Archive of SID.ir

بهینه سازی تولید لیپاز توسط قارچ *Aspergillus sp.* جداسازی شده از پساب آسیاب زیتون با استفاده از فرایند تخمیر در بستر جامد

خدیجه پورخانعلی، غلام خیاطی*+

گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران

فرهنگ میزانی•

گروه شیمی، دانشگاه پیام نور مرکز قزوین، قزوین، ایران

فرشته رئوف

گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران

چکیده: لیپازها گروهی از هیدرولازها هستند که هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد تسریع می بخشند. این آنزیم‌ها به دلیل پتانسیل بالای استفاده در بسیاری از صنایع، از جمله آنزیم‌های مهم صنعتی به شمار می روند. در این پژوهش قارچ‌های مولد لیپاز از پساب آسیاب زیتون و استخر دفع آن غربال و جداسازی شدند. در تست‌های کیفی، ۷ سویه به‌عنوان قارچ‌های تولید کننده لیپاز شناسایی شدند. یکی از ۷ قارچ جدا شده که فعالیت لیپاز خوبی را نیز نشان داد، بر اساس بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی به عنوان *Aspergillus sp* شناخته شد. به منظور بررسی عوامل موثر بر فرایند تولید آنزیم و دستیابی به شرایط تخمیر و ترکیب محیط کشت بهینه جهت تولید لیپاز، چهار فاکتور در پنج سطح در قالب روش طراحی آزمایشات تاگوچی در نرم افزار Minitab ۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. شرایط بهینه برای فاکتورهای نسبت WS به OF، زمان تخمیر، میزان رطوبت، و غلظت گلوکز به ترتیب ۰٫۵، ۷ روز، ۶۶٪ و ۰ گرم در لیتر به دست آمد. با استفاده از شرایط تخمیر بهینه، حداکثر فعالیت لیپاز در شرایط بهینه و در سطح معنی داری ۵ درصد، ۲۷۵۴/۷۳U/g بدست آمد. نتیجه‌ها نشان داد که قارچ جدا شده از پتانسیل بالا یی برای تولید لیپاز برخوردار است. این مطالعه با هدف شناخت بهتر میکروارگانیسم های موجود در پساب آسیاب زیتون و بهره گیری از آنها به عنوان گزینه‌های بالقوه برای تبدیل محصولات فرعی کشاورزی به متابولیت‌های ثانویه با ارزش مانند لیپاز انجام شد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، فاضلاب آسیاب زیتون، *Aspergillus sp.*، لیپاز، تخمیر در بستر جامد، بهینه سازی، تاگوچی

KEYWORDS: *Isolation, Olive mill wastewater, Aspergillus sp., Lipase, Solid state fermentation, Optimization, Taguchi*

* عهده‌دار مکاتبات

+E- mail: khayati@guilan.ac.ir, khayatiir@googlemail.com

• نشانی دیگر: گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین، قزوین، ایران

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مقدمه

لیپاز (EC 3.1.1.3) یکی از مهمترین آنزیم‌های خانواده‌ی هیدرولازها است که قادر به تسریع هیدرولیز تری اسیل گلیسرول‌ها به اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول است [۱]. این آنزیم را در منابع گوناگونی از طبیعت از جمله حیوانات، گیاهان، حشرات و میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌توان یافت [۲]. یکی از بهترین منابع لیپاز، قارچ‌ها هستند که ترجیحاً برای کاربردهای بیوتکنولوژی صنعتی از لیپاز تولید شده از این منبع استفاده می‌شود [۳]. خصوصیات منحصر به فرد این آنزیم مانند پایداری pH و گرمایی، حفظ فعالیت در حلال‌های آلی و هزینه کم استخراج باعث شده است که کاربردهای وسیعی در زمینه صنایع غذایی، پزشکی و دارویی، مواد شوینده، کاغذ، مواد آرایشی و بهداشتی، عطرسازی، چرم، شیمی کشاورزی، حسگرهای زیستی، تولید بیودیزل، تصفیه بیولوژیکی و مصارف زیست محیطی داشته باشد [۳،۴،۲].

اگرچه مقادیر زیادی آنزیم میکروبی به وسیله تکنیک تخمیر غوطه‌ور[۱] تولید می‌شود، اما تمایل به استفاده از تخمیر در بستر جامد[۲] برای تولید آنزیم میکروبی نیز در دهه‌های اخیر افزایش یافته است [۷-۵]. تخمیر در بستر جامد یک نوع فرآیند تخمیری است که در آن از مواد جامد نامحلول به عنوان پایه محیط کشت استفاده شده و در غیاب رطوبت آزاد انجام می‌پذیرد [۸]. این فرآیند در برخی از فرآیندهای بیولوژیکی طبیعی مانند کمپوست استفاده می‌شود [۹]. در اکثر فرایندهای تخمیر در بستر جامد از مواد طبیعی به عنوان پایه استفاده می‌شود که خود منبع کربن یا نیتروژن نیز هستند، اما در برخی موارد از مواد بی اثر یا مصنوعی نیز به عنوان پایه استفاده می‌شود که در این صورت محیط کشت نیازمند افزودن منبع کربن و یا نیتروژن جهت رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد [۱۰و ۱۱].

از مواد طبیعی که به عنوان بستر فرایند تخمیر در بستر جامد استفاده شده است می‌توان به ضایعات کشاورزی مانند سبوس برنج، سبوس گندم و کاه، ضایعات پنبه، سبوس جو، چغندر قند و باگاس نیشکر، پوست و ضایعات میوه، لپه ذرت، دانه‌های انگور، برگ‌های زیتون و بسیاری از مواد دیگر اشاره نمود،[۹،۱۲،۱۳، ۸]. استفاده از این بسترهای ارزان و تجدیدپذیر می‌تواند علاوه بر صرفه اقتصادی، مشکلات آلودگی را نیز بهبود بخشد [۵]. روش تخمیر در بستر جامد در مقایسه با روش سنتی تخمیر غوطه‌ور دارای مزایایی است که از جمله آنها می‌توان به استفاده کم از آب اشاره نمود. این عامل آلودگی باکتریایی و مخمری محیط کشت را نیز کاهش می‌دهد. همچنین عدم وجود رطوبت آزاد باعث بهبود هوادهی شده و زمینه را برای متابولیسم هوازی فراهم نموده و شرایط رشد و تکثیر میکروارگانیسم را به شرایط زندگی طبیعی نزدیکتر می‌نماید. از مزایای دیگر روش تخمیر در بستر جامد می‌توان به پخش یکنواخت اسپور در محیط کشت، بهبود پایداری حرارتی محیط کشت قارچ، عدم نیاز به همزنی مکانیکی و بازدهی بیشتر این روش در مقایسه با روش تخمیر غوطه وری تحت شرایط یکسان اشاره نمود. به همین دلایل می‌توان گفت که روش تخمیر در بستر جامد در مقایسه با روش تخمیر غوطه‌وری از نظر مصرف انرژی و هزینه به صرفه تر است [۱۳، ۹].

رشد میکروبی و تولید آنزیم به طور موثری به ترکیبات موجود در محیط کشت و همچنین شرایط محیطی تخمیر وابسته است و به‌همین دلیل، دستیابی به شرایط مطلوب جهت رشد میکروارگانیسم و تولید بهینه آنزیم، ضروری است. روش طراحی آزمایشات[۳] در مقایسه با روش سنتی بررسی یک فاکتور در یک زمان [۴] فقط یک فاکتور در زمان مشخصی متغیر بوده و سایر عوامل در آن زمان مشخص ثابت می‌مانند، از نظر هزینه و زمان بسیار به صرفه تر بوده و با توجه به اینکه روش‌های طراحی آزمایشات تعامل بین متغیرها را نیز تخمن می‌زند می‌تواند اطلاعات بسیار دقیق‌تری در مورد بهینه سازی شرایط آزمایشات در مطالعات آزمایشگاهی ارائه نماید [۱۴]. به همین دلایل، روش‌های طراحی آزمایشات به عنوان نقطه عطفی در مطالعات آزمایشگاهی مطرح می شوند و به‌طور گسترده‌ای در بسیاری از مطالعات جهت طراحی فرآیندها و بهبود عملکرد عملیات پژوهش و توسعه استفاده شده‌اند [۱۵،۱۶]. انواع گوناگونی از روش‌های طراحی آزمایشات وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به روش‌های فاکتوریل کامل و جزیی اشاره نمود. روش تاگوچی یکی از روش‌های طراحی آزمایش فاکتوریل جزئی است که جهت بهینه‌سازی پارامترهای طراحی به کار می رود.

