بررسی اثر شدت و زمان فراصوت بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده توسط کپک *آسپرژیلوس اوریزه* PTCC 5164 در بستره های کشت جامد با درصد ترکیب مختلف سوبستراهای گندم و جو

هانیه بیات[1]، فریده طباطبایی یزدی[2*]، سید علی مرتضوی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۱۹)

چکیده

در این بررسی برای تعیین اثر زمان و شدت صوت دهی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، کپک *آسپرژیلوس اوریزه* PTCC 5164 به عنوان مولد آنزیم در بستره های کشت جامد بکار گرفته شد. سوبسترای استفاده شده ترکیبی از گندم و جو (۱۰۰:۰، ۵۰:۵۰، ۰:۱۰۰) تحت تیمار اولتراسوند با شدت ۳۵، ٦۷/۵ و ۱۰۰٪ در زمان های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه قرار گرفتند.

آنالیز نتایج با نرم افزار Design Expert 6.0.2 نشان داد، اثر اولتراسوند بر آنزیم تولید شده در بستره های کشت، متفاوت است. آلفا آمیلاز تولید شده در بستره کشت جامد جو مقاومت بیشتری نسبت به گندم در خلال صوت دهی نشان داد. همچنین با افزایش زمان و شدت صوت دهی، آثار منفی کاویتاسیون مشهود تر شده و فعالیت آنزیم کاهش نشان داد. کاهش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده بستگی به مدت زمان و شدت صوت دهی و همچنین ترکیب بستره کشت جامد داشت. اولتراسوند احتمالا با تغییر $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ و تغییر در ساختار دوم آنزیم بخصوص ساختار ورقه ای بتا بر روی فعالیت آنزیم اثر مهار کنندگی دارد. همچنین ساختار سوم پروتئینی آنزیم تحت تاثیر تیمار اولتراسوند تغییر پیدا میکند.

کلید واژگان: فراصوت، آنزیم آلفا آمیلاز، *آسپرژیلوس اوریزه*، فعالیت آنزیمی

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

آلفا آمیلاز (اندو-۱،٤ – آلفا- دی گلوکان گلوکانو هیدرولاز ۱. ۱. ۲. ۳ EC) اندو آنزیم خارج سلولی است که به طور تصادفی پیوندهای ۱،٤ گلوکز های مجاور را در زنجیره آمیلوز شکسته و نهایتا واحدهای گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز تولید میکنند. آلفا آمیلاز یک متابولیت اولیه گزارش شده است که تولید آن وابسته به میزان رشد میکرورگانیسم ها است.

بستر کشت جامد[1] همانند یک منبع ذخیره ای مغذی قادر به توانا کردن میکروارگانیسم ها به تکثیر میباشد. این فرایند طبیعی در کاربردهای صنعتی میتواند به عنوان ابزار کنترلی برای تولید محصول دلخواه به کار رود. برای تولید تجاری آنزیم های میکروبی از برخی روش های تخمیر بر روی بستره جامد استفاده میشود [۱].

کپک آسپرژیلوس تولید کننده رنج وسیعی از آنزیم های خارج سلولی است که آمیلاز ها از مهم ترین آنزیم های مورد استفاده در صنعت از عمده ترین آنزیم های تولیدی آنها میباشد [۲] در بین گونه های آسپرژیلوس ، *آسپرژیلوس اوریزه* بطور ویژه ای مورد توجه است زیرا قادر به تولید مقدار بسیار بالایی از پروتئین ها و آنزیم های صنعتی نظیر آلفا آمیلاز است و به همین دلیل محبوب ترین میزبان برای تولید پروتئین های غیر سرم انسانی است [۳].

از دهه ۱۹۵۰ آمیلاز های قارچی برای تولید شربت شکر ، مورد استفاده است. آمیلاز ها همچنین در گستره ی وسیعی از صنعت غذا به خصوص نانوایی، کاغذ سازی، نساجی، شوینده ها و پاک کننده، همچنین تولید غذای دام و طیور، کیک، آبمیوه، کمک های گوارشی و... کاربرد دارد.

ضایعات کارخانجات صنایع غذایی و کشاورزی ضایعات پنهان هستند که حاوی مقادیر بالایی از کربوهیدرات های خاص، پروتئین ها، بیوپلیمرها و ... هستند. از این مواد به عنوان محیط کشتی ارزان برای رشد میکروارگانیسم های مورد نظر و تولید انواع فرآورده ها از قبیل آنزیم ها، رنگ دانه ها، اسیدهای آلی و ... میتوان استفاده نمود [٤].

اخیرا استفاده از امواج فراصوت به عنوان یک فرایند غیر حرارتی استخراج در فرایندهای بیوتکنولوژیکی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. اولتراسوند در فرایندهای بیوتکنولوژیکی در مقیاس آزمایشگاهی استفاده شده و نیاز به تجهیزات سنگین و پیچیده ندارد. امواج اولتراسوند قادر به تغییر ساختار و عملکرد مولکولهای بیولوژیکی است. بیشترین مکانیسم واکنشی آن شامل تاثیرات گرمایی و شیمیایی و تحریک فعالیت کاویتاسیون مواد غذایی میگردد [٤]. طی فرایند صوت دهی، حرکت طولی موج صوتی به دلیل اینکه حرکت ارتعاشی مولکول های محیط به جلو و عقب، بدون سبب حرکت این لایه ها شود، فازهای متناوبی از انقباض و انبساط فشرده را ایجاد می کند. در نتیجه، در نقطه ای که لایه مولکول های ماده معمول شدند، فشار بیشتر و در ناحیه کم تراکم، فشار کمتر از حد فشار می شود در نتیجه شرایطی که در فاز انبساط پدید می آید، بر منفی ایجاد شده و فاصله بین مولکول ها تا حدی زیاد می شود که بر نیروی چسبندگی مایع غلبه کرده، مایع شکسته می شود و حفره هایی در آن به وجود می آید. این حفر ه ها را حبا بهای حفره سازی می نامند و در لحظه انقباض بعدی این حباب ها فشرده و منقبض می شوند و حجم آنها کاهش می یابد. در فاز انبساط، دوباره بزرگ می شوند این روند در چند دوره انقباض و انبساط ادامه می یابد تا حباب ها، به حداکثر حجم برسند. پس از آن، حباب ها در دوره انقباض ها منفجر می شوند و به اصطلاح فرو می ریزند. فروریزی این حباب ها سبب ایجاد پیک های فشار و دما تا دمای k5500 و فشار atm 2000 در مایع می شود. به طور معمول شوک ناشی از این فشار عامل ایجاد آثار فراصوت است [٥].

