

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

سیده مهسا دادپور<sup>۱\*</sup> - مرتضی خمیری<sup>۲</sup> - حمیدرضا صادقی‌پور<sup>۳</sup> - شیوا روفیگری حقیقت<sup>۴</sup> - مهران اعلمی<sup>۵</sup>

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 افزایشده 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 خالص سازی شد. بازده بدست آمده برای آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* ۵۲ درصد و مرتبه خلوص نهایی آنزیم ۱۶/۶۵ به دست 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 ایتیمم و دمای ایتیمم 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

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<sup>۶</sup> 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

میکروارگانیزم‌ها 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 تقریباً بیشتر پکتینازهای تجاری تهیه شده از منابع قارچی به دست می‌آیند (Kapoor et al., 2001).

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان  
(\*) نویسنده مسئول: Email: Mahsa.dadpour@gmail.com  
۲- 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 مرکز تحقیقات چای کشور، لاهیجان

### تهیه عصاره خام حاوی آنزیم

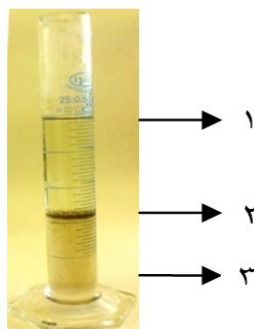
آنزیم پکتین لیاز در محیط تلقیح مایع حاوی پکتین ۱ گرم، L-آسپارژین ۰/۲ گرم، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۰۵ گرم و فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۳ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر با ۴/۵ pH= تولید گردید. ۵ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور (دانسیته اسپور ۱۰<sup>۶</sup> × ۵ اسپور در هر میلی لیتر) از محیط اسلنت آگار بطور کاملاً استریل در ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع در فلاسک ۵۰۰ میلی لیتر 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 ۷۶۰ nm استفاده شد.

### خالص سازی به روش جداسازی سه فازی

در این مرحله نمک آمونیوم سولفات به نسبت ۳۰٪ (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).



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

### تعیین وزن مولکولی

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<sup>۱</sup> و تئاروبیگین<sup>۲</sup> 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 پلی فنول اکسیداز 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، در نتیجه، 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 پکتین لیاز از آسپرژیلوس نایژر<sup>۳</sup> 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<sup>۴</sup> (PDA) بصورت اسلنت آگار و نگهداری در ۳۰°C صورت گرفت.

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

روی چای سیاه تولید شده اندازه‌گیری شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

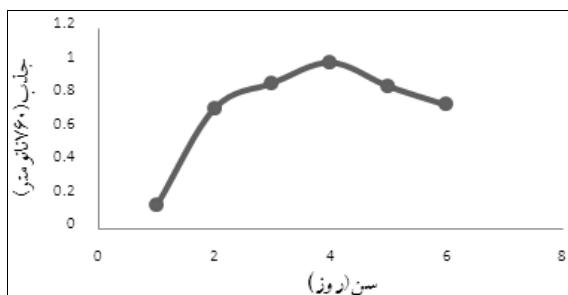
تجزیه و تحلیل آماری بر اساس طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار در ۳ تکرار و با استفاده از نرم افزار SAS انجام پذیرفت، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL انجام شد.

### نتایج و بحث

#### رشد میکروارگانیسم در پروسه تولید آنزیم

بررسی رشد اسپرژیلوس 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 شکل ۲ و ۳ می‌توان اظهار داشت که اسپرژیلوس 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 آنزیم‌های پکتیکی در کپک‌های مختلف از ۱ تا ۶ روز متغیر می‌باشد (Ghildyal et al, 1981).



شکل ۲- منحنی رشد *Aspergillus niger* در دوره تلقیح

خلوص و وزن مولکولی آنزیم توسط روش SDS-PAGE٪۱۲ تعیین گردید. رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بریلیانت بلو<sup>۱</sup> R-250 جهت ظاهر شدن باندها صورت گرفت (Laemmli, 1970).