پساب آسیاب زیتون [۵] یک محصول زائد در صنعت روغن زیتون است که بسته به سیستم استخراج روغن زیتون، دارای غلظت‌های گوناگونی از روغن باقیمانده می باشد [۱۷]. این منبع غنی از مواد لیپیدی بوده و طبق گزارشات گذشته از پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان سوبسترا برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم های مولد لیپاز برخوردار است [۲۵-۱۸]. هدف پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی یک

(۱) Submerged fermentation (SmF)
(۲) Solid state fermentation (SSF)
(۳) Design of experiment (DOE)
(۴) One factor at a time (OFAT)
(۵) Olive mill wastewater (OMW)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

میکروارگانیسم قوی تولید کننده لیپاز از OMW و خاک آلوده به OMW و بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز با استفاده از روش طراحی آزمایشات تاگوچی تحت فرایند تخمیر در بستر جامد است.

بخش تجربی

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش عبارتند از: ۴-نیتروفنیل پالمیتات[۱] (شرکت سیگما-آلدریچ آلمان)، صمغ عربی، تریتون X-100 (شرکت سیگما شیمی ایالات متحده آمریکا)، پپتون و عصاره مخمر (شرکت کیولب کانادا) و D (+) گلوکز، مونوهیدرات لاکتوز، ایزوپروپانول و توئین ۸۰ (شرکت مرک آلمان). تمام مواد شیمیایی دیگر از درجه آزمایشگاهی بوده و توسط آزمایشگاه تامین شدند.

تجهیزات مورد استفاده

بررسی‌های میکروسکوپی میکروارگانیسم‌های موجود در نمونه‌های جمع آوری شده توسط میکروسکوپ نوری مدل Bi-220A، سنجش فعالیت لیپازی توسط اسپکتروفوتومتر دو پرتوی مدل Shimadzu UV-1601PC و استخراج محلول آنزیمی توسط سانتریفیوژ مدل Hettich EBA20 انجام شد.

جمع آوری نمونه ها

نمونه‌های پساب آسیاب زیتون و حوضچه دفع آن از شرکت زیتون طلایی شهر لوشان و شرکت زر پرور شهر منجیل واقع در استان گیلان جمع آوری شد. نمونه برداری خاک نیز از عمق ۱۰ سانتی متری سطح زمین اطراف حوضچه‌های دفع انجام گرفت. تمام نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم های تولید کننده لیپاز

۱ گرم از هر نمونه خاک و ۱ میلی لیتر از هر نمونه پساب آسیاب زیتون به ۱۰ میلی لیتر محلول استریل کلرید سدیم (w/v)۰,۸٪ اضافه شد. محلول‌ها به مدت ۹۰ دقیقه و تحت تکانش ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس ۱ میلی لیتر از هر محلول به ۹ میلی لیتر محلول استریل کلرید سدیم (w/v)۰,۹٪ اضافه شده و به همین ترتیب رقیق سازی های سریالی در محدوده 10^{-1} تا 10^{-5} انجام شد. سپس یک قطره از رقت 10^{-3} و 10^{-5} روی ظروف پتری دارای پساب زیتون و آگار ۲٪ (g/g) استریل پخش شد. سپس با کشت متوالی، جداسازی میکروارگانیسم‌ها تا رسیدن به کشت خالص هر میکروارگانیسم انجام شد. کلونی‌های میکروبی جداسازی شده، به ظروف پتری دارای ۵ گرم در لیتر پپتون، ۳ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۵ گرم در لیتر آگار، ۰/۰۱ گرم در لیتر کلرید کلسیم، ۳ گرم در لیتر کلرید سدیم و ۱٪ توئین ۸۰ به عنوان نشانگر حساس منتقل شده و به مدت ۵ روز در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند تا وجود فعالیت لیپازی در آنها نمایان شود [۲۶،۲۷].

محیط کشت در بستر جامد

میوه‌های زیتون از رقم شنگه که از باغ‌های زیتون شهر رودبار جمع شده بود، بذرگیری شده و سپس گوشت زیتون (OF)[۲] به قطعات کوچک (۳-۴ میلی متر) برش داده شد. نی گندم خشک[۳] (WS) جمع آوری شده از مزارع اطراف روستای داماش نیز برش داده شده و الک شد تا ذرات ۸-۱۲ میلی متر بدست آید. در فرایند تخمیر در بستر جامد از نسبت‌های گوناگون مخلوط OF و WS به عنوان بستر خشک استفاده شد.

محلول مغذی مورد استفاده جهت مرطوب کردن بستر خشک شامل بافر فسفات ۰,۱ مولار (pH=۶,۵) دارای پپتون (۲۰ گرم در لیتر)، $NaNO_3$(۲,۵ گرم در لیتر)، $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ (۰,۵ گرم در لیتر)، $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ (۰,۰۱ گرم در لیتر)، $(NH_4)\ 2HPO4$ (۰,۴ گرم در لیتر)، KH_2PO_4 (۰,۴گرم در لیتر) و KCl (۰,۵گرم در لیتر) بود [۲۸-۳۲].

فرآیند تخمیر

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، ۵ گرم از بستر جامد (نسبتهای گوناگونی از WS و OF) توسط حجم‌های گوناگونی از محلول مواد مغذی مرطوب شد. فلاسک‌های ارلن مایر در شرایط استاندارد اتوکلاو شدند و پس از رسیدن به دمای اتاق، تحت شرایط آسپتیک با ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون تلقیح تلقیح شدند و بدون هیچ گونه تکانش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سوسپانسیون تلقیح با افزودن محلول نمکی مواد مغذی به ظروف پتری عصاره مخمر دارای میکروارگانیسم فعال ۵ روزه فعال (آل ۲۰۲۰) تهیه شد و در همه آزمایشات یکسان بود. پس از گذشت زمان مشخصی از انکوباسیون، با افزودن ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۶,۵) به هر فلاسک و تکانش آنها در دمای اتاق با ۱۵۰ دور در دقیقه

(۱) p-nitrophenyl palmitate (pNPP)
(۲) Olive Flesh
(۳) Wheat straw

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۱- فاکتورهای انتخاب شده از ترکیبات موجود در محیط کشت و شرایط محیطی تخمیر در سطوح گوناگون

فاکتور	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴	سطح ۵
نسبت WS به OF (w/w)	۴:۰	۳:۱	۲:۲	۱:۳	۰:۴
زمان تخمیر (روز)	۳	۴	۵	۶	۷
میزان رطوبت (سوبسترای خشک : رطوبت (v/w))	۱:۱ (٪۵۰)	۱,۵:۱ (٪۶۰)	۲:۱ (٪۶۶)	۲,۵:۱ (٪۷۱)	۳:۱ (٪۷۵)
غلظت گلوکز (g/l)	۰	۲,۵	۵	۷,۵	۱۰

جدول ۲ - آرایه متعامد L25 تاگوچی برای آزمایشات طراحی شده

شماره آزمایشات	نسبت WS به OF (w/w)	میزان رطوبت (v/w)	زمان تخمیر (روز)	غلظت گلوکز (g/l)	فعالیت لیپاز Aspergillus sp(U/g)
۱	۰	۱:۱	۳	۰	۱۷۴,۸۴
۲	۰	۱,۵:۱	۴	۲,۵	۳۰۲,۴۲
۳	۰	۲:۱	۵	۵	۷۳۲,۹۵
۴	۰	۲,۵:۱	۶	۷,۵	۷۶۷,۱۶
۵	۰	۳:۱	۷	۱۰	۴۶۳,۷۹
۶	۰,۲۵	۱:۱	۴	۵	۴۸۰,۳۲
۷	۰,۲۵	۱,۵:۱	۵	۷,۵	۹۲۶,۴۷
۸	۰,۲۵	۲:۱	۶	۱۰	۱۱۴۲,۹۵
۹	۰,۲۵	۲,۵:۱	۷	۰	۱۴۴۷,۶۳
۱۰	۰,۲۵	۳:۱	۳	۲,۵	۷۲۳,۴۷
۱۱	۰,۵	۱:۱	۵	۱۰	۱۰۲۶,۴۲
۱۲	۰,۵	۱,۵:۱	۶	۰	۲۴۴۷,۸۹
۱۳	۰,۵	۲:۱	۷	۲,۵	۲۶۴۴,۰۰
۱۴	۰,۵	۲,۵:۱	۳	۵	۲۰۱۸,۲۱
۱۵	۰,۵	۳:۱	۴	۷,۵	۲۰۲۵,۵۸
۱۶	۰,۷۵	۱:۱	۶	۲,۵	۱۷۸۸,۲۱
۱۷	۰,۷۵	۱,۵:۱	۷	۵	۲۱۸۶,۶۳
۱۸	۰,۷۵	۲:۱	۳	۷,۵	۱۸۴۷,۰۰
۱۹	۰,۷۵	۲,۵:۱	۴	۱۰	۱۷۴۷,۱۶
۲۰	۰,۷۵	۳:۱	۵	.	۲۱۵۱,۸۹
۲۱	۱	۱:۱	۷	۷,۵	۱۴۷۸,۷۴
۲۲	۱	۱,۵:۱	۳	۱۰	۱۰۵۰,۸۴
۲۳	۱	۲:۱	۴	۰	۱۲۶۸,۵۳
۲۴	۱	۲,۵:۱	۵	۲,۵	۱۳۶۸,۲۱
۲۵	۱	۳:۱	۶	۵	۱۴۶۸,۷۴

و به مدت ۹۰ دقیقه محلول آنزیمی استخراج شد. محلول آنزیمی به دست آمده پس از عبور دادن از کاغذ صافی با ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ناخالصی‌ها حذف گردد. ماده مایع رویی حاصل از سانتریفوژ (محلول آنزیمی) تحت آزمایش سنجش کمی لیپاز قرار گرفت.