همچنین مشاهده شده است مولکولهای زیستی در اثر امواج فراصوت به علت تاثیرات مکانیکی آن غیر فعال میشوند برای مثال جریان مخالف امواج شوک دهنده اولتراسوند باعث افزایش تنش برشی میگردد [٤]. تاثیر امواج اولتراسوند بر روی آنزیم ها

1. Solid State Fermentation (SSF)

نیز اثبات شده است. این تـاثیر میتوانـد بـه چنـد صـورت باشـد:

۱. کمک به واکنش های بیولوژیکی

۲. کاهش فعالیت بسیاری از آنزیم ها در محیط آزمایشگاهی

۳. در بعضی موارد افزایش فعالیت آنزیم های آزاد [٦].

پژوهش های چندی خاطر نشان کرده اند که امواج فراصوت قادر به افزایش واکنش کاتالیتیکی آنزیم هـا میگـردد. در همـین زمینـه گزارش هایی وجود دارند که تاثیر امواج فراصوت را در افـزایش سرعت هیدرولیز مولکولهای نشاسته و ساکارز توسط آلفا آمـیلاز [۷ و ۸] و یا افزایش سرعت هیدرولیز قنـد لاکتـوز شـیر تحـت تیمار اولتراسوند [۹] ثابت نموده اند. همچنین مطالعـات بـسیاری نیز تاثیر منفی امواج اولتراسـوند را روی فعالیـت آنـزیم گـزارش کرده اند [۱۵-۱۰] و کمتر، افزایش فعالیت آنـزیم هـای آزاد در محیط آزمایشگاهی دیده شده است. بر خلاف انتظار برخی آنـزیم هـا از جملـه آنـزیم آلفـا آمـیلاز و گلوکـو آمـیلاز تحـت تیمـار اولتراسوند در فرکانس های پایین غیر فعال نشده اند [١٦].

هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر امواج فراصوت بر میـزان فعالیت آنزیم آلفا آمـیلاز تولیـد شـده توسـط کپـک آسـپرژیلوس اوریزه در بستره کشت جامد با درصدهای متفاوت گندم و جو بـا استفاده از نرم افزار Design expert و با استفاده از روش سطح پاسخ است.

۲- مواد و روش ها

آسپرژیلوس اوریزه PTCC ٥١٦٤ از مرکز کلکسیون قارچ هـا و باکتری های صنعتی ایران بصورت لیوفیلیزه خریداری شـد. کپـک در محیط کشت مایع طبق دستور العمل فعـال سـازی همـراه هـر سوش فعال شده و از سوسپانسیون آماده شده ،کشت به صـورت مورب روی محیط کشت PDA[2] انجام شد پس از ٤ روز رشـد در دمای ۲۳ درجـه سـانتیگراد، سـوش هـای کپکـی در ٤ درجـه سـانتیگراد ذخیـره شـدند. کـشت دوبـاره جهـت احیـای کپـک *آسپرژیلوس اوریزه* هر دو هفته یکبار انجام شد [۱۷].

۲-۱- آماده سازی مایع تلقیح

به روش فرانسیس و همکاران (۲۰۰۳) [۱۷] انجـام میگیـرد. ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۱٪ توئین ۸۰ به پرگنه کاملی بعـد از ۷ روز کـشت روی محـیط کـشت مـورب PDA منتقـل شـد. اسپورها توسط سوزن تلقیح تحت شرایط اسپتیک خارج شـدند و به صورت همگن هم زده شـد و بـا رقـت متناسـب ($۲/۲ \times ۱۰^{٦}$ اسپور در میلی لیتر) به عنـوان سوسپانـسیون اصـلی تلقـیح مـورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- شمارش اسپور ها

شمارش اسپور ها به روش فرانسیس و همکـاران (۲۰۰۳) انجـام میگیرد.تعداد کلی اسـپورهای کپـک روی محـیط کـشت PDA توسط تکنیک شمارش کلی انجام شد بدین ترتیب که اسپورهای کپک را توسط یک سوزن انتقـالی اسـتریل در ۱۰ میلـی لیتـر آب مقطر حاوی ۰/۱٪ توئین ۸۰ معلق کرده و به صورت متوالی از آن رقت تهیه میکنیم. یک میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور روی پلیت استریل حاوی PDA استریل ریخته شده و به صورت یکنواخـت پخش میشود. سپس پلیت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بـه مـدت ٤٨ ساعت انکوبه گذاری میشود. تعداد کلنی های قابـل شـمارش بین ٦ تا ۳۰۰ کلنی در هر پلیت انتخاب شد. تراکم اسپور با تعداد ضرب در فاکتور رقت محاسبه گردید.