### اندازه‌گیری میزان پروتئین

مقدار پروتئین محلول توسط روش برادفورد و استفاده از بویون 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 اسپکتروفوتومتر S2000 UV/VIS مدل WPA سنجیده شد. محلول آنزیمی (۰/۲ میلی‌لیتر) به مخلوط واکنش حاوی ۰/۸ میلی‌لیتر پکتین مرکبات (۰/۱w/v) و ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH: ۸) در دمای ۳۷ °C افزوده شد. دانسیته نوری در زمان صفر و بعد از ۲۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با احتساب ضریب خاموشی محصول غیراشباع  $550 \cdot M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  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).

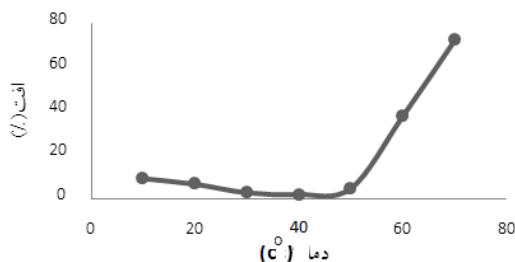
### فراوری چای

فراوری 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 ۳۷°، ۲۵' و طول جغرافیایی ۴۹°، 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 به ترتیب خشک شده، خرد گردید و در معرض دو منبع آنزیمی خام و خالص شده نسبی از نمونه قارچ اسپرژیلوس نایژر قرار گرفتند.

### اندازه‌گیری پارامترهای کیفی چای

در این مرحله، پارامترهای تئافلاوین، تئاروبیگین، رنگ کل، شفافیت (Mahanta & Barouah, 1992)، کافئین (Lakin, 1989)

دست می‌دهند. دمای غیر فعال شدن آنزیم تقریباً همیشه به دنا توره 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.



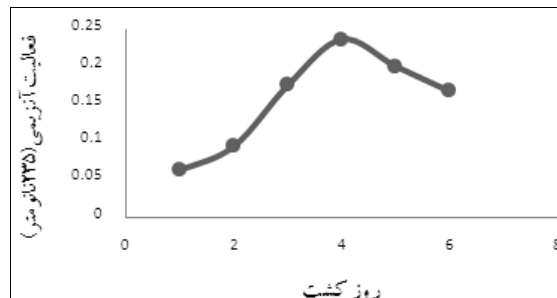
شکل ۵- افت فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در دماهای مختلف.

بر اساس شکل ۵، 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 امر خود به pH بستگی دارد و می‌تواند مستقیماً بر اتصال سوبسترا و خاصیت کاتالیزوری تاثیر بگذارند. روشن است که حالت یونیزاسیون زنجیره‌های جانبی اسید آمینه 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 و حسینی نژاد، ۱۳۸۹).

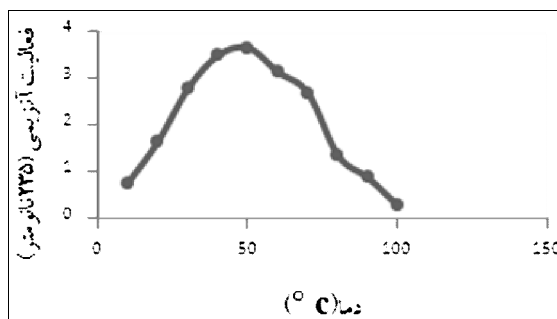
فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر در pH های مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۳- فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در دوره تلقیح، دمای ۲۵°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.