بهینه سازی تخمیر در بستر جامد و تجزیه و تحلیل آماری

رشد میکروبی و تولید آنزیم به طور موثری به ترکیبات موجود در محیط کشت و همچنین شرایط محیطی تخمیر وابسته است [۴و۱۱]. در این مطالعه از روش تاگوچی برای رسیدن به شرایط بهینه محیطی تخمیر و همچنین ترکیبات موجود در محیط کشت، به منظور تولید بهینه لیپاز استفاده شد. در جدول ۱ تأثیر چهار فاکتور نسبت WS به OF،

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

میزان رطوبت[1]، زمان تخمیر و گلوکز اضافه شده به سوبسترا را در پنج سطح بر تولید لیپاز نشان داده شده است. جدول ۲ نیز آرایه متعامد L25 پیشنهاد شده توسط روش تاگوچی را برای چهار فاکتور در نظر گرفته شده در پنج سطح نشان می‌دهد.

قابل ذکر است که در این مطالعه به منظور طراحی آزمایشات به روش تاگوچی و همچنین آنالیز داده های به دست آمده از آزمایشات از نرم افزار مینی تب ۱۹ استفاده شد. روش تاگوچی کیفیت را بر اساس انحراف از مقدار مطلوب بیان کرده و روشهایی را برای آنالیز داده‌ها پیشنهاد می‌دهد. در این مطالعه از تحلیل واریانس آماری[2] به منظور تجزیه و تحلیل داده ها، ارزیابی تأثیر نسبی پارامتر فرآیند و همچنین بررسی اهمیت تأثیر هر پارامتر بر عملکرد فرآیند استفاده شد. از پارامتر p-value برای بررسی درجه اهمیت آماری یا سطح معناداری هر متغیر و همچنین قدرت تعامل بین متغیرهای مستقل استفاده می‌شود. مقدار p-value هر چه کمتر باشد نشان‌دهنده دقت بالاتر و میزان خطای پایین‌تر است. معمولا مقادیر ۰،۰۵ و پایین‌تر از آن برای p-value به عنوان معیار برای سطح معناداری پارامترها در نظر گرفته می شود. در این مطالعه p-value کوچکتر از ۰،۰۵ به عنوان معیار برای سطح معناداری پارامترها در نظر گرفته شد [۱۶].

آزمون اعتبار سنجی

برای تأیید نتیجه به دست آمده از مرحله تجزیه و تحلیل آماری و بهینه سازی، آزمایش تخمیر در بستر جامد نهایی به منظور تولید بهینه آنزیم لیپاز، با استفاده از ترکیبی از سطوح بهینه چهار فاکتور ذکر شده و با سه بار تکرار انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم

به منظور سنجش فعالیت آنزیم لیپاز از ۴- نیتروفنیل پالمیتات به عنوان سوبسترا در pH بهینه ۸ و دمای بهینه ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد. ارزیابی pH بهینه از طریق انکوباسیون مخلوط واکنش در حضور بافرهای Tris-HCl ۰،۱ مولار (pH=۷،۲-۹) به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵ درجه سلسیوس انجام شد. درجه حرارت بهینه برای فعالیت آنزیم لیپاز نیز از طریق انکوباسیون مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در حضور بافر Tris-HCl ۰،۱ مولار (pH=۸) در دماهای گوناگون از ۳۰ درجه سلسیوس تا ۴۵ درجه سلسیوس تعیین شد. محلول A از انحلال ۵ میلی مولار ۴-نیتروفنیل پالمیتات در ۲-پروپانول به دست آمد. محلول B شامل بافر Tris-HCl (pH=۸) محتوی ۰،۴٪ تریتون X-100، ۰،۱٪ صمغ عربی و ۵۰ میلی مولار نمک طعام بود. امولسیون سنجش نهایی از افزودن قطره ای یک حجم محلول A به نه حجم محلول B تحت هم زدن شدید تهیه شد. مخلوط واکنش دارای ۲۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم استخراج شده و ۳،۵ میلی لیتر امولسیون بود. این مخلوط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شده و سپس پارانیتروفنول آزاد شده و تشکیل رنگ زرد با افزایش جذب در ۴۱۰ نانومتر پایش شد. محلول شاهد نیز از همان ترکیب امولسیون و ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای محلول آنزیم تهیه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی (U/ml) نیز عبارت است از مقدار آنزیمی که یک میکرومول ۴- نیتروفنول را در هر دقیقه و در شرایط آزمایش تولید کند [۶،۳۳،۳۴].

نتیجه‌ها و بحث

جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم های تولید کننده لیپاز

۲۳ سویه میکروارگانیسم از نمونه‌های پساب و خاک استخرهای دفع پساب آسیاب زیتون جداسازی و خالص سازی گردید. به منظور سنجش کیفی تولید لیپاز، هر یک از سویه های خالص سازی شده بر روی پلیت‌های دارای پپتون، عصاره مخمر و توئین ۸۰ در حضور کلرید کلسیم به عنوان نشانگر حساس به حضور لیپاز در محیط، تلقیح شد و در میان آنها، ۷ سویه رسوبات سفید رنگ مورد نظر را در اطراف کلنی‌ها ایجاد کردند که نشان دهنده وجود لیپاز در سطح محیط کشت بود.

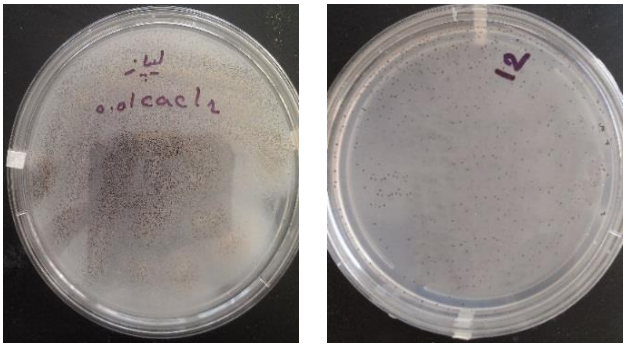
ترکیبات گوناگونی به عنوان نشانگر برای تشخیص وجود فعالیت لیپاز وجود دارد. به عنوان مثال، تشکیل هاله سفید رنگ حاصل از رسوب بلورهای کلسیم تشکیل شده از واکنش اسیدهای چرب آزاد شده توسط لیپاز با یون های کلسیم، در اطراف کلنی‌ها بر روی پلیت‌های آگار محتوی $CaCl_2.5H_2O$ نشان دهنده وجود لیپاز و فعالیت لیپولیتیک است [۳۵-۳۷،۱۸،۲۲]. گسترش یک هاله شفاف در اطراف کلنی قارچ رشد یافته در پلیت‌های آگار دارای تریبوتیرین نیز نشانه فعالیت لیپولیتیک است [۳۸،۱۸،۴]. یکی از ۷ سویه خالص سازی شده که حضور لیپاز در محیط کشت آنها به وسیله آزمایش کیفی تایید شد، فعالیت لیپولیتیک بالاتری داشت و بنابراین، به‌عنوان میکروارگانیسم تولید کننده لیپاز بررسی ریخت شناسی و شناسایی بیشتری بر روی آن انجام شد (شکل ۱).