۲-۳- آماده سازی سوبسترای بستر کشت جامـد گندم و جو

گندم و جو از بازار محلی مشهد خریداری شد و پس از الـک و گرفتن ذارت و گرد و خـاک اضـافی توسـط جریـان ملایـم آب جهت جلوگیری از آسیب رسیدن به دانه ها شستـشو شـد. مـدت زمان شستشو را به حد امکان کاهش میدهیم. سپس دانه ها توسط جریان ملایم هوا و زیر نور خورشید به مدت ٤٨ سـاعت خـشک شد. سپس دانه های جو تا رسیدن به اندازه ۲ میلـی متـر آسـیاب شده و بلغـور حاصـل جهـت مراحـل بعـدی آزمـایش در دمـای یخچال و در ظروف با درپوش مناسب ذخیـره شـد. بـرای آمـاده

2. Potato Dextrose Agar

سازی بسترهای کشت از فرانسیس و همکاران (۲۰۰۳) به ترتیب زیر استفاده میشود.

۵ گرم از نمونه بلغور را توزین کرده و در ارلن مایر های ۲۵۰ میلی لیتری میریزیم و به آن محلول نمکی مغذی (۲ میلی لیتر) حاوی (درصد گرم بر گرم سوبسترای خشک): پتاسیم فسفات: ۱، آمونیوم نیترات: ۱، کلرید سدیم: ۰/۲، و منیزیم سولفات ۷ آبه : ۰/۲ افزوده میشود. سپس آب مقطر تا رسیدن به رطوبت مناسب افزوده شده، محتوای ارلن کاملا مخلوط شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار psi ۱۵، به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو میشود [۱۷].

پس از استریل بستره کشت جامد میزان مشخصی از سوسپانسیون اصلی تلقیح کپک به بستره تلقیح گردید و در انکوباتور برای گذراندن فرایند تخمیر قرار گرفت.

۲-٤- استخراج آنزیم

پس از تلقیح کپک *آسپرژیلوس اوریزه* به بستر کشت جامد بلغور جو ، محتوای ارلن ها هم زده شده و در دمای مورد آزمون (۲۵درجه سانتیگراد) گرم خانه گذاری میشود. پس از طی مدت زمان لازم برای تخمیر (۹٦ ساعت) ارلن ها از انکوباتور خارج میشوند. برای استخراج آنزیم از روش ساده و مستقیم محلول نشاسته استفاده میشود. بدین ترتیب که به ارلن حاوی بستر کشت آب مقطر حاوی ۰/۱ ٪ توئین ۸۰ افزوده میشود تا حجم مایع به ۱۰۰ میلی لیتر برسد. سپس طبق طرح آزمایشی تحت تیمار امواج فراصوت قرار گرفت (مدت زمان صوت دهی : ۵،۱۰ و ۱۵ دقیقه، شدت صوت دهی: ۳۵، ٦۷/۵ و ۱۰۰ ٪ شدت دستگاه وترکیب سوبسترای بستره کشت جامد: بستره ۱۰۰٪ گندم، بستره ۱۰۰٪ جو، بستره با درصد مساوی از گندم و جو). سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق توسط روتاری شیکر (۱۵۰ rpm) محتوا کاملا همگن شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ میگردد. پس از اتمام سانتریفوژ سوپرناتانت حاوی آنزیم خام برای آنالیزهای بعدی جمع آوری میگردد [۱۷].

۲-۵- سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز روی بستر کشت جامد بلغور جو

برای سنجش فعالیت آنزیم از محلول نشاسته استفاده میکنیم (اوکولو و همکاران، ۱۹۹۵) [۱۸]. بدین ترتیب که محلولی حاوی ۱/۲۵ میلی لیتر نشاسته ۱٪ (وزنی حجمی)، ۰/۲۵ میلی لیتر بافر استات ۰/۱ مولار (pH = 6) ، ۰/۲۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲۵ میلی لیتر از محلول استخراجی خام با غلظت مناسب (۳۲۰ – ۱۰ ✕) تهیه کرده و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قندهای احیا (معادل گلوکز) آزاد شده توسط روش DNSA اصلاح شده سنجیده میشود (میلر، ۱۹۵۹) [۱۹]. رنگ آزاد شده در ٥٤٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکترفوتومتر قرائت میشود. گلوکز به عنوان استاندارد مد نظر است. محلول شاهد مورد استفاده متشکل از ۰/۵ میلی لیتر بافر استات (pH = 5)، ۱/۲۵ میلی لیتر محلول ۱٪ نشاسته، و ۰/۲۵ میلی لیتر آب مقطر است. یک واحد از فعالیت آنزیم مقداری از آن است که بتواند ۱ میکرومول قند معادل گلوکز در دقیقه تحت شرایط آزمایشگاهی آزاد کند [۱۸].

۲-٦- طرح آزمایشی

این پژوهش با استفاده از نرم افزار Design Expert 6.0.2 و با روش سطح پاسخ برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده توسط *آسپرژیلوس اوریزه* انجام شد. در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل در سه سطح شامل زمان X1: درصد جو افزوده شده به بستره جامد: X2 و شدت صوت دهی: X3 مورد ارزیابی قرار گرفت جدول ۱ متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آنها را نمایش میدهد. شش تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف میشود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان مینماید.

متغیرهای فرایند شامل دمای صوت دهی (۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه)، شدت دستگاه قراصوت (۳۵، ٦۷/۵ و ۱۰۰٪) با توان کلی W ٤٦۰ دستگاه و استفاده از درصدهای متفاوت سوبسترای بستر کشت جامد (گندم، گندم و جو با نسبت ۵۰:۵۰ و جو) بود (جدول ۲).

