

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

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

امیر آراسته¹، ریحانه سریری²، فاضل نجفی یاسوری²، علی صالح زاده¹، محمود نجفیان³

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 آزاد اسلامی 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 میکروارگانیسم 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 دامنه تفاوت های موجود در طعم و کیفیت آن ناشی از رویدادهای متابولیکی پیچیده ای 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 سیتیکی 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، تیاریوجین، 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.

نتیجه گیری: 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.

واژه های کلیدی: کیفیت چای، سلولاز، آسپرژیلوس، اسپکتروفوتومتری، پلی فنول

بررسی اثر سلولاز جداسازی شده از قارچ *آسپرژیلوس نیجر*

مقدمه

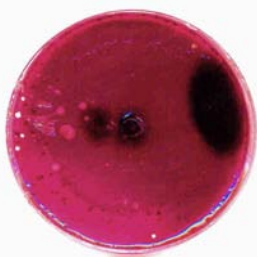
امروزه چای بعنوان یکی از پرطرفدارترین نوشیدنی‌ها در جهان مطرح است و ویژگی‌های کاربردی و اثرات فیزیولوژیکی آن بر روی سیستم‌های زنده، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است (1). از این رو بررسی عوامل مختلف بر روی کیفیت این محصول در سطح اقتصادی حائز اهمیت می‌باشد (2). در سال 1965، تغییرات کمی پلی فنول‌های چای در حین پردازش برگ‌ها 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 می‌باشد (4). چای سبز که کمترین زمان تخمیر را داراست، بلافاصله پس از چیده شدن برگ‌ها، تیمار حرارتی روی آن انجام می‌گیرد که شامل حرارت دادن و عرق‌گیری می‌باشد. دم کرده این چای، سبز رنگ است. در عوض چای قرمز، متوسط زمان فراوری را تجربه کرده و پس از دم کردن برنگ قرمز در می‌آید (5).

چای سیاه عمومی‌ترین نوع تجاری چای است و با بیشترین میزان اکسیداسیون آنزیمی در حین فراوری تهیه می‌شود و بیشترین زمان تخمیر را در حین تخمیر تجربه می‌کند. 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 می‌شوند. چای سبز چایی است که تخمیری روی آن صورت نگرفته است و پس از چیده شدن برگ‌ها، تیمار حرارتی روی آن انجام می‌گیرد که شامل حرارت دادن و عرق‌گیری می‌باشد و پس از خشک شدن به صورت دم کرده مورد استفاده قرار می‌گیرد که سبز رنگ است. فرایند اکسیداسیون، در مرحله تخمیر و بلافاصله پس از چیدن برگ‌های سبز چای انجام می‌گیرد. در حین تخمیر با عملکرد آنزیم‌های سلولولیتیک مترشح شده از انواع میکروارگانیسم‌ها، 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 می‌گردد. تیروزیناز (EC: 1,14,18,1) که یکی از انواع متالوآنزیم‌ها است (ساختمان آن حاوی مس است) از جمله این پلی فنول اکسیدازها محسوب می‌شود (6). کاتچین‌ها و سایر ترکیبات پلی فنولی موجود در برگ چای در طی این فرایند، پلیمریزه

شده و ترکیبات قرمز مایل به قهوه‌ای بنام تیافلاوین و تیاریوجین را بوجود می‌آورند که مسئول رنگ و بوی منحصر به فرد چای سیاه می‌باشند. تیافلاوین‌ها، کاتچین‌های دیمری هستند که در ایجاد رنگ زرد- نارنجی چای سهیم هستند و در طی فرایند تخمیر چای سیاه حاصل می‌شوند. این کار از طریق اکسیداسیون عامل هیدروکسی حلقه B در کاتچین‌کینون‌ها مثل اپی کاتچین (EC) و یا یک گالوکاتچین‌کینون (حلقه B با سه عامل هیدروکسی) مثل اپی گالو کاتچین، صورت می‌گیرد. با این وجود تیافلاوین‌ها کاملاً پایدار نیستند و می‌توانند به تیاریوجین اکسید شوند. تیاریوجین‌ها، گروه‌های هتروژن از پلیمرهای کاتچینی هستند که می‌توانند مستقیماً از کاتچین‌ها بوجود آیند. البته در برگ چای علاوه بر پلی فنول‌ها، ترکیباتی مثل کافئین، تیوفیلین، تیوبرومین، تانن، اسید اسکوربیک و برخی اسیدهای آمینه و نمک‌ها نیز وجود دارند (7-9). در روش‌های سنتی فراوری چای از فرایند CTC برای برداشتن سد مکانیکی بین آنزیم پلی فنول اکسیداز و سوبسترای پلی فنولی آن استفاده می‌شود (10).