(۱) Moisture content (MC)

(۲) Statistical analysis of variance (ANOVA)

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



نمونه تلقیح شده بر روی پلیت دارای توئین ۸۰ و کلرید کلسیم

نمونه شاهد

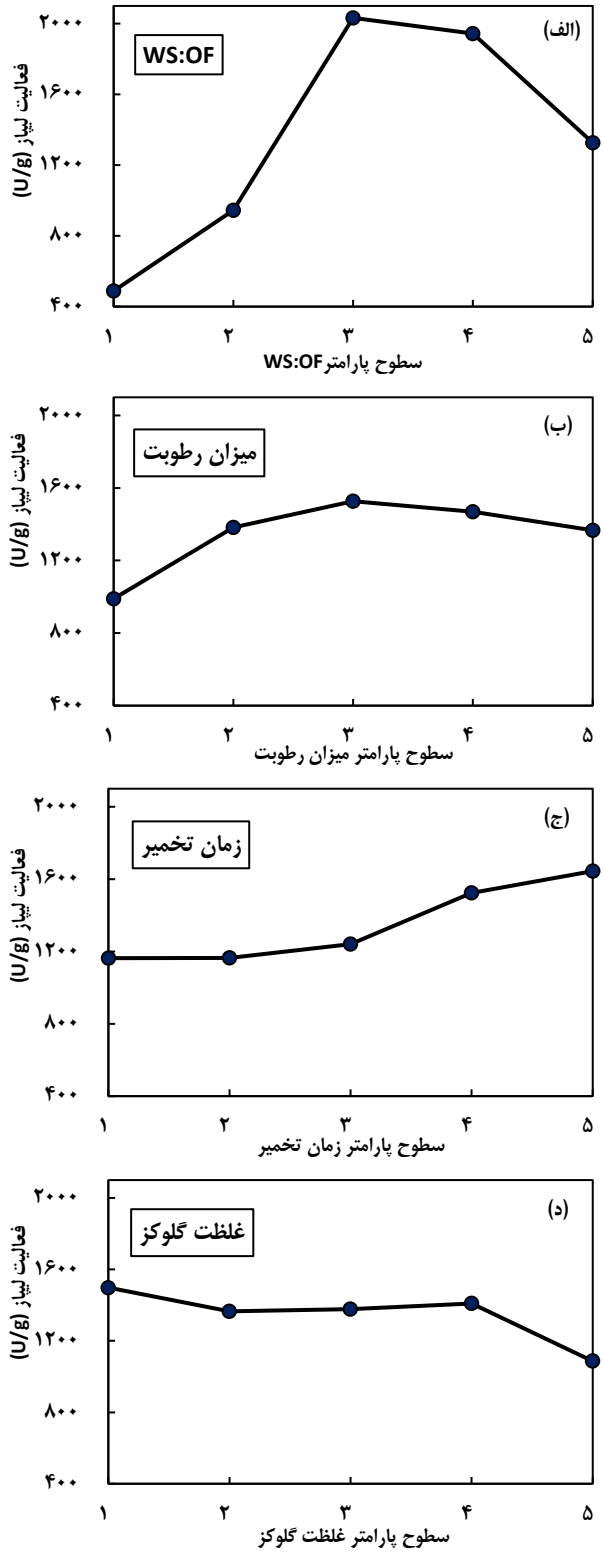
شکل ۱- تغییر رنگ ناشی از وجود لیپاز تولید شده از سویه انتخاب شده

شناسایی سویه

بر اساس نتیجه‌های بدست آمده از بررسی ماکروسکوپی (قطر کلونی، شکل، هیف و رنگ کلونی تشکیل شده در رو و پشت پلیت دارای محیط کشت) و بررسی میکروسکوپی (شکل ساختارهای تولید کننده اسپور) قارچ جدا شده به عنوان جنس آسپرژیلوس[1] شناسایی شد [۴۲-۳۹]. آسپرژیلوس یک جنس بزرگ از قارچ‌های رشته‌ای است که طی سده‌های گذشته در صنایع گوناگون مورد استفاده قرار گرفته و از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین قارچ‌ها است. برخی از گونه‌های این جنس به دلیل رشد سریع بر روی حامل‌های جامد و تولید مقادیر زیادی از آنزیم لیپاز خارج سلولی، از نظر صنعتی تولیدکننده‌های برگزیده و پر کاربرد لیپاز به شمار می روند [۴۳،۴۴،۳۲].

اثرات متغیرهای مستقل بر تولید لیپاز

تولید آنزیم تحت تأثیر شرایط شیمیایی و فیزیکی محیط کشت قرار دارد. ترکیبات موجود در محیط کشت و همچنین شرایط محیطی تخمیر می‌توانند بر روی افزایش تولید آنزیم بسیار موثر باشند. در این مطالعه از روش تاگوچی برای رسیدن به شرایط بهینه محیطی تخمیر و همچنین ترکیبات موجود در محیط کشت، به منظور تولید بهینه لیپاز استفاده شد. همانطور که در بخش آزمایش ذکر شد، اثرات چهار فاکتور نسبت WS به OF، میزان رطوبت (MC)، زمان تخمیر و گلوکز اضافه شده به سوبسترا را در پنج سطح از طریق یک طرح آزمایشی براساس روش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت و سپس نتیجه‌های مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تأثیرات نسبی پنج سطح از چهار فاکتور در تولید آنزیم لیپاز در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۲ - نمودار اثرات اصلی فاکتورهای مورد بررسی در روش تاگوچی بر روی تولید لیپاز

(۱) Aspergillus genus

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

انتخاب یک بستر مناسب برای تولید موثر و مقرون به صرفه آنزیم در تخمیر در بستر جامد، بسیار مهم است. به این منظور در این پژوهش، تأثیر نسبت‌های گوناگون کاه گندم به نسبت گوشت زیتون (w/w) به عنوان بستر جامد بر تولید آنزیم لیپاز بررسی شد. طبق شکل ۲ الف، مطالعه نسبت WS به OF بر روی تولید لیپاز نشان داد که نسبت WS به OF بهینه جهت تولید لیپاز در این مطالعه ۰,۵ است. در انتخاب بستر مناسب جهت انجام تخمیر در بستر جامد، توجه به فاکتورهای منبع کربن، نیتروژن و القا کننده[1] می‌تواند تاثیرگذار باشد [۲۹]. نی گندم یکی از عمده‌ترین سوبستراهای خام تجدیدپذیر است که توسط محققان در پژوهش‌های گوناگون تخمیر مورد استفاده قرار گرفته است [۴۹-۴۵]. این سوبسترا سرشار از مواد معدنی (فسفر و کلسیم)، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و ترکیبات فعال زیستی است [۵۱،۵۰]. همچنین، نی گندم به دلیل امکان گردش هوای مناسب در آن، نفوذ موثر مایسلیوم‌های قارچ در آن و صرفه اقتصادی، در تولید بسیاری از متابولیتهای ثانویه استفاده می‌شود [۵۲]. در این پژوهش نی گندم همراه با گوشت زیتون مورد استفاده قرار گرفت. گوشت زیتون دارای روغن زیتون است که یکی از بهترین القا کننده‌های تولید لیپاز به شمار می‌رود [۵۳]. پپتون نیز منبع اصلی نیتروژن در این مطالعه است. همان‌طور که در شکل ۲ الف نشان داده شده است، محتوای روغن موجود در گوشت زیتون (OF) در بستر جامد می‌تواند تولید لیپاز را افزایش دهد اما نسبت مطلوب OF برای تولید لیپاز ۰,۵ است.. نسبت محتوای OF فراتر از ۰,۵ در بستر جامد منجر به کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. این پدیده ممکن است به دلیل تجمع ذرات بستر ایجاد شده باشد که منجر به محدودیت در هوادهی و کاهش نفوذ میسلیوم قارچ می‌شود و سرانجام تولید متابولیت‌های میکروبی ثانویه را کاهش می‌دهد [۵۴،۵۵]. قطعات گوشت زیتون رطوبت بالایی دارد و همانطور که گفته شد، آنها در این مطالعه از ذرات کاه گندم کوچکتر هستند. طبق گزارش مطالعات قبلی، اندازه ذرات کوچکتر و سطح رطوبت بالاتر منجر به تجمع ذرات می‌شود [۵۶،۵۷].

برای بررسی تأثیر میزان رطوبت اولیه بستر (MC) بر تولید لیپاز، تخمیر در بستر جامد در نسبت‌های گوناگون نسبت بستر خشک به محتوای رطوبت (w/v) انجام شد. میزان رطوبت اولیه یک عامل کلیدی در تخمیر در بستر جامد بوده و بر رشد میکروبی و تولید آنزیم موثر می‌باشد. شکل ۲ ب نشان داد که افزایش میزان رطوبت باعث بهبود تولید لیپاز می‌شود. میزان رطوبت پایین رشد میکروارگانیسم‌ها را کند کرده و تولید و نیز پایداری آنزیم را کاهش می‌دهد. در این مطالعه، تولید لیپاز با افزایش میزان رطوبت تا ۶۶٪ افزایش یافت. در تخمیر در بستر جامد، میزان رطوبت باید در یک حد مطلوب حفظ شود. میزان رطوبت بالاتر یا پایین‌تر از میزان رطوبت مطلوب می‌تواند بر رشد میکروارگانیسم و تولید آنزیم تأثیر منفی بگذارد. در گزارشات گوناگون گذشته میزان رطوبت مطلوب با توجه به نوع بستر خشک متفاوت بوده و برای قارچهای گوناگون در تخمیر در بستر جامد در محدوده ۶۰ تا ۸۵٪ قرار دارد که با یافته‌های این مطالعه نیز موافق است [۵۸،۵۹].