جدول ١ نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آنها

متغیرهای مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		+١	٠	-١
زمان (دقیقه)	X1	١٥	١٠	٥
درصد بلغور جو افزوده شده به ترکیب سوبسترای جامد	X2	١٠٠	٥٠	٠
شدت صوت دهی	X3	١٠٠	٦٧/٥	٣٥

جدول ٢ طرح آزمایشی مورد استفاده برای بررسی اثر شدت و زمان صوت دهی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده توسط *آسپرژیلوس اوریزه*

تیمار	زمان (دقیقه)	٪ترکیب سوبسترا	شدت صوتدهی	فعالیت آلفاآمیلاز(میکرومول گلوکز / دقیقه برگرم سوبسترا)	تیمار	زمان (دقیقه)	٪ترکیب سوبسترا	شدت صوتدهی	فعالیت آلفاآمیلاز(واحد/٥گرم سوبسترا)
١	٥	٠	١٠٠	١١٨٧,١٦	١١	١٥	١٠٠	٣٥	١٣٠٩,٤
٢	١٠	٠	٦٧/٥	١١٣٧,٨٦	١٢	١٥	٥٠	٦٧/٥	٩٥١,٧
٣	١٠	٥٠	٣٥	١٣١٩,٦٥	١٣	١٠	٥٠	٦٧/٥	١٠٠٨,٠٨
٤	١٠	١٠٠	٦٧/٥	١١٥٨,٦١	١٤	٥	١٠٠	٣٥	١٣٩٦,٢٨
٥	١٠	٥٠	٦٧/٥	٩٦٩,١	١٥	٥	٥٠	٦٧/٥	١١٣٨,٧٦
٦	١٥	٠	٣٥	١٢٩٩,٦٧	١٦	١٥	٠	١٠٠	٩١٦,٣١٤
٧	١٠	٥٠	٦٧/٥	٩٩٤,٢٨	١٧	٥	٠	٣٥	١٤٠٢,٥٦
٨	١٠	٥٠	٦٧/٥	١٠٦٥,٩٨	١٨	١٥	١٠٠	١٠٠	٩٧٣,٧
٩	١٠	٥٠	١٠٠	١٠٥٩,٧	١٩	١٠	٥٠	٦٧/٥	٩٩٦,٥
١٠	٥	١٠٠	١٠٠	١٠٩٨,٥١	٢٠	١٠	٥٠	٦٧/٥	١٠٠٤,٠٢

٣- بحث و نتایج

پس از تجزیه داده ها جهت تعیین بهترین مدل پیشنهادی از میان پنج مدل موجود Mean، Cubic، Quadratic، 2FI و linear با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ٣-٢)، تجزیه واریانسی، مدلی که مقدار مجموع مربعات آن دارای اختلاف معنی دار بوده و مقدار lack of fit آن معنی دار نشود به عنوان بهترین مدل انتخاب می شود. با توجه به این موضوع و پس از بررسی نتایج به دست آمده و مقایسه میان مدل های رگرسیونی نتایج حاکی از آن بود که مدل Quadratic تنها مدلی بود که Lack of fit برای آن معنی دار نشده بود. در نتیجه مدل Quadratic برای بررسی روند تغییرات پارامترهای اندازه گیری شده در این مطالعه انتخاب شد. نتایج انالیز آماری فعالیت آلفا آمیلاز، بیانگر تاثیر معنی داری (در سطح ٥ درصد) تیمار زمان و شدت صوت دهی بر تولید و فعالیت آلفا آمیلاز است. با توج به ضرایب معادله مشخص شد ، شدت صوت دهی بیشترین اثر را در تولید و فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز دارد.

مدل پیشنهادی حاصل از آنالیز آزمایش های انجام شده توسط نرم افزار در زیر آورده شده است.

Enzyme activity = +1925.20277 +(10.25891 × time) - (3.81086 ×substrate) - (18.28874 ×power) -(0.95349× time^2) + (0.031667 × substrate^2) + (0.11418 × power^2) + (0.081022 × time × substrate) -(0.15837 × time × power) - (2.67015 × substrate × power)

نتایج آنالیز آماری شامل جدول آنالیز واریانس در جدول های ۳ و ٤ آورده شده است.

جدول۳ آنالیز واریانس نتایج حاصل از فعالیت آلفا آمیلاز تولید شده تحت شرایط مختلف

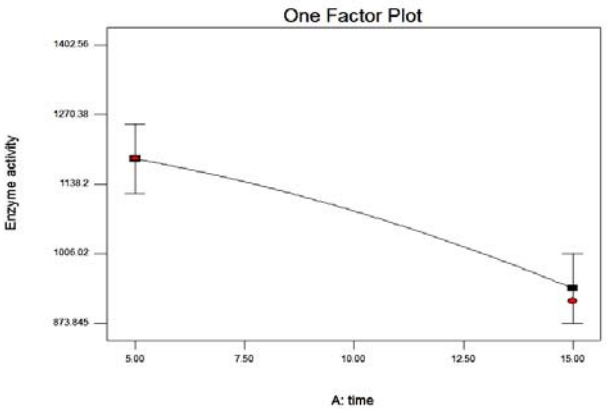
منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمالF	احتمال P
مدل	٤/۳۱۸	۹	٤۷٤۱۰/۱۳	۲۱/۳٦	<۰/۰۰۰۱
A: زمان	٥۹٦۷٥/۰۱	۱	٥۹٦۷٥/۰۱	۲٦/۸۹	۰/۰۰۰٤
B :ترکیب سوبسترا درصد بلغور جو در	٤/۹۹	۱	٤/۹۹	۲/۲۷۹	۰/۹٦۳۱
C:شدت صوت دهی	۲/۲۷۸	۱	۲/۲۷۸	۱۰۰/۳۲	<۰/۰۰۰۱
AB	۳۲۸۲/۲۸	۱	۳۲۸۲/۲۸	۱/٤۸	۰/۲٥۱۹
AC	٥۲۹۸/٥۳	۱	٥۲۹۸/٥۳	۲/۳۹	۰/۱٥۳۳
BC	۱٥۰/٦۲	۱	۱٥۰/٦۲	۰/۰٦۸	۰/۷۹۹۸
A^2	۱٥٦۲/٥۹	۱	۱٥٦۲/٥۹	۰/۷	۰/٤۲۱۰
B^2	۱۷۲۳٦/۱٥	۱	۱۷۲۳٦/۱٥	۷/۷۷	۰/۰۱۹۲
C^2	٤۰۰۰۰/۸۰	۱	٤۰۰۰۰/۸۰	۱۸/۰۲	۰/۰۰۱۷
Residualباقیمانده	۲۲۱۹۳/۳٥	۱۰	۲۲۱۹۳/۳٥		
Lack of Fit	۱٦۹۹۸/۹۳	٥	۳۳۹۹/۷۹	۳/۲۷	^{ns}۰/۱۰۹٦
Pure Error	٥۱۹٤/٤۳	٥	۱۰۳۸/۸۹		
Cor Total	٤/٥٤	۱۹			