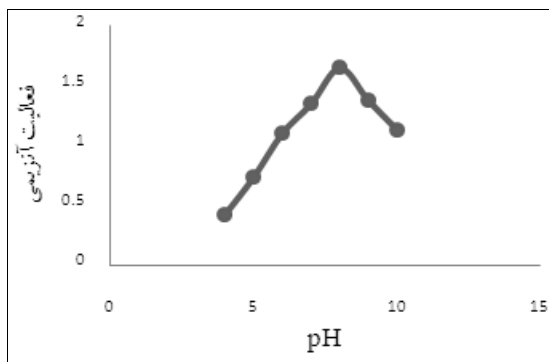


شکل ۴- فعالیت آنزیمی پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در دماهای مختلف

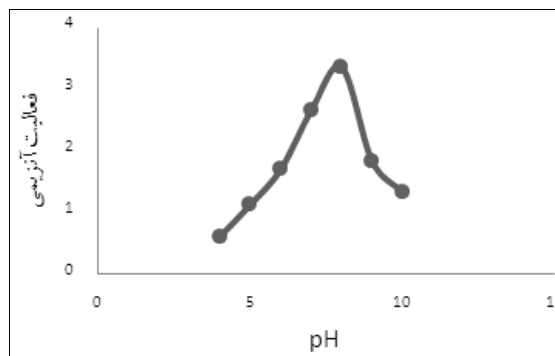
نتایج بدست آمده نشان داد که قرار دادن آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف، سبب حفظ بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۵۰°C گردید و در دماهای بالاتر ۵۰°C فعالیت آنزیمی بطور مشخصی کاهش یافت. نتایج بدست آمده از مطالعات پیشین، دمای بهینه آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر را در دامنه ۴۰-۶۰°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



شکل ۷- مقاومت آنزیمی پکتین لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در pH های مختلف



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

نتایج بدست آمده نشان داد که آنزیم پکتین لیاز حاصل از اسپرژیلوس نایژر در pH=۸ بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸/۹۹٪ فعالیت آنزیمی خود را حفظ نمود. بیشترین مقاومت این آنزیم در دامنه pH=۴-۱۰ مشاهده گردید.

در آنزیم حاصل از اسپرژیلوس نایژر افت فعالیت آنزیمی در pH پایین تر از ۸ (ناحیه اسیدی) و pH بالاتر از ۸ (ناحیه قلیایی) مشاهده شد. این امر می تواند به این صورت نتیجه گیری شود که ناحیه اسیدی منجر به تخریب و ویرانی ساختار سه گانه آنزیم می گردد و در طرف قلیایی، کاهش اشباعیت آنزیم از سوبسترا منجر به افت فعالیت آنزیمی می شود (Hamdy, 2005).

### خالص سازی آنزیم پکتین لیاز به روش جداسازی سه فازی

نتایج خالص سازی آنزیم پکتین لیاز توسط روش جداسازی سه فازی در جدول (۱) نشان داده شده است.

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

همانطور که در شکل نشان داده شده است، در آنزیم حاصل از اسپرژیلوس 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 pH های پایین تر از ۸ محسوس تر بود. وقتی pH از میزان اپتیمم فاصله پیدا کند، خواص عملکردی و کارآمد آنزیم تغییر می یابد و این امر را می توان 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 پکتین لیاز از اسپرژیلوس نایژر را در رنج ۸-۶ تایید نمودند (Hamdy, 2005-- Rasheedha et al., 2010 Yadav et al., 2007).

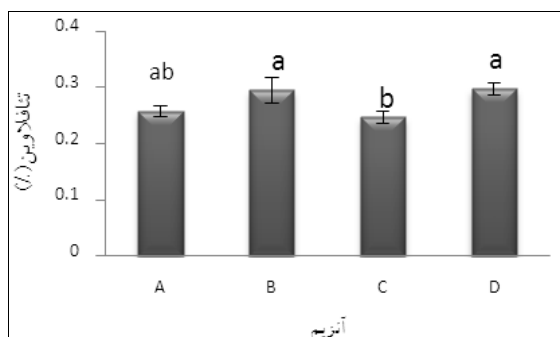
### بررسی مقاوت آنزیمی پکتین لیاز در pH های مختلف

pH علاوه بر کم کردن فعالیت کاتالیتیکی، بر پایداری آنزیم نیز اثر مشخصی به جای می گذارد. بدین سبب آنزیم ها نه تنها از نظر امکان فعالیت بلکه از نظر پایداری یک گستره محدود pH دارند. نتایج مقاومت آنزیمی پکتین لیاز حاصل از *Aspergillus niger* در pH های مختلف در شکل ۷، نشان داده شده است.