زمان تخمیر نیز فاکتور مهمی بوده و می‌تواند تأثیر زیادی بر تولید لیپاز داشته باشد. تأثیر این عامل بر تولید لیپاز در این مطالعه در شکل ۲ج نشان داده شده است. بر طبق شکل ۲ج، زمان بهینه تخمیر برای تولید لیپاز توسط آسپرژیلوس در بازه زمانی مشخص شده، ۷ روز است. گزارشات علمی قبل هم وجود دارد که اثر زمان تخمیر بر تولید لیپاز توسط آسپرژیلوس را بررسی کرده‌اند که از جمله آنها می‌توان به حداکثر تولید لیپاز در ۷ روز در بستر کاغذ [۶۰]، ۶ روز در ضایعات کشاورزی [۲۹] و ۷ روز در پسماند پالپ نارگیل [۴۴]. اشاره نمود. همچنین گزارشی وجود دارد که در آن حداکثر تولید لیپاز در ۵ روز به دست آمد و تا ۱۲ روز حفظ شد [۶۱]. فراتر از این محدوده‌های زمانی، فعالیت لیپازی با کاهش مواجه می‌شود که این پدیده می‌تواند در اثر کاهش مواد مغذی یا اثر متقابل سایر مواد موجود در محیط کشت [۳۱] یا دناتوراسیون لیپاز توسط پروتئاز تولید شده احتمالی در محیط کشت ایجاد شود [۶۲].

انتخاب کو – سوبسترا[2] نیز می تواند بر رشد میکروبی و تولید آنزیم تأثیرگذار باشد. کو – سوبستراها موادی هستند که جزء ترکیبات ضروری برای رسیدن به محصول مورد نظر به شمار می‌روند، اما سوبسترای اصلی به منظور انجام فرایند نیستند. در مطالعه حاضر، گلوکز به عنوان یک منبع کربنی در دسترس به این منظور انتخاب شد. لازم به ذکر است که وجود برخی از مولکول ها مانند گلیسرول و گلوکز در محیط کشت ممکن است اثرات سرکوب کننده ای بر سنتز متابولیت‌های ثانویه توسط قارچها داشته باشد. اثر سرکوب‌گرانه این مواد در تخمیر غوطه‌ور بیش از تخمیر در بستر جامد [۶۳] مشهود است. اثر سرکوب‌گرانه گلوکز بر تولید متابولیت‌های ثانویه توسط قارچ آسپرژیلوس در چندین گزارش علمی گذشته نشان داده شده است [۶۳-۶۵]. به همین دلیل، از غلظت کم گلوکز در این مطالعه استفاده شد. در مطالعه حاضر، همانطور که در شکل ۲د نشان داده شده است، اگرچه تغییرات نتیجه‌ها قابل توجه نبودند، اما اثر سرکوب‌گرانه کمی

(۱) Inducer

(۲) Co-substrate

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

حاصل از اضافه کردن گلوکز به محیط کشت بر سنتز لیپاز توسط آسپرژیلوس مشاهده شد. همچنین موثرترین غلظت گلوکز در افزایش سنتز لیپاز ۰ گرم به دست آمد.

در مورد اثر متقابل نسبت WS به OF و میزان رطوبت، نتیجه‌ها نشان داد که میانگین بازده تولید لیپاز در نسبت۱:۲ بستر خشک به محتوی رطوبت، بیشتر از سایر سطوح محتوی رطوبت در نسبت‌های گوناگون WS به OF بود (شکل ۳ الف). به همین ترتیب، در مورد اثر متقابل زمان تخمیر و نسبت‌های گوناگون WS به OF، نتیجه‌ها نشان داد که میانگین تولید لیپاز در نسبت ۰,۵ از WS به OF بهتر از سایر نسبت‌ها در سطوح گوناگون زمان تخمیر بود (شکل ۳ ب). در مورد اثر متقابل زمان تخمیر و رطوبت، نتیجه‌ها نشان داد که میانگین بازده تولید لیپاز در نسبت ۱:۲ بستر خشک به محتوی رطوبت، بیشتر از سایر سطوح محتوی رطوبت در زمان‌های گوناگون تخمیر بود (شکل ۳ ج).

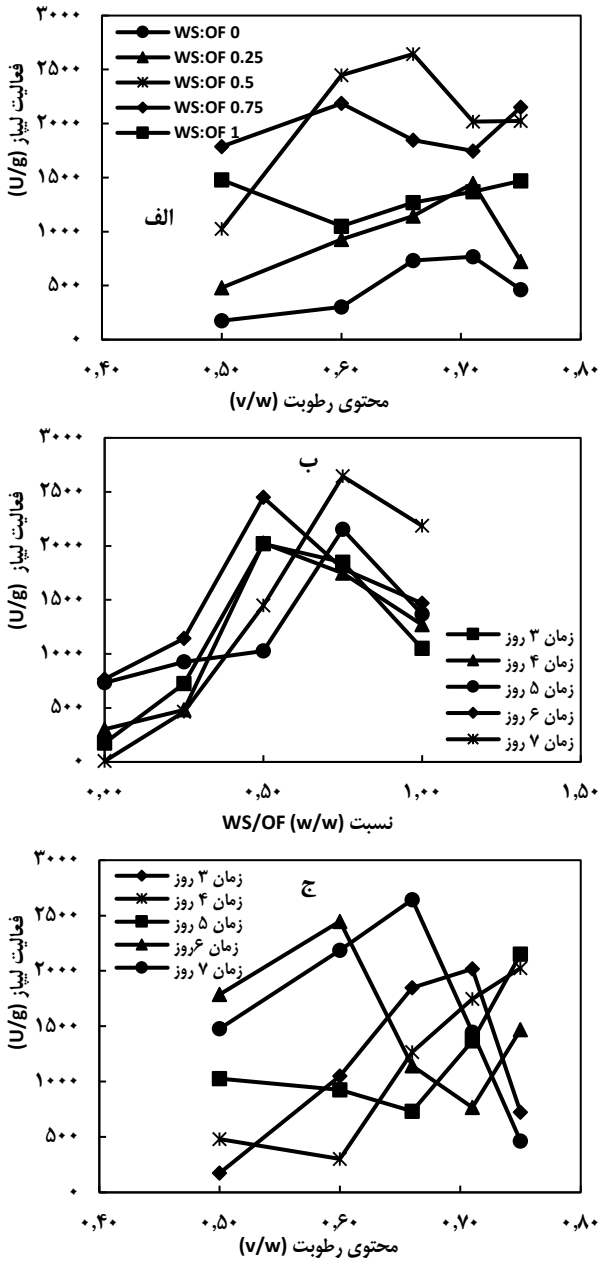
آنالیز طراحی آزمایشات

روش آنووا برای تجزیه و تحلیل نتیجه‌های به دست آمده از طراحی آزمایشات و پیش بینی سطح بهینه پارامترها مورد استفاده قرارگرفت که با انجام آزمایش در آن سطوح بهینه می‌توان به بهترین نتیجه مورد نظر دست پیدا کرد [۳۷].

تجزیه و تحلیل واریانس و مقادیر ضرایب نتیجه‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

به طور کلی، قارچ آسپرژیلوس قادر به رشد در همه شرایط آزمایش تعریف شده بود و همان‌طور که در جدول ۲ ارائه شده است، بیشترین میزان تولید لیپاز توسط این قارچ در شرایط آزمایشی تعریف شده، ۲۶۴۴,۰۰ واحد بر گرم به دست آمد.

از پارامتر p-value برای بررسی درجه اهمیت آماری یا سطح معناداری هر متغیر و همچنین قدرت تعامل بین متغیرهای مستقل استفاده می‌شود. در این مطالعه p-value کوچکتر از ۰,۰۵به عنوان معیار برای سطح معناداری پارامترها در نظر گرفته شد. برای هر پارامتر در فرآیند، اگر p-value کوچکتر از ۰,۰۵ باشد، تغییر پارامتر مورد نظر تأثیر چشمگیری بر عملکرد دارد. همچنین در جدول آنووا ضریب دیگری به نام F-value وجود دارد که برای محاسبه مقدار p-value استفاده می‌شود. مقادیر بزرگ F نشان می‌دهد که تغییرات فاکتور مورد نظر بر روی نتیجه آزمایش قابل توجه و معنادار است. مقدار F بزرگتر از ۱ نشان می‌دهد که تنوع داده‌ها در اطراف میانگین پارامترها کافی است و تأثیرات بدست آمده آنها واقعی است [۶۶-۶۹].