سلولز پلیمر کریستالین از D-گلوکز است که با نظم خاصی در طبیعت و بافت‌های سلولزی کنار هم چیده شده است. در این حالت اکثر میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه آن نیستند و فقط بعضی از آنها قادر به تولید سلولاز‌های تجزیه‌کننده سلولز کریستالین می‌باشند. محصول این سلولازها، سلولز آمورف می‌باشد که توسط گروه دوم سلولازها مورد تجزیه قرار می‌گیرد و تولید محصولاتی با تعداد منومر‌های قندی مختلف می‌نمایند. مرحله آخر تجزیه سلولز، تبدیل این محصولات چند قندی به واحدهای دو قندی بنام سلوبیوز و تجزیه سلوبیوز توسط سلوبیاز است. سلولازها که پیوندهای گلیکوزیدی در سلولز را هیدرولیز می‌کنند، می‌توانند به چهار خانواده پروتئینی مختلف، تقسیم بندی شوند. اندوبتاگلوکاناز پیوندهای گلیکوزیدی را بصورت تصادفی و از درون یک زنجیره سلولزی هیدرولیز می‌کند درحالیکه اگزوبتاگلوکاناز پیوندهای گلیکوزیدی را از انتهای غیر احیاء کننده سلولز هیدرولیز می‌کند. سلوبیوهیدرولاز (CBH) پیوندهای گلیکوزیدی را از انتهای غیر احیاء کننده زنجیره سلولز میکروکریستالین هیدرولیز می‌کند و محصول آن سلوبیوز می‌باشد و نهایتاً بتا گلوکوزیداز یا سلوبیاز که مسئول هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی در سلوبیوز می‌باشد و محصول آن گلوکز است. در این تحقیق، آنزیم‌های سلولولیتیک مورد نیاز از قارچ

شد. از کلنی‌های خالص شده بعنوان منبع میکروبی جهت کشت در محیط جامد سورانژیوم استفاده گردید. نمونه‌ها برای مدت 8 روز در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار گرفته و در طی این مدت قارچ‌های تولیدکننده 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 هاله قرمز شفاف در اطراف کلنی‌های رشد کرده در یک زمینه کدر است (11).



شکل 1. تست تشکیل هاله برای سنجش فعالیت سلولاز

محیط اختصاصی اسپرژیلوس با شرایط و ترکیبات بهینه جهت تولید سلولاز استفاده گردید. قبل از آن نمونه‌ها در یک محیط پیش کشت حاوی آب، نمک‌های مختلف و پیتون تکثیر شده و سپس یک دهم حجم از آن در شرایط استریل به محیط کشت اصلی وارد شد. در این محیط نمونه‌ها 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 می‌دهد.

جدول 2. اجزای محیط اصلی تولید سلولاز

میزان کمی برحسب گرم بر لیتر	اجزای محیط کشت
30	Cellulose
0/3	L-glutamic Acid
1/4	NH ₄ NO ₃
2 میلی لیتر	Tween 80
2	KH ₂ PO ₄
0/3	CaCl ₂
0/3	MgSO ₄
0/75	Peptone
0/005	FeSO ₄ , 7H ₂ O
0/0016	MnSO ₄ , H ₂ O
0/0014	ZnSO ₄ , 7H ₂ O
0/002	CoCl ₂
1 لیتر	Distilled water

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

روش بررسی

برای جداسازی قارچ‌های جنس اسپرژیلوس 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 نمک‌های 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 میکروارگانیزم‌های 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

میزان کمی برحسب گرم بر لیتر	اجزای محیط کشت
1/5	KNO ₃
1/5	K ₂ HPO ₄
0/2	Mg SO ₄
0/1	CaCl ₂
0/02	FeCl ₃
15	Agar
10	Cellulose
1 لیتر	Tap water

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 گونه‌های قارچی حاصل از این مرحله در محیط سابورو دکستروز آگار و با روش کشت خالص با فیلدوپلاتین خالص سازی شدند. شناسایی قارچ جنس اسپرژیلوس از بین قارچ‌های سلولاز مثبت خالص شده بر روی محیط سابورو دکستروز آگار به روش Slide culture انجام شده. علاوه بر این، اسلاید تهیه شده از کلنی‌های خالص با میکروسکوپ نوری و با عدسی 10x مورد مطالعه قرار گرفته و با اطلس تصویری میکروبیولوژی (Burton E. Pierce 2004) مقایسه

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 G100 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 تأیید قرار گرفت. جهت تعیین دمای ایتیمم، مخلوط 1 به 1 از آنزیم و سوبسترا بمدت 30 دقیقه در دماهای مختلف (بین 30-90 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.

ایزوبوتیل متیل کتون به نسبت یک به یک با محلول سرد شده چای انجام شده و محلول رویی برای تست سنجش کمی تیافلورین استفاده گردید. برای این کار 2 میلی لیتر محلول بدست آمده با 4 میلی لیتر از اتانول و 2 میلی لیتر از معرف فلاوگونوست مخلوط گردید. از این محلول پس از 15 دقیقه به عنوان نمونه فتومتریک استفاده گردید. میزان میکرومول بر گرم از تیافلورین در نمونه چای خردشده از فرمول زیر قابل محاسبه می باشد (3, 14).

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

اندازه گیری رنگ تام محلول بر روی 5 میلی لیتر از محلول صاف شده 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.

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

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:

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

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).