جدول ۱- خالص سازی آنزیم پکتین لیاز از *Aspergillus niger* به روش جداسازی سه فازی

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

\* هر واحد U برابرست با فعالیت آنزیمی صورت گرفته برای تشکیل ۱ میکرومولار محصول غیر اشباع در هر دقیقه.



شکل ۹- 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 پکتیناز 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 ۲۹۷۶٪ از خود نشان داد. عصاره خام 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، در نتیجه قرار گرفتن سوبستراهای کاتکینی چای در برابر آنزیم پلی فنول اکسیداز بیشتر می شود که این امر اثر بیشتر آنزیم خالص نسبت به خام را روی این فاکتور تایید می کند. 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 پکتیناز حاصل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور تئاروبیگین در شکل ۱۰، نشان داده است.

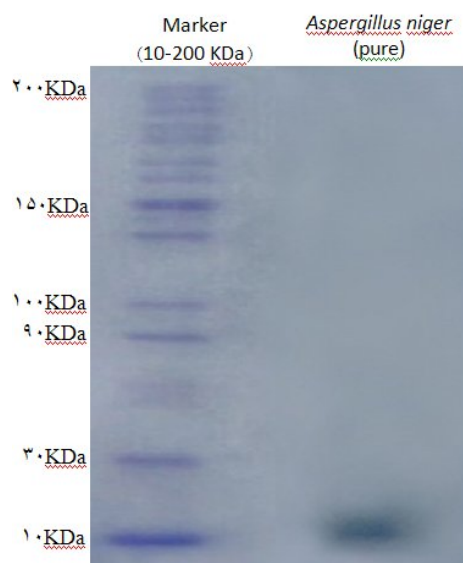
از بین تیمارهای صورت گرفته، تنها آنزیم پکتیناز تجاری (۱۲/۵۸۵۱٪) اثر افزایشی روی مقدار تئاروبیگین از خود نشان داد. اما آنزیم خام و خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر اثر افزایشی بر میزان تئاروبیگین نداشت.

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

نتایج حاصل از خالص سازی آنزیم پکتیناز از آسپرژیلوس نایژر نشان داد که فعالیت آنزیمی تا میزان ۱۷/۷۹ واحد در هر میلی لیتر 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 پکتیناز حاصل از آسپرژیلوس نایژر معادل ۱۲ کیلو دالتون می باشد (شکل ۸).



شکل ۸- تعیین وزن مولکولی آنزیم پکتیناز حاصل از *Aspergillus niger* توسط روش SDS-PAGE

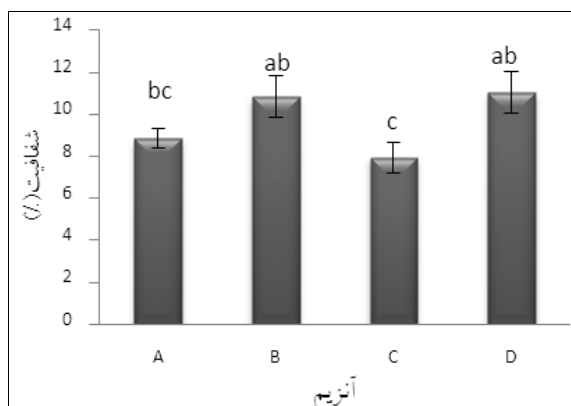
### نتایج حاصل از آزمون‌های کیفی چای فراوری شده اثر آنزیم بر میزان تئافلاوین

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

چای نقش دارند (Owuor & Obanda, 2001). از آنجا که تیمارهای مورد آزمون اثری روی افزایش تئاروبیگین نداشت، می‌توان دلیل کاهش درصد رنگ کل را نیز توجیه نمود.

### اثر آنزیم بر شفافیت

نتایج اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص پکتین لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور شفافیت نشان داد که آنزیم دارای اثر افزایشی بر میزان شفافیت می‌باشد (شکل ۱۲).