شکل ۳- اثر متقابل متغیرهای مستقل بر یکدیگر، الف: اثر متقابل نسبت WS به OF و میزان رطوبت، ب: اثر متقابل زمان تخمیر و نسبت-های گوناگون WS به OF و ج: اثر متقابل زمان تخمیر و رطوبت

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، نسبت WS به OF، زمان تخمیر و میزان رطوبت تأثیر مهمی بر فعالیت لیپاز دارند. علاوه بر این، مقدار (p>۰,۰۵) p =۰,۰۹۶ برای فاکتور غلظت گلوکز نشان می‌دهد که تأثیر این پارامتر بر تولید لیپاز ناچیز است. طبق جدول ۳، ضریب توزیع[۱] پارامترها نشان می‌دهد که نسبت WS به OF، زمان تخمیر و میزان

(۱) Contribution coefficient

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۳ - آنالیز واریانس آرایه متعامد L25 تاگوچی

	DF	Seq SS	Adj MS	*F*-value	*p*-value	درصد توزیع (٪)
نسبت WS به OF	۴	۸۶۳۲۸۸۸	۲۱۵۸۲۲۲	۵۱,۶۲	۰,۰۰۱	۷۶,۲۶
میزان رطوبت	۴	۸۸۴۰۵۹	۲۲۱۰۱۵	۵,۲۹	۰,۰۲۲	۷,۸۲
زمان تخمیر	۴	۹۸۷۸۵۳	۲۴۶۹۶۳	۵,۹۱	۰,۰۱۶	۸,۷۳
غلظت گلوکز	۴	۴۷۹۷۳۲	۱۱۹۹۳۳	۲,۸۷	۰,۰۹۶	۴,۲۴
خطای باقیمانده	۸	۳۳۴۴۸۶	۴۱۸۱۱			۲,۹۵
جمع کل	۲۴	۱۱۳۱۹۰۱۷				۱۰۰
$F_{0.05,\ (1,23)}$ = ۴,۲۸						

رطوبت به ترتیب موثرترین عوامل در فعالیت لیپاز بودند. همچنین، مقدار F-value =۷۵۵,۳۲ مدل نشان داد که مدل‌سازی انجام شده معنادار است. به طور کلی، اگر F-value محاسبه شده مدل چندین برابر بزرگتر از مقدار جدول شده آن باشد ($F_{0.05(1,23)}$=۱,۲۳)، ارزیابی مدل خوب در نظر گرفته می‌شود [۶۹،۷۰].

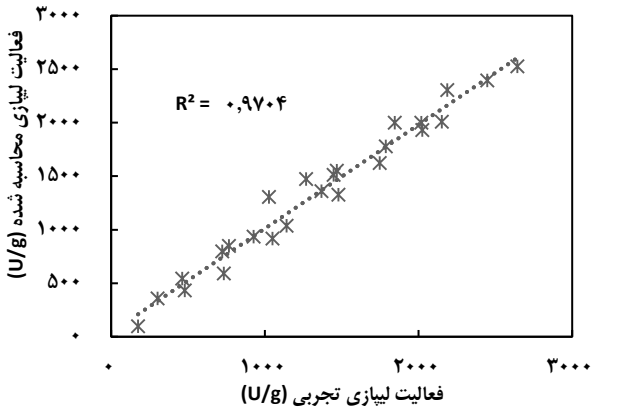
ضریب همبستگی (R^2) نشان دهنده میزان تناسب بین داده‌های محاسبه شده و تجربی است [۷۱، ۱۵]. ضریب همبستگی می‌تواند مقادیر بین ۰ و ۱ داشته باشد، مقادیر نزدیکتر به ۱ نشان دهنده تناسب بهتر داده های تجربی با داده های محاسبه شده مدل می‌باشد. همانطور که در شکل۴ نشان داده شده است، مقدار ضریب همبستگی در این پژوهش ۰,۹۷۰۴ بود. این بدان معنی است که ۹۷,۰۴٪ از تغییرات مشاهده شده برای تولید لیپاز در پاسخ به مقادیر ورودی مدل توضیح داده می‌شود و تنها ۲,۹۶٪ از تغییرات در شرایط کشت با مقادیر ورودی مدل توضیح داده نمی شود [۶۹].

شرایط بهینه و تأیید مدل

آخرین مرحله در فرآیند طراحی آزمایشات، انجام آزمایش در سطوح بهینه جهت تأیید نتیجه بدست آمده از مرحله تجزیه و تحلیل است. همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، فعالیت لیپازی به دست آمده از انجام آزمایش نهایی در سطوح بهینه (U/g) ۲۷۵۴,۷۳ با مقدار پیش بینی شده (U/g) ۲۶۶۰,۲۱ اختلاف زیادی ندارند. نتیجه این آزمایش می تواند گواهی بر اعتبار روش تاگوچی برای این مجموعه آزمایشات باشد. همچنین، نتیجه‌ها نشان داد که قارچ خالص سازی شده آسپرژیلوس در این آزمایشات در مقایسه با سایر گونه های آسپرژیلوس که در گزارشات علمی گذشته جداسازی و خالص سازی شده است، یک گزینه امیدوار کننده برای تولید لیپاز است[۶۱، ۲۹،۳۲،۷۲،۷۳]

جدول ۴ - شرایط بهینه تولید لیپاز، مقادیر پیش بینی شده و تجربی

شرایط بهینه				فعالیت لیپاز (U/g)	
نسبت WS به OF (w/w)	زمان تخمیر (روز)	میزان رطوبت (w/v)	غلظت گلوکز (g/l)	پاسخ پیش‌بینی شده	پاسخ تجربی
۰,۵	۷	۶۶٪	۰	۲۶۶۰,۲۱	۲۷۵۴,۷۳



شکل ۴- ارتباط بین داده های تجربی و محاسبه شده فعالیت لیپاز

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر پتانسیل گونه ای از قارچ آسپرژیلوس جدا شده از پساب آسیاب زیتون، جهت تولید آنزیم لیپاز از طریق فرایند ارزان و در دسترس تخمیر در بستر جامد بررسی شد. از روش تاگوچی برای رسیدن به شرایط بهینه محیطی تخمیر و همچنین ترکیبات موجود در محیط کشت، به منظور تولید بهینه لیپاز استفاده شد. شرایط بهینه برای فاکتورهای نسبت محتوای WS / OF، زمان تخمیر، میزان رطوبت، غلظت گلوکز به ترتیب ۰,۵، ۷ روز، ۶۶٪ و ۰ گرم در لیتر به دست آمد که در آزمایش نهایی انجام شده در این سطوح بهینه حداکثر فعالیت لیپاز (U/g) ۲۷۵۴,۷۳ بدست آمد. همچنین ضریب همبستگی به دست آمده نشان داد که تطبیق

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

پذیری خوبی بین داده های پیش بینی شده و تجربی وجود دارد که این امر نیز اعتبار روش تاگوچی را جهت انجام این آزمایش ها تأیید می‌کند. همچنین نتیجه‌ها نشان داد که قارچ خالص سازی شده آسپرژیلوس در این آزمایشات در مقایسه با سایر گونه‌های آسپرژیلوس که در گزارشات علمی گذشته جداسازی و خالص سازی شده است، یک گزینه امیدوار کننده برای تولید لیپاز است. بنابراین، می‌توان از این میکروارگانیسم به عنوان یک گزینه بالقوه برای تبدیل محصولات فرعی کشاورزی به آنزیم لیپاز استفاده کرد. پژوهش‌های آینده می‌تواند نقش سایر شرایط محیط کشت و پارامترهای فرآیند در تولید لیپاز توسط این قارچ را در تخمیر در بستر جامد مورد بررسی قرار دهد. همچنین، می‌توان تولید لیپاز توسط این قارچ را در یک راکتور بیولوژیکی تحت شرایط نهایی بهینه شده بیشتر مورد بررسی قرار داد. علاوه بر آن می توان از این میکروارگانیسم جدا شده از پساب زیتون و رشد یافته در ضایعات کشاورزی و متابولیت‌های ثانویه آن، برای تصفیه بیولوژیک پساب زیتون و پساب‌های مشابه استفاده نمود.

قدردانی

نویسندگان از آقای صالح فارغی جیرنده جهت حمایت‌های همه جانبه ایشان، شرکت بهداشت و ایمنی محیط زیست مروجان سام صنعت به مدیریت آقای رحمان صفری برای تهیه تجهیزات آزمایشگاهی و آقای علی نظری جهت حمایت‌هایشان در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور شهر قزوین تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲

مراجع

[1]. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C., Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases, *Biotechnol. Adv.*, **19:** 627–662 (2001).

[2]. Sarmah N., Revathi D., Sheelu G., Rani K. Y., Sridhar S., Mehtab V., Sumana C., Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases, *Biotechnol. Prog.*, **34:** 5-28 (2018).