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

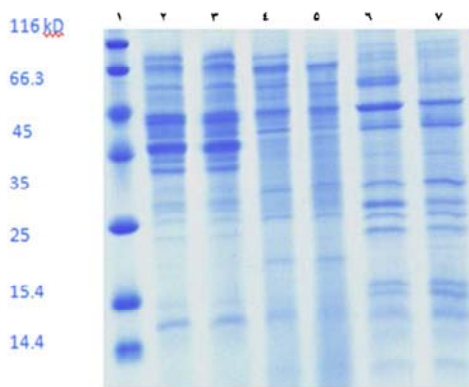
یافته ها

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.

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 نمونه 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 تیافلورین تام به روش فلاوگونوست 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 پارچه کتان تمیز صاف گردید. فرایند استخراج با حلال توسط مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی

با توجه به تأیید حضور بالاترین میزان آنزیم پس از گذشت 30 ساعت از زمان شروع تولید، از آنزیم های بدست آمده در این مرحله هم بعنوان عصاره 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 تأیید می شود.

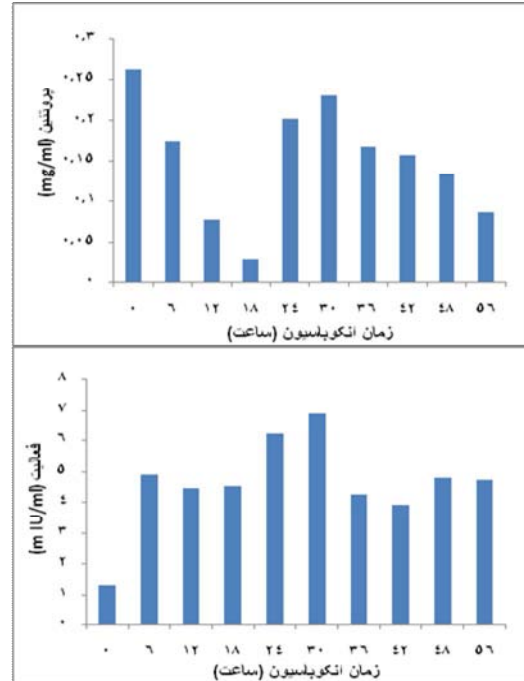


شکل 4. تصویر مربوط به ژل SDS Page همراه با مارکر وزن مولکولی (ستون شماره 1 مربوط به مارکر وزن مولکولی و ستون های 2 و 3 مربوط به استخراج با اتانول، ستون های 4 و 5 مربوط به استخراج با استون و ستون های 6 و 7 مربوط به روش استخراج با نسبت 2 به 1 از اتانول و استون می باشند)

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.

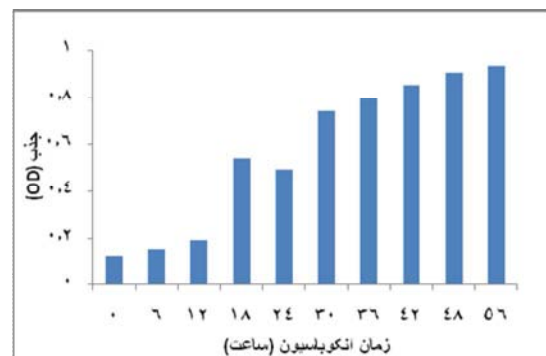
جدول 3. ویژگی های دو نمونه آنزیمی

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



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 تأیید حضور آنزیم در محیط است. کمترین میزان فعالیت مربوط به شروع دوره 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 میکروارگانیسم ها بروش کدورت سنجی در حین فرایند تولید آنزیم

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 محاسبه 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 مقایسه مقادیر فعالیت ویژه در نمونه 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 فراوری و نیز میزان تولید آنزیم توسط میکروارگانیزم های همزیست گیاه چای در حین فراوری 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 فراوری نیز می توان به نتایج خوبی دست یافت (17).

نتیجه گیری

بطور کلی 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 تأیید شده و نشان می دهد هرچه میزان خلوص آنزیمی بالاتر باشد، شاهد میزان ارتقای بیشتری در فاکتور های کیفی چای هستیم.

تشکر و قدردانی

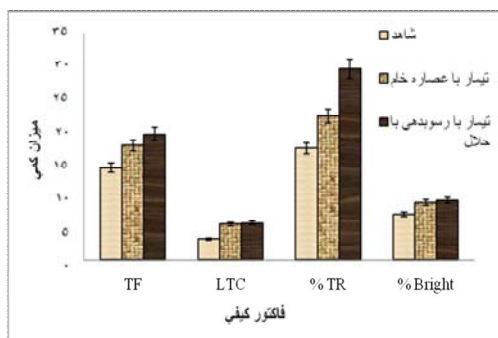
از تمامی دانشجویان و کارکنان آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه گیلان نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

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 نسبتاً ارزان تخلیص نسبی آنزیم می توان این روش در مقیاس صنعتی نیز سود جست.

جدول 4. مقایسه مؤلفه های فعالیت و غلظت دو نمونه 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)

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, García-Molina F, Berna J, García-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.