شکل ۱۲- اثر آنزیم بر شفافیت

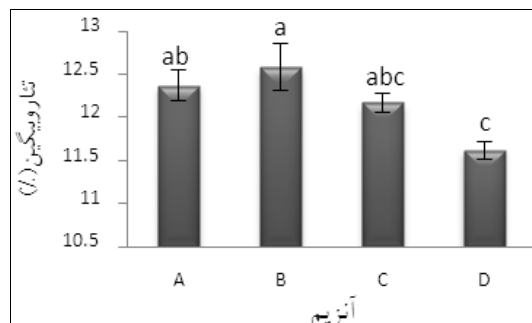
شاهد: A، آنزیم پکتیناز تجاری؛ B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*؛ C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*؛ D

از بین تیمارهای صورت گرفته، آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر بیشترین اثر را روی درصد شفافیت به میزان ۱۱/۰۲٪ از خود نشان داد. آنزیم خالص حاصل از آسپرژیلوس نایژر و پکتیناز تجاری به ترتیب سبب افزایش مقدار تئافلایون به میزان ۲۴/۶۲٪ و ۲۲/۳۹٪ شدند. اما اثر آنزیم خام حاصل از آسپرژیلوس نایژر اثر افزایشی بر میزان شفافیت نداشت. فاکتور شفافیت نیز تحت تاثیر تئافلایون می‌باشد. هرچه میزان تئافلایون در چای استحصالی بیشتر باشد، شفافیت چای نهایی نیز افزایش می‌یابد (Obanda et al., 2004- Owuor & Reeves, 1986).

### اثر آنزیم بر نسبت تئافلایون به تئاروبیگین

یک فرآیند تخمیر ایده‌آل، منجر به ایجاد یک تعادل مناسب بین تئافلایون و تئاروبیگین می‌گردد (Angayarkanni et al., 2002). نسبت بین تئافلایون و تئاروبیگین اثر مستقیم روی رنگ چای دارد. نتایج اثر عصاره خام آنزیمی و آنزیم خالص پکتین لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر بر نسبت تئافلایون به تئاروبیگین در شکل ۱۳، نشان داده شده است.

تئاروبیگین را می‌توان تنها به شرایط زمان و دمای مرحله تخمیر نسبت داد، زیرا میزان تبدیل تئافلایون به تئاروبیگین تحت تاثیر دما و طول مدت تخمیر نیز می‌باشد (Obanda et al., 2004).

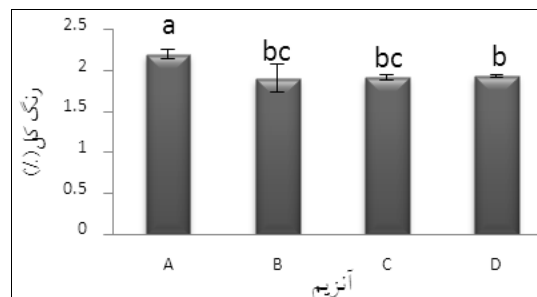


شکل ۱۰- اثر آنزیم بر میزان تئاروبیگین

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 پکتین لیاز حاصل از آسپرژیلوس نایژر روی فاکتور رنگ کل در شکل ۱۱، نشان داده شده است.