[3]. Kumar D. S., Ray S., Fungal Lipase Production by Solid State Fermentation-An Overview, *J. Anal. Bioanal. Tech.*, **6(1):** 230-240 (2014).

[4]. Patel H., Gupte A., Optimization of Different Culture Conditions for Enhanced Laccase Production and Its Purification from *Tricholoma giganteum AGHP*, *Bioresour. Bioprocess.*, **3:** 11 (2016).

[5]. Xin F., Geng A., Utilization of Horticultural Waste for Laccase Production by *Trametes versicolor* under Solid-State Fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **163:** 235–246 (2011).

[6]. Khayati G., Gilani H. G., Kazemi M., The Effect of Olive Cake Types on Lipase Production by Isolated *Rhizopus sp.* and Process Statistical Optimization, *J. BioSci. Biotech.*, **2:** 45-55 (2013).

[7]. Khayati G., Anvari M., Kazemi S., Peanut Pod-an Inexpensive Substrate for β-galactosidase Production by *Bacillus sp.* in Solid-State Fermentation: Process Evaluation and Optimization by Taguchi Design of Experimental (DOE) Methodology, *Minerva* Biotecnol., **26:** 301–307 (2014).

[8]. Nandal P., Ravella S. R., Kuhad R. C., Laccase Production by Coriolopsis Caperata RCK2011: Optimization under Solid State Fermentation by Taguchi DOE Methodology, *Sci. Rep.*, **3:** 1386 (2013).

[9]. Toca-Herrera J. L., Osma J. F., Rodríguez Couto S., Potential of Solid-State Fermentation for Laccase Production, *J. Appl. Microbiol.*, **1:** 391-400 (2007).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[10]. A´ lvarez-Cervantes J., Sa´nchez C., D´ıaz R., D´ıaz-God´ınez G., Characterization of Production of Laccases, Cellulases and Xylanases of *Pleurotus ostreaus* Grown on Solid-State Fermentation Using an Inert Support, *Rev. Mex. Ing. Quim.*, **15(2):** 323-331 (2016).

[11]. Akpinar M., Ozturk Urek R., Induction of Fungal Laccase Production under Solid State Bioprocessing of New Agroindustrial Waste and Its Application on Dye Decolorization, *3 Biotech.*, **7:** 98 (2017).

[12]. Khayati G., Kiani F. A., Statistical Approach for Optimization of Lipase Production by Using Rice Straw: Analysis of Different Inducers and Nitrogen Sources Effect, *Minerva Biotech.*, **24:** 83–89 (2012).

[13]. Aydınog˘lu T., Sargın S., Production of Laccase from *Trametes versicolor* by Solid-State Fermentation Using Olive Leaves as a Phenolic Substrate, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **36:** 215-222 (2013).

[14]. Czitrom V., One-Factor-at-a-Time versus Designed Experiments, *Am. Stat.*, **53(2):** 126-131 (1999).

[15]. Anvari M., Khayati G., Separation and Purification of Rebaudioside A from Extract of *Stevia Rebaudiana* Leaves by Macroporous Adsorption Resins, *Pol. J. Chem. Technol.*, **18(1):** 127-l32 (2016).

[16]. Khayati G., Barati M., Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil: Optimization Strategy Using Taguchi Design of Experimental (DOE) Methodology, *Environ. Process.*, **4:** 451-461 (2017).

[17]. Bouknana D., Hammouti B., Salghi R., Jodeh S., Zarrouk A., Warad I., Aouniti A., Sbaa M., Physicochemical Characterization of Olive Oil Mill Wastewaters in the Eastern Region of Morocco, *J. Mater. Environ. Sci.*, **5(4):** 1039-1058 (2014).

[18]. Rihani A., Tichati L., Soumati B., Isolation and Identification of Lipase-Producing Fungi from Local Olive Oil Manufacture in East of Algeria, *Chem. Chem. Eng. Biotechnol. Food Ind.*, **19(1):** 13–22 (2018).

[19]. Brozzoli V., Crognale S., Sampedro I., Federici F., D'Annibale A., Petruccioli M., Assessment of Olive-Mill Wastewater as a Growth Medium for Lipase Production by *Candida cylindracea* in Benchtop Reactor, *Bioresour. Technol.*, **100:** 3395–3402 (2009).

[20]. Ertu˘grul S., D¨onmeza G., Takac S., Isolation of Lipase Producing *Bacillus* sp. from Olive Mill Wastewater and Improving its Enzyme Activity, *J. Hazard. Mater.*, **149:** 720–724 (2007).

[21]. Salgado V., Fonseca C., da Silva T. L., Carlos J., Roseiro A., Isolation and Identification of *Magnusiomyces capitatus* as a Lipase-roducing Yeast from Olive Mill Wastewater, *Waste Biomass Valorization.*, **11:** 3207–3221 (2020).

[22]. Ahmed P. M., Fernández P. M., de Figueroa L. I. C., Pajot H. F., Exploitation Alternatives of Olive Mill Wastewater: Production of Value-added Compounds Useful for Industry and Agriculture, *Biofuel Res. J.*, **22:** 980-994 (2019).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[23]. D'Annibale A., Sermanni G. G., Federici F., Petruccioli M., Olive-mill Wastewaters: a Promising Substrate for Microbial Lipase Production, *Bioresour. Technol.*, **97:** 1828–1833 (2006).

[24]. Choudhary R., Isolation and Screening of Lipase Producing Bacteria from Oil Mill Effluent, *Indian J. Sci. Res.*, **13(2):** 192-194 (2017).

[25]. Gonçalves C., Alves M., Belo I. Integrated Process for the Production of Lipase and Methane from Olive Mill Wastewaters Conference paper http://hdl.handle.net/1822/16864

[26]. Azhdarpoor A. Mortazavi B., Moussavi Gh. R., Treatment of Oily Wastewaters by Lipase Enzyme Producing Bacteria, *JCMR.* **27(1):** 346-353 (2014).

[27]. Adami Ghamsari F., Hosseini F., khanafari A., Isolation of Lipolytic Bacteria from Environmental Resources for Biodegradation Polysorbates in Industrial Wastewater, *Bimonthly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences.* **22(4):** 685-693 (2015).

[28]. Falony G., Armas J. C., Mendoza J. C. D., Martínez Hernández J. L., Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation, *Food Technol. Biotechnol.*, **44(2):** 235–240 (2006).

[29]. Oliveira F., Salgado J. M., Abrunhosa L., Pe´rez-Rodrı´guez N., Domı´nguez J. M., Vena^ncio A., Belo I., Optimization of Lipase Production by Solid-State Fermentation of Olive Pomace: from Flask to Laboratory-Scale Packed-Bed Bioreactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **40:** 1123–1132 (2017).

[30]. Balaji V., Ebenezer P., Optimization of Extracellular Lipase Production in *Colletotrichum gloeosporioides* by Solid State Fermentation, *Indian J. Sci. Technol.*, **1(7):** 1-8 (2008).

[31]. Toscano L., Montero G., Stoytcheva M., Gochev V., Cervantes L., Campbell H., Zlatev R., Valdez B., Pérez C., Gil-Samaniego M., Lipase Production through Solid State Fermentation Using Agro-industrial Residues as Substrates and Newly Isolated Fungal Strains, *Biotechnol. Biotechnol Equip.*, **27(5):** 4074-4077 (2013).

[32]. Costa TM, Hermann KL, Garcia-Roman M, Valle R. de C. S. C., Tavares L. B. B., Lipase Production by *Aspergillus niger* Grown in Different Agro-industrial Wastes by Solid-State Fermentation, *Braz. J. Chem. Eng.*, **34(2):** 419–427 (2017).

[33]. Ferreira A. N., Ribeiro D. S., Santana R. A., Production of Lipase from *Penicillium Sp.* Using Waste Oils and Nopalea Cochenillifera, *Chem. Eng. Commun.*, **204:** 1167-1173 (2017).

[34]. Boratyński F., Szczepańska E., Grudniewska A., Gniłka R., Olejniczak T., Improving of Hydrolases Biosynthesis by Solid-State Fermentation of *Penicillium camemberti* on Rapeseed Cake, *Sci. Rep.*, **8:** 10157 (2018).

[35]. Alhamdani M. A., Alkabbi H. J. J., Isolation and Identification of Lipase Producing Bacteria from Oil-contaminant Soil, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare.*, **6(20):** (2016).

[36]. Narasimhan V., Valentin Bhimba B., Screening of Extracellular Lipase Releasing Microorganisms Isolated from Sunflower Vegetable Oil Contaminated Soil for Bio-diesel Production, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **8(2):** 427-430 (2015).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[37]. Lanka S., Latha J. N. L., A Short Review on Various Screening Methods to Isolate Potential Lipase Producers: Lipases-the Present and Future Enzymes of Biotech Industry, *Int. J. Biol. Chem.*, **9(5):** 207-219 (2015).

