتی که دما از ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد افزایش می یابد میزان جذب از مقدار ۰/۷۲ تا ۰/۵۴ کاهش می یابد که چندین برابر بیشتر از زمانی می باشد که دما از ۵۰ به ۷۰ درجه (متناسب بامیزان جذب ۰/۵۳) در پایان ۱۵ دقیقه از زمان فرآیند افزایش می یابد. از نقطه نظر عملی این بدین معنی است که به منظور بهبود بازده تیمار ترموسونیکاسیون کاربرد دماهای خیلی بالا ممکن است که خیلی سودمند نباشد. به نظر میرسد که افزایش در میزان غیرفعال سازی آلفا آمیلاز جو در عملیات ترموسونیکاسیون بیشتر در دمای ۵۰ درجه می باشد. این موضوع را می توان به اثرات سینرژیستی امواج فراصوت و گرما در مورد آنزیمها در دماهای بالا طبق مطالعات لوپز نسبت داد (۸) و این احتمالاً بدلیل افزایش فشار بخار مایع در اطراف حبابهای کاویتاسیون می باشد که منجر به میرایی حبابها شده و باعث می شود که فروپاشی حبابها کمتر موثر واقع شوند[۱۵]. ضمناً بررسی اثر امواج فراصوت بر روی آنزیمهای مشابه نظیر پکتین متیل استراز و پکتین استراز و... انجام شده است و بسته به نوع وخصوصیت آنزیم نتایج مشابهی گزارش شده است (۹، ۱۲).

نتایج آنالیز داده ها به روش آماری تاگوچی

تحلیل آماری واریانس برای تعیین میانگین سهم هر یک از عوامل تحت بررسی در فرآیند ، بررسی مربوط به شدت اثر عوامل و چگونگی تأثیر پاسخ با تغییر عوامل شرایط بهینه فعالیت آنزیم با انجام محاسبات آماری توسط نرم‌افزار و میزان اثرات تک تک پارامترها بر روی میزان فعالیت آنزیم در جداول شماره ۱و۲ و شکلهای۴،۵و۶ نشان داده شده است. همانگونه که از این شکلها دیده می شود میانگین اثر تک تک این پارامترها بر روی فعالیت آنزیم منفی بوده و باعث کاهش فعالیت آنزیم و در نتیجه کاهش میزان جذب شدند و با افزایش مقدار این پارامترها میزان غیر فعال سازی بیشتری حاصل شده است. بر اساس داده های ثبت شده در جدول۱ ، بدون شک فعالیت آلفا آمیلاز در طول تابش امواج فراصوت کاهش یافته است. بطور آشکار توان امواج فراصوت و زمان تابش صوت بر روی فعالیت بیولوژیکی آلفا آمیلاز تاثیر گذار بودند و همچنین از اطلاعات خلاصه شده در این جدول مشاهده می شود که متغیر خیلی تاثیر گذار در عملیات ترموسونیکاسیون زمان قرارگیری در معرض تابش صوت و حرارت می باشد.همانطور که از جدول خوانده می شود درصد سهم آن بالاترین مقدار یعنی ۴۲/۱۴۲٪ می باشد.

نتیجه گیری کلی

امواج فراصوت باعث کاهش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بدست آمده از جو جوانه زده شدند و وقتی که این امواج با افزایش دما همراه شدند(عملیات ترموسونیکاسیون) میزان غیر فعال سازی قابل توجهی حاصل شد. اگر چه هرچه دما بیشتر افزایش می یابد بازده امواج فراصوت کاهش می یابد اما سرعت کلی غیر فعال سازی هنوز بیشتر از سرعت غیر فعال سازی تیمار گرما می باشد.همچنین از نتایج ارائه شده در بالا دیده می شودکه فعالیت آلفا آمیلاز به میزان قابل ملاحظه ای با افزایش زمان پرتو افکنی به همراه تیمار گرما کاهش می یابد.

نتایج این بررسی بیشتر برای مواردی که غیرفعال کردن این آنزیم بعد از عملیات مایع سازی نشاسته و سایر ماکرومولکلها درکاربردهای آن نظیر تسریع عمل فیلتراسیون شربت ها و آب میوه ها ضروری میباشد می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری پرسنل آزمایشگاه فناوریهای نوین گروه علوم صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و سازمان غله خراسان صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Barton, S., C. Bullock, & D. Weir, 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance, Enzyme and Microb.Technol. 18:190-194.
2. Czerner,R., R. Millner, E. Roenfeld, A. Schellenberger, & P. Schmidt, 1987. Theoritical and experimental studies on the influence of ultrasound on immobilized enzymes , Biotechnol Bioengin. 30: 928-935.
3. Eastwell. K. C. & M. S. Spencer, 1982. Modes of ethylene action in the release of amylase from barley aleurone layers, Plant Physiol.69: 563-567.
4. Ishimori,Y., I. Karube, & S. Suzuki, 1981.Acceleration of immobilized alpha-chymotrypsin activity with ultrasonic irradiation. J.Mol Catal. 12:253-259.
5. Kuldiloke, J., 2002. Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices. M.Sc. thesis. Berlin.
6. Lo´pez, P. & J. Burgos, 1995a. Lipoxygenase inactivation by manothermosonication: effects of sonication physical parameters, pH, KCl, sugars, glycerol, and enzyme concentration. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 620–625.
7. Lo´pez, P. & J. Burgos, 1995b. Peroxidase stability and reactivation after heat treatment and manothermosonication. Journal of Food Science, 60: 451–455.
8. Lo´pez, P., A. C. Sa´nchez, A. Vercet, & J. Burgos, 1997. Thermal resistance of tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase at physiological pH. zeitschrift fu¨ r lebensmittel-untersuchung und -forschung, 204: 146–150.
9. Lo´pez, P., A. Vercet, A. C. Sa´nchez, & J. Burgos, 1998, Inactivation of tomato pectic enzymes by manothermosonication. zeitschrift fu¨r lebensmittel-untersuchung und -forschung, 207: 249–252.
10. Muralikrishna, G., M. Nirmala, 2005, Cereal alpha-Amylases—an Overview. Carbo. Poly. 60: 163–173.
11. Osman A.M., 2002, The advantages of using natural substrate-based methods in assessing the roles and synergistic and competitive intractions of barley malt starch-degrading enzymes, J. Inst. Brew. 108(2): 204–214.
12. Raviyan. P., Z. Zhang, H. Feng, 2005. Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation,. Journal of Food Engineering. 70: 189–196.
13. Schmidt, P., E. Rosenfeld, R. Millner, & A. Schellenberger, 1987. Effects of ultrasound on the catalytic activity of matrix-bound glucoamylase, Ultrasonics,25:295-299.
14. Suslick. K.S., Sonochemistry Science, 1990. 247:1439-1445.
15. Suslick K.S. (Ed.) 1988. Ultrasound: Its physical, chemical and biological effects, VCH, New York.
16. Taiz. L. & J. E. Starks, 1977. Gibberellic acid enhancement of DNA turnover in barley aleurone cells, Plant Physiol. 60: 182-189.
17. Tull .D., B. A. Phillipson, B. Kramhùft, S. Knudsen, O. Olsen, & B. Svensson , 2003. Enhanced amylolytic activity in germinating barley through synthesis of a bacterial alpha-amylase , Journal of Cereal Science. 37: 71-80.
18. Xiao. Z., R. Storms, & A. Tsang, 2006. A quantitative starch–iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities, Analytical Biochemistry 351:146–148.

www.SID.ir