جدول ٤ آنالیز آماری نتایج حاصل از فعالیت آلفا آمیلاز تولید شده

انحراف استاندارد	٤۷/۱۱	R-Squared	۰/۹٥۰٦
میانگین	۱۱۱۹/۳۹	Adj R-Squared	۰/۹۰٦۱
C.V. %	٤/۲۱	Pred R-Squared	۰/۸۰۱٥
PRESS	۱/۳۰۱	Adeq Precision	۱٤/۸٤۱

۳-۱- اثیر زمان اولتراسوند بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

بررسی نتایج به دست آمده از اثر زمان صوت دهی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز استخراج شده با نرم افزار design expert 6.0.2 نشان داد با افزایش زمان اولتراسوند فعالیت انزیم آلفا آمیلاز کاهش نشان میدهد به طوری که روند کاهشی فعالیت آنزیم برای بستره کشت ۱۰۰٪ گندم و در بستره کشت جامد با درصدهای مساوی از گندم و جو در بالاترین شدت اولتراسوند بیشترین شیب کاهش را دارا میباشد و در شدت های کمتر این شیب ملایم تر میباشد (شکل ۱).

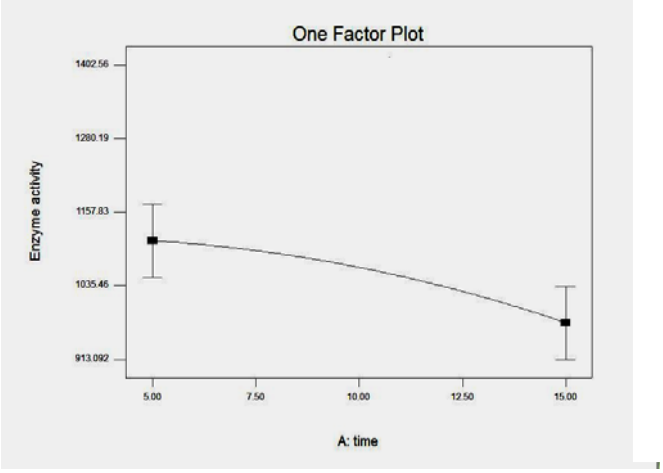


شکل ۱ نمودار تاثیر زمان بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز (میکرومول گلوکز آزاد شده در دقیقه) تولید شده توسط کپک *آسپرژیلوس اوریزه* در بستره کشت جامد با ترکیب سوبسترای ۱۰۰٪ گندم (باید توجه داشت اثرات متقابل در نمودار نیامده است).

بستره کشت جامد کاملا جو دارای کمترین شیب کاهش فعالیت آنزیم الفا آمیلازبود و از این مشاهده میتوان نتیجه گرفت آلفا آمیلازی که در بستره کشت جو تولید میشود دارای مقاومت بیشتری در برابر امواج فراصوت در طول زمان است (شکل ۲).

در یک بررسی توسط بیشی و همکاران (۲۰۱۳) اثرتیمار اولتراسوند بر فعالیت سه آنزیم آلفا آمیلاز، پیسین و پاپایین مورد بررسی قرار گرفت. در طول صوت دهی فعالیت دو آنزیم آلفا آمیلاز و پاپایین مهار شد در حالیکه فعالیت آنزیم پیسین بیشتر گردید. مکانیسم اثر اولتراسوند بر روی آنزیم ها از روی تحقیق بر تغییرات کنفورماسیونی بررسی شد. نتایج حاکی از این بود اولتراسوند با تغییر $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ و تغییر در ساختار دوم آنزیم بخصوص ساختار ورقه ای بتا بر روی فعالیت آنزیم اثر مهار کنندگی دارد. همچنین ساختار سوم پروتئینی آنزیم تحت تاثیر تیمار اولتراسوند تغییر پیدا میکند.

کاهش فعالیت آنزیم در اثر صوت دهی میتواند در اثر تغییر در ساختار دوم و سوم پروتئینی آنزیم اتفاق بیافتد [۲۰].



شکل ۲ نمودار تاثیر زمان بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده توسط کپک *آسپرژیلوس اوریزه* در بستره کشت جامد با ترکیب سوبسترای ۱۰۰٪ جو . مشاهده میشود شیب کاهش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بستره کشت جامد جو به مراتب کمتر از بستره کشت جامد گندم است.

۳-۲- تاثیر درصدهای مختلف گندم و جو در بستره کشت جامد بر روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

بررسی نتایج به دست آمده از اثر درصدهای مختلف گندم و جو به عنوان سوبسترای بستر کشت جامد نشان داد به طور کلی با تغییر بستره کشت از گندم به جو فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز افزایش می یابد و در شدت صوت دهی ۱۰۰٪ و زمان بیشتر این روند کاملا مشهود است و به نظر میرسد فراصوت روی آنزیم آلفا آمیلاز گندم تاثیرگذاری بیشتری نسبت به جو داشته باشد. فعالیت آلفا آمیلازی آنزیم تولید شده در بستره کشت گندم با تغییر شدت صوت دهی تغییر بیشتری نشان میدهد این در حالی است که روند کاهش فعالیت در بستره کشت جو و هم چنین بستره حاوی درصدهای مساوی از گندم و جو با شدت کمتری تغییر میکند.