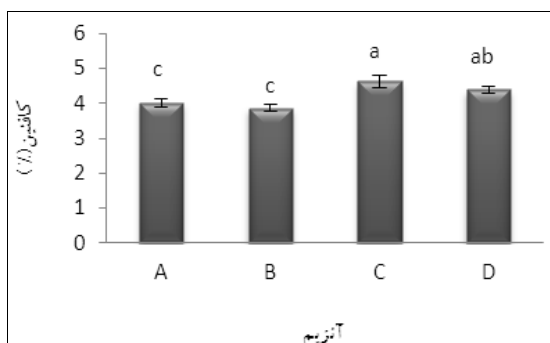


شکل ۱۱- اثر آنزیم بر میزان رنگ کل

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

رنگ کل فاکتوری است که مقدار آن تحت تاثیر دو فاکتور تئافلایون و تئاروبیگین می‌باشد. معمولاً حدود ۳۰٪ از رنگ کل نهایی به تئافلایون و بقیه به تئاروبیگین نسبت داده می‌شود (Obanda et al., 2004- Owuor & Reeves, 1986). در نتیجه عدم افزایش درصد رنگ کل در اثر تیمارهای انجام شده را می‌توان به مقدار تئاروبیگین نسبت داد. عوامل دیگری که باعث افزایش این صفت می‌شوند، تنها محصولات اکسیداسیون نیستند بلکه پیگمان‌های رنگی دیگری مانند کاروتنوئید، تئوفیلین و تئوفورباید نیز در ایجاد رنگ نوشابه چای تاثیر دارند. دو ترکیب آخر حاصل تجزیه کلروفیل در مرحله خشک می‌باشند که در ایجاد رنگ سیاه و قهوه‌ای در نوشابه

همکاران(۲۰۰۰)، مورگسان و همکاران(۲۰۰۲) و وانگ و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت داشت.



شکل ۱۴- اثر آنزیم بر میزان کافئین.

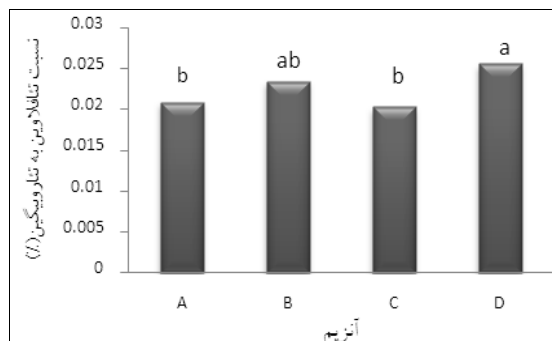
شاهد: A، آنزیم پکتیناز تجاری؛ B، عصاره خام آنزیمی حاصل از *Aspergillus niger*؛ C، آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger*

### نتیجه گیری

در این بررسی، استفاده از روش جداسازی سه فازی در خالص سازی آنزیم پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* می‌تواند میزان کافئین را ۱۶/۶۵۲٪ و بازده فعالیت ۵۲٪ را نشان داد. این مدت تنها نیازمند یک ساعت زمان جهت خالص سازی بوده، بنابراین فرایندی کارآمد و اقتصادی محسوب می‌گردد و دارای پتانسیل بالایی برای خالص سازی آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی می‌باشد. همچنین اثر آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger* 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

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



شکل ۱۳- 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*

با توجه به شکل ۱۳، مشخص گردید که آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger* می‌تواند بیشترین اثر را روی نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین (۰/۰۲۵۶٪) داشته باشد. آنزیم خالص حاصل از *Aspergillus niger* و پکتیناز تجاری به ترتیب سبب افزایش نسبت تئافلاوین به تئاروبیگین به میزان ۲۲/۷۷٪ و ۱۲/۴۴٪ شدند. اما اثر آنزیم خام حاصل از آن *Aspergillus niger* می‌تواند بیشترین اثر افزایشی بر این فاکتور نداشته باشد. چون میزان فعالیت ویژه در نمونه آنزیمی خالص، بیشتر از آنزیم خام است، دیواره سلولی بیشتر تخریب شده، در نتیجه 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 شکل ۱۴، نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که تخمیر چای توسط عصاره خام آنزیمی، آنزیم خالص پکتین‌لیاز حاصل از *Aspergillus niger* می‌تواند میزان کافئین چای را افزایش دهد. از بین تیمارهای انجام شده، عصاره خام آنزیمی *Aspergillus niger* 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 آنکایارکانی،

### منابع

شهیدی، ف. و حسینی نژاد، م. ۱۳۸۹. در ترجمه آنزیم‌ها 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



- 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 sector: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 Agriculture, 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  $\alpha$ -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 penicillium 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.