[38]. Golani M., Hajela K., Pandey G. P., Screening, Identification, Characterization and Production of Bacterial Lipase from Oil Spilled Soil, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **5(3):** 745-763 (2016).

[39]. Alsohaili S. A., Bani-Hasan B M., Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan, *Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS).*, **11(3):** 329 – 337 (2018).

[40]. Bandh S. A., Kamili A. N., Ganai B. A., Identification of Some Aspergillus Species Isolated from Dal Lake, Kashmir by Traditional Approach of Morphological Observation and Culture, Afr. J. Microbiol. Res., **6(29):** 5824-5827 (2012).

[41]. Diba K., Kordbacheh P., Mirhendi S. H., Rezaie S., Mahmoudi M., Identification of *Aspergillus Species* Using Morphological Characteristics, *Pak. J. Med. Sci.*, **23(6):** 867-872 (2007).

[42]. Nyongesa B. W., Okoth S., Ayugi V., Identification Key for *Aspergillus Species* Isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya, *Adv. Microbiol.*, **5:** 205-229 (2015).

[43]. Contesini F. J., Calzado F., Madeira J. V., Rubio M. V., Zubieta M. P., Melo R. R., Gonçalves T. A., *Aspergillus Lipases:* Biotechnological and Industrial Application, Reference Series in Phytochemistry, Springer International Publishing Switzerland (2017).

[44]. Suyanto E., Soetarto E. S., Cahyanto M. N., Production and Optimization of Lipase by Aspergillus Niger using Coconut Pulp Waste in Solid State Fermentation, *J. Phys.: Conf. Ser.* 1374 012005 (2019).

[45]. Giovannozzi-Sermanni G., D'Annibale A., Crestini C., Solid State Fermentation of Wheat Straw for Paper Production, In: Roussos S, Lonsane BK, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G (eds) Advances in Solid State Fermentation. Dordrecht: Springer, 529-542 (1997).

[46]. Pourkhanali K., Khayati G., Mizani F., Raouf F., Isolation, Identification and Optimization of Enhanced Production of Laccase from *Galactomyces geotrichum* under Solid-State Fermentation, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 1-10 (2020).

[47]. Gupta A., Jana A. K., Effects of Wheat Straw Solid Contents in Fermentation Media on Utilization of Soluble/Insoluble Nutrient, Fungal Growth and Laccase Production, *3 Biotech.* **8(1):** 35 (2018).

[48]. Masutti D. C., Borgognone A., Setti L., Production of Enzymes from Rice Husks and Wheat Straw in Solid State Fermentation, *Chem. Eng. Trans.*, **27:** 133-138 (2012).

[49]. Shahryari, Z., Fazaelipoor M. H., Setoodeh P., Nair R. B., Taherzadeh M. J., Ghasemi Y., Utilization of Wheat Straw for Fungal Phytase Production, *Int. j. recycle. Org. waste agric.*, **7:** 345–355 (2018).

[50]. Khan T. S., Mubeen U., Wheat Straw: a Pragmatic Overview, *Current Res. J. Biol. Sci.*, **4:** 673–675 (2012).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[51]. Slavin J., Why Whole Grains Are Protective: Biological Mechanisms, *Proc. Nutr. Soc.*, **62(1):** 129-134 (2003).

[52]. Yasin M., Bhutto A. W., Bazmi A. A., Karim S., Efficient Utilization of Rice-Wheat Straw to Produce Value –Added Composite Products, *J. Environ. Chem. Eng.*, **1(2):** 137-143 (2010).

[53]. Sun S. Y., Xu Y., Solid-State Fermentation for 'Whole-Cell Synthetic Lipase' Production from *Rhizopus chinensis* and Identification of the Functional Enzyme, *Process Biochem.*, **43:** 219–224 (2008).

[54]. Manan M. A., Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing, *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.*, **4(1):** 511–532 (2017).

[55]. Bhargav S., Panda B. P., Ali M., Javed S., Solid-State Fermentation: An Overview, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **22(1):** 49–70 (2008).

[56]. Gowthaman M. K., Krishna Ch., Moo –Young M., Fungal Solid State Fermentation- an Overview, *Appl. Mycol. Biotechnol.*, **1:** 305-352 (2001).

[57]. Krishna C., Solid-State Fermentation Systems: An Overview, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **25:** 1–30 (2005).

[58]. Niladevi K. N., Prema P., Immobilization of Laccase from *streptomyces psammoticus* and Its Application in Phenol Removal Using Packed Bed Reactor, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24:** 1215–1222 (2008).

[59]. Patel H., Gupte A., Gupte S., Effect of Different Culture Conditions and Inducers on Production of Laccase by a *Basidiomycete* Fungal Isolated *Pleurotus ostreatus HP-1* under Solid State Fermentation, *Bioresour.*, **4(1):** 268-284 (2009).

[۶۰] محسنیان، سیده سمیه؛ آزادی، مهرناز؛ افشارپور، مریم؛ مظفر، فرهنگ؛ ارزیابی متغیرهای دما، فعالیت آبی، غلظت یون هیدروژن و زمان بر رشد قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، پنی سیلیوم sp. و آلترناریا آلترناتا در کاغذهای تاریخی، *فصلنامه تحقیقات تاریخی و مطالعات آرشیوی گنجینه اسناد*، **۳:** ۱۶۶ تا ۲۰۲ (۱۳۹۷).

[61]. Salgado J. M., Abrunhosa L., Venâncio A., Domínguez J. M., Belo I., Integrated Use of Residues from Olive Mill and Winery for Lipase Production by Solid State Fermentation with *Aspergillus sp.*, *Appl. Biochem. Biotechnol*. **172:**1832–1845 (2014).

[62]. Piegza M., Witkowska D., Stempniewicz R., Enzymatic and Molecular Characteristics of *Geotrichum candidum* Strains as a Starter Culture for Malting, *J. Inst. Brew.*, **120:** 341–346 (2014).

[63]. Ertan F., Balkanb B., Yarkına Z., Determination of the Effects of Initial Glucose on the Production of α-Amylase from *Penicillium sp.* under Solid-State and Submerged Fermentation, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **28(1):** 96–101 (2014).

[64]. Puttananjaiah M. H., Dhale M. A., Glucose Released by Hydrolytic Activity of Amylase Influences the Pigment Synthesis in *Penicillium sp* NIOM-02, *J. Basic Microbiol.*, **52:** 1–5 (2012).

[65]. Chang L. T., McGrory E. L., Elander R. P., Penicillin Production by Glucose-Derepressed Mutants of *Penicillium Chrysogenum*, *J. Ind. Microbiol.*, **6:** 165-169 (1990).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

[66]. Hamzaoui A. H., Jamoussi B., M'nif A., Lithium Recovery from Highly Concentrated Solutions: Response Surface Methodology (RSM) Process Parameters Optimization, *Hydrometallurgy.*, **90:** 1–7 (2008).

[67]. Wilcox R. R., Understanding the Practical Advantages of Modern ANOVA Methods, *J. Clin. Child. Adolesc. Psychol.*, **31(3):** 399–412 (2002).

[68]. Ebrahimipour G., Sadeghi H., Zarinviarsagh M., Statistical Methodologies for the Optimization of Lipase and Biosurfactant by *Ochrobactrum intermedium* Strain MZV101 in an Identical Medium for Detergent Applications, *Molecules.*, **22:** 1460 (2017).

[69]. Masoumi H. R. F., Kassim A., Basri M., Abdullah D. K., Determining Optimum Conditions for Lipase-Catalyzed Synthesis of Triethanolamine (TEA)-Based Esterquat Cationic Surfactant by a Taguchi Robust Design Method, *Molecules.* **16:** 4672-4680 (2011).

[70].Statistics Online Computational Resource(SOCR): http://www.socr.ucla.edu/Applets.dir/F_Table.html

[71]. Khayati G., Gilani H. G., Keyvani Z. S., Extraction of Cu (II) Ions from Aqueous Media Using PEG/Sulphate Salt Aqueous Two-Phase System, *Sep. Sci. Technol.*, **51:** 601-608 (2016).

[72]. Nema A., Patnala S. H., Mandari V., Kota S., Devarai S. K., Production and Optimization of Lipase Using *Aspergillus niger MTCC 872* by Solid-State Fermentation, *Bull. Natl. Res. Cent.* **43:** 82-89 (2019).

[73]. Santos R. R., Muruci L. N. M., Damaso M. C. T., Silva J. P. L., Santos L. O., Lipase Production by *Aspergillus Niger 11T53A14* in Wheat Bran Using Experimental Design Methodology, *J. Food Nutr. Res.*, **2(10):** 659-663 (2014).

Archive of SID.ir