برخی آنزیم ها در برابر تیمار اولتراسوند مقاومت بیشتری نشان داده و در نتیجه کمتر دستخوش تغییر میگردند. ازبک و اولگن (۲۰۰۰) در یک بررسی نشان دادند برخی آنزیم ها به علت ساختار خاص پروتئینی تحت تیمار فراصوت کمتر از سایرین دستخوش تغییر ساختمانی میگردند. همچنین ویسکوزیته محلول آنزیم و نیروی گرانروی در فرایند مهار فعالیت آنزیم موثر است. تیمار فراصوت سبب افزایش ویسکوزیته محلول آنزیمی گشته و احتمالا به این سبب آنزیم موجود در محلول غیرفعال میگردد. تفاوت ساختار بستره کشت در این پژوهش نقش مهمی در تفاوت مقاومت دو آلفا امیلاز تولید شده در بستره کشت گندم و جو در برابر تیمار فراصوت ایفا میکند. احتمالا اولتراسوند تاثیر متفاوتی بر ویسکوزیته محلولهای تهیه شده ازین بستره های کشت میگذارد و به خاطر همین تفاوت ویسکوزیته سیال آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده در بستره کشت جو مقاومت بیشتری در برابر تیمار اولتراسوند از خود نشان داده است [۲۱]..

۳-۳- تاثیر شدت صوت دهی بر روی فعالیت آنزیم الفا آمیلاز تولید شده توسط کپک *آسپرژیلوس اوریزه*

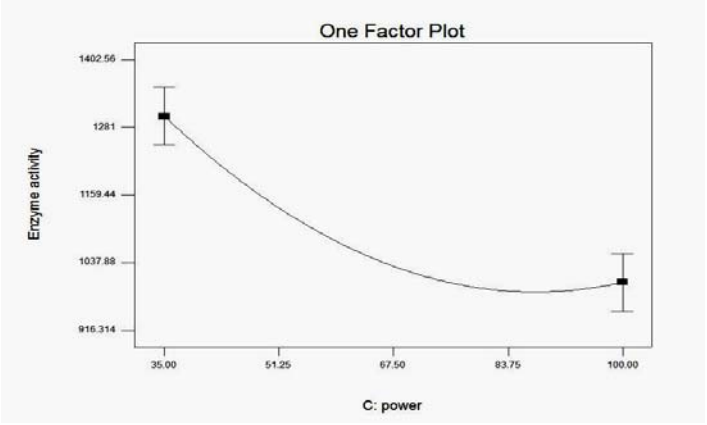
نتایج نشان داد یک رفتار ثابت در تمامی نمونه ها و برای زمانهای مختلف صوت دهی حکم میکند. فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز در شدت صوت دهی ۰٪ (شاهد) و ۳۵٪ بیشینه بوده با افزایش شدت دستگاه تا ٦٧/٥٪ کاهش یافته ولی این کاهش در شدتهای بالاتر صدق نمیکند، بطوریکه یک شیب ثابت بین ۷۵٪ و ۹۲٪ شدت دستگاه مشاهده شده و پس از آن فعالیت آنزیم اندکی افزایش نشان میدهد.

اثر فراصوت بر آنزیم ها اغلب به بسیاری از فرآیندهای مکانیکی و سونوشیمیایی ناشی از حفره نسبت داده میشود. با فروپاشی نامتقارن حباب های کاویتاسیون میکروجت های مایعی تشکیل میشود و تنش برشی و جریانهای کوچک ناشی از حباب های نوسانی حاصله ممکن است به یکپارچگی ساختار پروتئینی آنزیم صدمه زده و همین امر باعث کاهش در فعالیت آنزیم الفا آمیلاز میشود. مکانیسم دیگری که کاهش فعالیت آنزیم را در خلال صوت دهی توضیح میدهد مربوط به تغییر یا صدمه به ساختار مولکولی آنزیم است. رادیکالهای آزاد دارای الکترونهای غیر پیوندی دارای قدرت احیاکنندگی بالایی هستند میتوانند بار الکتریکی سطح پروتئین را تغییر داده و جایگاه فعال آنزیم را تخریب کنند بدین ترتیب تمایل آنزیم برای واکنش با سوبسترا کاهش می یابد [٤]. بر مبنای مکانیسم های گفته شده کاهش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز قارچی میتواند به دلیل وجود رادیکالهای آزاد و تنش برشی باشد. افزایش کم در فعالیت آنزیم در شدت صوت دهی ۱۰۰٪ نسبت به۷۵٪ تا ۹۲٪ میتواند به علت چندین مکانیسم باشد: الف) آزاد شدن آخرین آنزیمهای متصل به بستره در اثر شوک صوتی: میسلیوم های کپک تحت این شدت صوت کاملا تخریب شده و آنزیم تولیدی توسط آنها به طور کامل به محیط آزاد میشود (شکل ۳).

ب) در یک بررسی توسط مازوتی و همکاران فعالیت آنزیم های آلفا آمیلاز و آمیلوگلوکوزیداز تحت تیمار اولتراسوند در دما و pH های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند فراصوت رفتار آنزیم را تغییر میدهد. فعالیت هر دو آنزیم تحت تیمار فراصوت در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتیگراد همواره بیشتر از هنگامی است که آنزیم ها تحت فراصوت قرار نگرفته باشند. رفتار آنزیم آمیلاز تحت تیمار فراصوت بستگی به دما و pH دارد. دما دارای اثر مثبت روی فعالیت آنزیم است در حالیکه اثر pH روی فعالیت آنزیم کاملا منفی است. این مشاهده تا حدودی توسط تئوری مازوتی و همکاران قابل توجیه است. اولتراسوند دارای دو اثر اولیه روی آنزیم ها است. یکی اثر کاویتاسیونی و دیگری اثر گرمایی. آزمایش در دمای محیط انجام شد و اثر گرما در این آزمایش قابل صرف نظر است ولی در اثر تنش برشی حاصل از انفجار حبابها و گرمای تولیدی ، دمای حمام فراصوت به تدریج افزایش میابد و این افزایش گرما توسط سنسورهای دستگاه قابل شناسایی و اندازه گیری نیست. آنچه مهم است این است که گرمایی که در شدت صوت دهی بالاتر و زمان بیشتر تولید میشود یک اثر مثبت روی فعالیت آنزیم گذاشته و افزایش کمی در انتهای نمودار و در شدت های بالای صوت دهی قابل رویت است [۲۲].

ج) سومین مکانیسم که احتمال کمتری نسبت به بقیه دارد به این قرار است، در اثر شوک صوتی وارد شده به ساختار پروتئینی آنزیم ، ساختمان دوم و سوم آنزیم به هم ریخته، جایگاه فعال

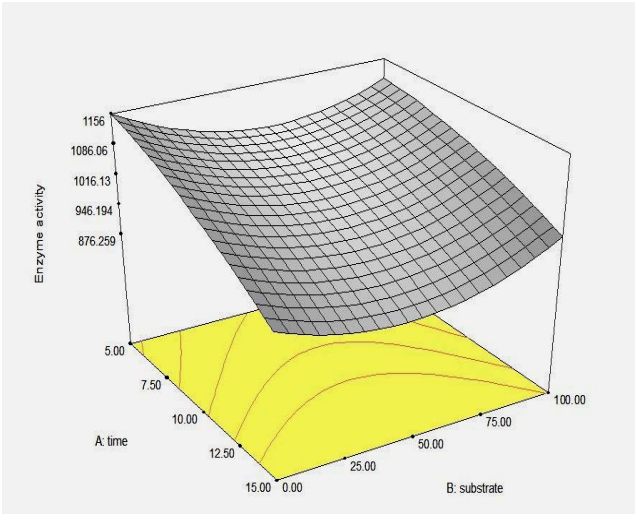
آنزیم تغییر شکل یافته و در نتیجه فعالیت آنزیم در جذب و هیدرولیز سوبسترا کاهش میابد. با ادامه روند صوت دهی امکان بوجود آمدن حفراتی در داخل ساختمان پروتئین وجود دارد. این حفرات مانع از درهم پاشی و نابودی کامل ساختمان آنزیم میگردند به این صورت که قادر هستند تا حدودی ساختمان آنزیم را بازسازی کنند. در اثر شدت صوت بالاتر این حفرات ساختار جایگاه فعال آنزیم را بازسازی کرده و افزایش کمی در فعالیت انزیم در شدتهای بالای صوت دهی مشاهده شده است.



شکل٣ تاثیر شدت اولتراسوند بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در بستره کشت جامد جو در زمان ١٠ دقیقه. این روند در تمامی بستره های کشت و زمانهای مختلف ثابت است.

٣-٤- تاثیر متقابل زمان و ترکیب سوبسترای بستر کشت بر روی فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز

نتایج حاصل از بررسی داده ها نشان داد بستره کشت گندم و بستره کشت جو دارای دو شیب کاهشی جداگانه در طول زمان برای فعالیت آلفا آمیلاز تولید شده هستند. بستره کشت گندم در زمان ٥ دقیقه فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به بستره کشت جامد جو و بستره حاوی مخلوط گندم و جو است اما در طول زمان کاهش بیشتری در فعالیت آمیلازی مشاهده شد به طوری که در انتهای زمان صوت دهی فعالیت آمیلازی آن نسبت به بستره جو و بستره مخلوط کمتر بود. به نظر میرسد بستره کشت جامد جو در مقابل امواج فراصوتی مقاومت بیشتری دارد و فعالیت آنزیم تولید شده با شدت کمتری تغییر می یابد. بستره کشت جامد جو محیط پایدارتری را برای کپک *آسپرژیلوس اوریزه* جهت تولید آنزیم آلفا آمیلاز فراهم میکند (شکل ٤).



شکل٤ نمودار سه بعدی برهمکنش بین زمان اولتراسوند و ترکیب سوبسترا بر روی فعالیت آلفا آمیلاز قارچی. ترکیب سوبسترای ٠ به معنای بستره کشت جامد با ترکیب ١٠٠٪ گندم و سوبسترای ١٠٠ در نمودار به معنای بستره کشت جامد با ترکیب ١٠٠٪ جو میباشد.

٣-٥ تاثیر متقابل شدت صوت دهی و زمان بر فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در طول زمان در شدت اولترا سوند ثابت کاهش یافت. شیب و نسبت کاهش برای شدت های بالاتر بیشتر بوده و در شدت های کمتر با شیب کمتری کاهش یافته است.

٤- نتیجه

بررسی اثر شدت صوت دهی و زمان تیمار فراصوت بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده توسط کپک *آسپرژیلوس اوریزه* در بستره های کشت جامد با درصد ترکیب های متفاوت از گندم و جو توسط نرم افزار Design Expert 6.0.2 نشان داد، صوت دهی آنزیم تولید شده در این بستره ها سبب کاهش فعالیت آنزیم به علت تخریب ساختمان پروتئینی آلفا آمیلاز میگردد. در شدت های بالاتر صوت دهی و زمان های طولانی تر به الطبع روند تخریب آنزیم شدیدتر و بیشتر بوده و فعالیت آنزیم بیشتر کاهش یافته است.

۵- تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به علت کمک های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی پایان نامه با کد ۳/۲۹۹۹۵ تشکر و قدردانی به عمل می آید.

٦- منابع

[1] Mortazavi, S. A., koocheki, A. Industrial Microbiology An Introduction (Translated), Ferdowsi University of Mashhad. 412.

[2] Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Guerra, N.P., Rosés, R.P., (2006).Amylase production by Aspergillus niger in submerged cultivation on two wastes from food industries. J Food Process Eng 73, 93–100.

[3] Jin, B., van Leeuwen, H.J., Patel, B., Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal -amylase by Aspergillus oryzae. Bioresour. Technol. 66, 201-206.

[4] M.yaldagard, *Seyed Ali Mortazavi and Farideh Tabatabaie,(2008). The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's alpha-amylase activity. Korean J. Chem. Eng., 25(3), 517-523* 2.

[5] Dolatowski Z.J., Stadnik J., and Stasiak D.(2008). Applications of Ultrasound in Food Technology, Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 6, 88-99.

[6] Dolatowski Z.J., Stadnik J., and Stasiak D.(2007). Applications of Ultrasound in Food Technology, Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 6, 88-99.

[7] KENNETH S. SUSLICK (1990). Sonochemistry. Science, 247, 1439

[8] S. Barton, C. Bullock, and D. Weir,(1996). The effects of ultrasound on the activities of some glucosidase enzymes of industrial importance," Enzyme Microb. Technol., vol. 18, pp. 190-194,

[9] Apar D.K., Turhan M., Özbek B., (2006). Enzymatic Hydrolysis of Starch by using a Sonifier, Chemical Engineering Communications, Vol. 193, Issue 9, pp. 1117-1126.

[10] Şener N., Apar D.K., Özbek B., (2006). A Modelling Study on Milk Lactose Hydrolysis and Beta-Galactosidase Stability Under Sonication, Process Biochemistry, Vol. 41, Issue 7, pp. 1493-1500.

[11] M. Fernandes, C.Basto, A. Zille, Florentina-D. Munteanu, G.Gübitz, A. Cavaco-Paulo (2006) . SONO ENZYMATIC POLYMERIZATION OF CATECHOL. The 232nd ACS National Meeting, S. Francisco, CA, Sept.10-14,

[12] P. López and J. Burgos, *J. (1995 a)* .Lipoxigenase inactivation by manothermosonication: Effect of sonication physical parameters,Ph,Kcl , sugar, glycerol, and enzyme concentration. Journal of Agricultural and food Chemistry 43 e, 625.

[13] P. López and J. Burgos (1995b). Peroxidase stability and reactivation after heat- treatment and manothermosonication. , *Journal of Food Science* , 60, 451-455.

[14] P. López, A. C. Sánchez, A. Vercet and J. Burgos(1998) Inactivation of tomato pectic enzymes by maonthermosonication. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung*, 204, 146 (1997).

[15] Vercet, J. Burgos, S. Crelier and P. Lopez-Buesa, (2001). Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2, 139

[16] P. Raviyan, Z. Zhang and H. Feng, (2005). Ultrasonication for tomato pectinmethylesterase inactivation: effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. Journal of Food Engineering 70 (2), 189-196.

[17] R. Czerner, R. Millner, E. Roenfeld, A. Schellenberger and P.Schmidt.(1987). Theoretical and experimental studies on the influence of ultrasound on immobilized enzymes. Biotechnol Bioeng. Dec 5;30(8):928-35.

[18] Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, A., Szakacs, G., et al. (2003). Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of a-amylase by Aspergillus oryzae. Biochemical Engineering Journal, 107–115.

[19] B.N. Okolo, L.I. Ezeogu, C.N. Mba, (1995). Production of raw starch digesting amylase by Aspergillus niger grown on native starch sources, J. Sci. Food Agric. 69 109–115.

[20] Gail Lorenz Miller (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. ANALYTICAL CHEMISTRY 426-428.

[21] Bi Shi , Z.Yu , W.Zeng , W.Zhang , X.Liao (2013). Effect of ultrasound on the activity and conformation of a-amylase, papain and pepsin. Ultrasonics Sonochemistry (Short Communication).

[22] Belma Ozbek & Kutlu Ulgen (2000). The stability of enzymes after sonication. Process Biochemistry 35 (2000) 1037–1043.

[23] M. A. Mazutti ,M.Souza, E.Mezadri, E.Zimmerman, E.Leaes, M.Bassaco, V. Dal Prá, E.Foletto, A.Cancellier, L.M. Terra, S. L. Jahn (2013). Evaluation of activity of a commercial amylase under ultrasound-assisted irradiation. Ultrasonics Sonochemistry 20 89–94.

[24] Tan.T.K, Leong. W.F. , (1986) Screening for extracellular enzymes of fungi from manufacturing wastes. MIRCEN Journal, 2, 445-452.

Evalution Effect of ultrasound intensity and timing on the activity of the alpha amylase produced by *Aspergillus oryzae* PTCC 5164 with different combinations of wheat and barley on solid state fermentation system

Bayat, H. [1], Tabatabai Yazdi, F. [2*], Mortazavi, S. A. [3]

1. M Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Associate Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/4/27 Accepted: 93/6/19)

In this study to determine the effect of sonication time and intensity on the activity of the alpha-amylase, *Aspergillus Oryzae* PTCC 5164 as a Producer of enzyme was used in the solid staste fermentation system. A combination of wheat and barley (0:100, 50:50, 100:0) as a substrate, Ultrasound with the intensity treatment (35, 5/67 and 100%) and 5, 10 and 15 minutes were used. Statistical analysis with software Design Expert 6.0.2 showed that the effect of ultrasound on enzyme produced in culture platform is different. Alpha-amylase production with barley as the substrate had more resistant during the sonication. Also by increasing the time and intensity of sonication, negative effects of cavition became more apparent and enzyme activity decreased. Diminishing activity of the alpha-amylase produced, depends on the duration and intensity of sonication and combination of solid culture. Probably the $\pi_0 \rightarrow \pi^*$ amide transitions and secondary structural components, especially b-sheet, of the enzyme was significantly influenced by ultrasound.

Keywords: Ultrasound, Alpha amylase, *Aspergillus oryzae*, Enzyme activity

*Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir