

جداسازی و شناسایی مخمر تریکوسپورون آساهی تولید کننده آنزیم لیپاز از کیمچی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر تخمیر و تولید لیپاز

فریده طباطبایی یزدی^{۱*}، سمیرا مرادی^۲، بهروز علیزاده بهبهانی^۳، علیرضا وسیعی^۳،
سید علی مرتضوی^۴

- ۱- دانشیار و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۳- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استاد و عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۰)

چکیده

کیمچی نوعی پیش غذا و مکمل گیاهی تخمیر شده و بر حسب ماده‌ی اولیه، روش فراوری و محل جغرافیایی به بیش از ۱۶۱ نوع تقسیم بندی می شود. در این پژوهش بعد از تولید کیمچی و انجام عمل تخمیر جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم های از طریق روش مولکولی انجام شد. عامل تخمیرسویه تولید کننده آنزیم لیپاز، تریکوسپورون آساهی از نمونه کیمچی جداسازی شد ($1.9 \times 10^3 \text{ U/ml}$). جهت افزایش تولید آنزیم لیپاز ترکیبات موثر بر رشد و عوامل کشت در تخمیر غوطه وری در ارلن مایر با استفاده از نرم افزار Design Expert بهینه سازی شد. برای غربال سازی فاکتور ها از طرح PB استفاده شده که تخمیر در شرایط دمای 30°C به مدت ۴۸ ساعت و pH اولیه ۶/۱ برای انتخاب متغیرهای موثرتر بر تولید آنزیم لیپاز انجام پذیرفت. با توجه به نتایج بدست آمده عصاره سیاه دانه، روغن زیتون، منیزیم کلرید و عصاره مخمر به ترتیب موثرترین متغیرها بودند. متغیرهای اندازه ذرات و پپتون تاثیر منفی داشتند. که متغیرها با تاثیر بیشتر انتخاب شده و بهینه سازی انجام گردید. در نهایت در شرایط بهینه با استفاده از محیط کشت حاوی ۱۵٪ عصاره سیاه دانه، 10 g/l عصاره مخمر، $22/5 \text{ g/l}$ روغن زیتون و 25 mM/l منیزیم کلرید در شرایط سرعت چرخش ۱۵۰ فعالیت آنزیمی $35 \pm 0/5 \text{ U/ml}$ بدست آمد همچنین فعالیت آنزیم بعد از حالت بهینه $1/84$ برابر حالت قبل از بهینه سازی است. مقدار پارامترهای کیتیکی و لیپاز خام به ترتیب برابر با $0/367 \text{ mM/min}$ و $0/53 \text{ mM}$ از طریق نمودار میکائیلیس-متن محاسبه شد که نشانگر ویژه گزینی بالای این سویه نسبت به سویه های دیگر تولید کننده آنزیم لیپاز است.

کلید واژگان: کیمچی، فعالیت آنزیم، تریکوسپورون آساهی، بهینه سازی

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

۱- مقدمه

لیپاز^۱ آنزیمی متعلق به گروه هیدرولازها^۲ است که عملکرد بیولوژیکی برای هیدرولیز تری گلیسرول های نامحلول و تبدیل آنها به اسید چرب آزاد، منو و دی آسید گلیسرول و گلیسرول نشان می دهد. علاوه بر این، در عملکرد طبیعی واکنش های استریفیکاسیون، اینتراستریفیکاسیون و ترنس استریفیکاسیون را در محیط های غیر آبی کاتالیز می کنند. لیپاز بعد از پروتئاز و آمیلاز از نظر فروش در دنیا جایگاه سوم را دارا است که نشاندهنده کاربردهای متنوع و فراوان صنعتی آنها می باشد [۱]. کاربردهای صنعتی بالقوه لیپاز شامل افزودنی در غذا (اصلاح آروما)، شوینده ها (هیدرولیز چربی ها)، صنعت دارویی (پزشکی، گوارشی) و چرم (خارج کردن چربی از پوست حیوانات) است. لیپازهای میکروبی نسبت به لیپازهای گیاهی و حیوانی بیشتر مورد توجه قرار دارند به دلیل شدت فعالیت کاتالیتیکی، بازده بالا، هزینه تولید پایین و پایداری در حلال های آلی است [۱].

میکروارگانیزم شامل باکتری ها، قارچ ها، مخمرها و اکتینومیسیت ها به عنوان منابع لیپاز خارج سلولی به دلیل سهولت بازیافت آنزیم از محیط کشت شناخته شده اند. در میان مخمرها، گونه های کاندیدا به عنوان مهمترین تولید کننده لیپاز گزارش شده است. لیپاز تولیدی به وسیله *کاندیدا روگوزا* به دلیل فعالیت بالا و انجام عمل هیدرولیز همانند عمل سنتز قوی یکی از آنزیم های مهم صنعتی است [۲]. دیگر مخمرهای گزارش شده که دارای پتانسیل تولید لیپاز هستند شامل *یاروویا لیپولیتیکا* [۳]، *ساکاروما یسز* [۴]، *تریکوسپورون آساهی* [۵]، *آثروپازیدیم پولولانس* [۶] و *کاندیدا کالیندراسیا* [۷ و ۸] است. آنزیم های لیپاز در حضور القاء کننده^۳ سنتز می شوند [۹].

کیمچی نوعی پیش غذا و مکمل گیاهی تخمیرشده می باشد و بیشتر در فصل زمستان که دسترسی به سبزیجات تازه کاهش می یابد مصرف می گردد. کیمچی از نظر تغذیه ای منبع مهمی از ویتامین ها، املاح، فیبر رژیمی، سایر مواد مغذی کاربردی و مواد شیمیایی غیرمغذی گیاهی می باشد. کیمچی می تواند به افزایش

اشتها، کم کردن یبوست و کنترل فلور روده ای کمک کند و اثرات ضد سرطانی و جلوگیری کننده از پیری و سایر اثرات کمک کننده به سلامت داشته باشد [۱۰].

بعوزیزو همکاران (۲۰۱۱) سویه جدید *استافیلوکوکوس زابلوسوس* را جداسازی کردند. فعالیت ویژه آنزیم تصفیه شده در pH ۸ و دمای ۵۵ درجه سانتیگراد با استفاده از امولسیون روغن زیتون برابر با 6300 U/mg بود [۱۱]. راماکریشانو بترجی از کنجاله کنجادی که حاوی ۱۰٪ روغن کنجد بود در محیط کشت پنی سیلیوم کریزوزنم استفاده کردند که آنزیم فعالیت قابل توجهی را در حضور این سویسترای جامد نشان داد [۱۲]. گامبرتو و همکاران رشد و تولید آنزیم در تخمیر بستر جامد به سویه برزیلی پنی سیلیوم رستریکوم را مورد مطالعه قرار دادند. این پژوهشگران از پیتون، روغن زیتون در نسبت های مختلف کربن به نیتروژن استفاده کردند [۱۳]. افزایش بیوسنتز لیپاز به وسیله *آسپرژیلوس نایجر* و *سودوموناس سودوآکالیژنس F-III* در حضور یون منیزیم توسط پوکورنی و همکاران گزارش شده است [۱۴].

در پژوهش حاضر یازده فاکتور (روغن زیتون، عصاره مخمر، پیتون، منیزیم کلرید، گلوکز، شربت ذرت، ملاس، عصاره سیاه دانه آسیاب شده، عصاره دانه کنجد آسیاب شده، سرعت چرخش و اندازه ذرات) غربال سازی شد. تمام فاکتورهای موثر در تولید یک محصول تخمیری با بازده بالا در نظر گرفته شده است. سرعت چرخش به دلیل تاثیر بر هوادهی موثر برای میکروارگانیزم، اندازه ذرات دانه کنجد و سیاه دانه برای بررسی تاثیر این متغیر بر ترکیبات عصاره این دانه ها و تاثیر بر بازده انتخاب شدند. روغن زیتون به عنوان منبع کربن روغنی یا القاء کننده انتخاب شد و همچنین عصاره دانه سیاه دانه و دانه کنجد نیز به عنوان منبع کربن روغنی و نیز به عنوان منبع نیتروژن و مواد معدنی انتخاب شدند. به دلیل این که عصاره دانه های سیاه دانه و کنجد حاوی ترکیبات متنوعی هستند، طبق مطالعات اولیه صورت گرفته در بین یون های مختلف منیزیم تاثیر مثبتی بر تولید لیپاز نشان داد. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی مخمر تریکوسپورون آساهی به عنوان میکروارگانیزم تولید کننده آنزیم لیپاز از کیمچی بود و در انتها با استفاده از روش بهینه سازی سطح پاسخ نوع و غلظت بهینه ترکیبات و پارامترهای موثر بر کشت برای افزایش تولید آنزیم لیپاز می باشد.

1. Triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3
2. Hydrolases
3. Inducer

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

سیاه دانه و دانه کنجد از بازار محلی تهیه شد. مواد شیمیایی شامل تریتون ایکس ۱۰۰، تریس HCl، ایزوپروپانول، صمغ عربی، رد امین B، پپتون، عصاره مخمر، منیزیم کلرید ۶ آبه، آب پپتون از شرکت مرک آلمان و گلوکز از شرکت سیگما آلدريج کشور کانادا تهیه گردید. سایر مواد مورد استفاده دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

۲-۲- تهیه کیمچی

پس از تهیه مواد اولیه کیمچی مطابق با روش طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۳) تولید کیمچی صورت پذیرفت [۱۰].

۲-۳- روش جداسازی باکتری های تولید کننده

آنزیم لیپاز

ده گرم از نمونه کیمچی به ۹۰ میلی لیتر از آب پپتون ۰/۱٪ منتقل شد و عمل هموژنیزه شدن انجام پذیرفت (مدل Seaward، آلمان). کشت سطحی از رقت های تهیه شده بر محیط کشت حاوی ۱۰g/l عصاره مخمر، ۵g/l پپتون، ۱۰g/l گلوکز، ۳g/l کلرید سدیم، ۲۵g/l روغن زیتون امولسیون شده و ۰/۰۰۱g/l رودامین B، آگار ۲۵g/l در pH ۷ در سه تکرار انجام پذیرفت؛ به این ترتیب که روی هر پلیت ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت ریخته و به کمک اسپریدر پخش شد. در دو دمای ۳۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شد گردد. که در اطراف کلنی های تولید کننده آنزیم لیپاز در این محیط کشت در زیر تابش نور لامپ UV هاله نارنجی ایجاد می شود [۱۵]. چندین مرحله تا خالص سازی کامل بر روی همین محیط کشت رد امین B آگار به صورت کشت خطی کشت داده شد تا کلنی تک و کاملاً خالص بدست آید.

۲-۴- اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز

در جهت تعیین کمی فعالیت لیپازی مخمرهای جداسازی شده و مقایسه این سویه ها از نظر فعالیت از این روش استفاده شد. پس از کشت میکروارگانیسم در محیط کشت مورد نظر و گرمخانه گذاری سوسپانسیون میکروبی را با سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰rpm

در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس مایع رویی که حاوی آنزیم می باشد را با فیلتر ۰/۲ میکرونی برای بدست آوردن محلول شفاف آنزیمی صاف گردید. فعالیت آنزیم از طریق روش winker & Stuckmann (1979) با دستگاه اسپکتروفوتومتر Cecil مدل CE2502 در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. از سوبسترای پلی نیتروفنیل پالمیتات بدین منظور استفاده شد. در این حالت فعالیت آنزیم مقیاسی از آنزیم لیپاز تولیدی است. واحد فعالیت آنزیمی (U) به این صورت تعریف می شود که مقدار آنزیمی که یک میکرومول پلی نیترو فنل را در دقیقه در شرایط آزمایش آزاد می کند. در اینجا فعالیت آنزیم مقیاسی از آنزیم لیپاز تولیدی است [۱۶].

۲-۵- نحوه آماده سازی امولسیون روغن زیتون

برای تهیه امولسیون روغن زیتون از صمغ عربی به عنوان پایدار کننده برای دست یافتن به یک امولسیون مناسب با پایداری کافی استفاده شد. برای تهیه امولسیون با صمغ عربی ابتدا آب را تا درجه حرارت ۴۵ درجه حرارت داده شد سپس مقدار صمغ مورد نظر اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت محلول صمغ را بر همزن مغناطیسی قرار داده در حین همزدن محلول روغن زیتون را به صورت قطرات ریز به ترکیب اضافه گردید. سپس با استفاده از دستگاه التراتراکس (IKA مدل T25) (۲ دقیقه rpm ۵۰۰۰ و ۳ دقیقه rpm ۸) ترکیب صمغ و روغن زیتون هموژنیزه گردید [۱۷].

۲-۶- تعیین پارامترهای کینتیکی

سوبسترای پلی نیتروفنیل پالمیتات در غلظت های ۰/۵ تا ۱ mM/ml در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتیگراد و pH ۷ برای تعیین پارامترهای کینتیکی سرعت واکنش حداکثر (Km) mM برای آنزیم لیپاز (Vmax) و ثابت میکائیلیس متن (Km) mM برای آنزیم لیپاز خام به کار برده شده است. یک واحد فعالیت آنزیمی (U) به عنوان مقدار آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را در دقیقه از هیدرولیز پلی نیتروفنیل پالمیتات در شرایط واکنش آزاد می کند. پارامترهای کینتیکی از نمودار معادله Lineweaver-burk تخمین زده شد.

۷-۲- شناسایی مولکولی سویه‌های جداسازی

شده

مرحله اول شناسایی استخراج DNA می باشد که از روش استخراج حرارتی استفاده گردید. مرحله بعدی انجام واکنش PCR است که با استفاده از پرایمرهای زیر انجام پذیرفت.

ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')
ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')

میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش دهنده‌های PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر (Sensquest (Germany) قرار داده و برنامه‌ی اجرا شده برای PCR عبارت بود از: واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه (یک چرخه)، تکثیر DNA در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه (۳۵ چرخه) و نهایتاً برای تکثیر نهایی از دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (یک چرخه) استفاده شد. جهت مشاهده باندها ژل آگارز ۱/۰۸٪ تهیه شد و در نهایت توالی‌یابی صورت پذیرفت [۱۸].

۸-۲- تهیه محیط تخمیر حالت غوطه وری

تهیه عصاره سیاه دانه و کنجد به این صورت بوده که پس از شستشو دانه‌ها آنها را آسیاب و سپس با استفاده از الک ذرات یکدست شد. مقدار معینی از پودر را در داخل تور با منافذ ریز ریخته و در داخل بشر یک لیتری که قبلاً مقدار معینی آب مقطر

داخل آن بود قرار گرفت سپس روی هیتر در دمای ۶۰ به مدت یک ساعت قرار دادیم. بعد این زمان عصاره بدست آمده را با کاغذ واتمن شماره یک صاف شد. اگر مقدار ۴۰ گرم از هر کدام از پودر ها را در داخل ۴۰۰ میلی لیتر آب بجوشانیم، در ۱۰۰ میلی لیتر از این عصاره غلظتی برابر ۱۰٪ از هر کدام از این پودرها خواهیم داشت. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط تخمیری در داخل یک ارلن مایر در حالتی که غلظت ۱۰٪ از عصاره مورد نیاز بود ۱۰۰ میلی لیتر از عصاره تهیه شده را در داخل ارلن مایر ریخته و بقیه ترکیبات مورد نیاز را به آن اضافه شد. روغن زیتون هم به صورت امولسیون شده اضافه شد که نحوه تهیه امولسیون روغن زیتون قبلاً توضیح داده شد. دمای گرمخانه گذاری در تمام آزمایشات ۳۰ بود. روش عصاره گیری با اصلاحات انجام شده با روش Rockenbach و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت [۱۹].

۹-۲- غربال گری فاکتورها با طرح آزمایش PB

برای غربال سازی اولیه ترکیبات محیط کشت و عوامل کشت از طرح PB استفاده کردیم. با استفاده از نرم افزار Design-Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) در تخمیر حالت غوطه وری جدول ۱ یازده فاکتور (روغن زیتون، عصاره مخمر، پپتون، منیزیم کلرید، گلوکز، شربت ذرت، ملاس، عصاره سیاه دانه آسیاب شده، عصاره دانه کنجد آسیاب شده، سرعت چرخش و اندازه ذرات) غربال سازی شد. تمام آزمایشات در دمای ۳۰°C انجام گردید.

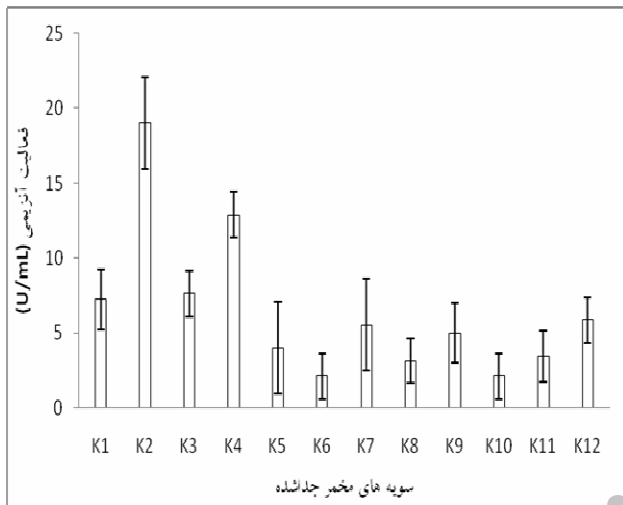
جدول ۱ متغیرهای آزمایش در دو سطح مورد استفاده جهت تولید لیپاز توسط جدایه اسپیتوباکتر در تخمیر حالت غوطه وری

| متغیر | واحد | نماد | کمترین سطح | بیشترین سطح |
|-----------------|------|------|------------|-------------|
| عصاره سیاه دانه | % | A | ۱۰ | ۲۰ |
| عصاره دانه کنجد | % | B | ۱۰ | ۲۰ |
| گلوکز | % | C | ۱۰ | ۲۰ |
| عصاره مخمر | g/l | D | ۵ | ۱۲ |
| پپتون | g/l | E | ۵ | ۱۲ |
| روغن زیتون | g/l | F | ۱۰ | ۳۰ |
| منیزیم کلرید | mM | G | ۲۰ | ۴۰ |
| ملاس | g/l | H | ۵ | ۱۲ |
| اندازه ذرات | mm | J | ۰/۵ | ۱ |
| سرعت چرخش | rpm | K | ۱۵۰ | ۱۸۰ |
| شربت ذرت | g/l | L | ۱۰ | ۳۰ |

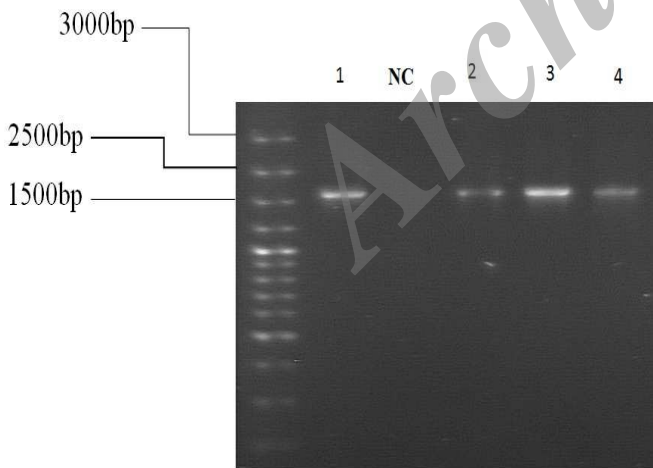
Mm: میلی مول

Mm: میلی متر

است و در این نمونه موجود بود. کومار و همکاران (۲۰۰۸) سویه تریکوسپورون آساهی را از نمونه خاک جداسازی کردند و تولید لیپاز توسط آن را مورد بررسی قرار دادند [۲۲]. بوسامار و همکاران (۲۰۱۰) تولید لیپاز از ۲۹ سویه مخمر از نژاد هیبیسکوی روزاسینسیس را بررسی کردند. در میان مخمرهای جدا شده سودوزیما هیوبینسیس، دباریومایسس اکسیدانتالیس و کریپتوکوکوس به عنوان بالاترین تولید کننده لیپاز یافت شدند [۲۳].



شکل ۱ مقایسه فعالیت آنزیمی سویه های جدا شده از نمونه کیمچی



شکل ۲ پروفایل های بانندی مربوط به سویه ی مورد آزمون شماره ۴

۲-۱۰- بهینه سازی با استفاده از روش سطح

پاسخ

بعد از غربال سازی اولیه بر طبق نتایج بدست آمده متغیرهای که تاثیر بیشتری داشته را انتخاب کرده و طرح مربع مرکزی برای هر دو حالت در جهت بهینه سازی سطوح تولید آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

جداسازی مخمر تریکوسپورون آساهی

دوازده ایزوله مخمر از نمونه بعد از غنی سازی و کشت در محیط کشت اختصاصی غنی سازی شده با روغن زیتون جداسازی شدند. این دوازده ایزوله با استفاده از محیط ردامین B آگار پلیت براساس خاصیت ایجاد هاله نارنجی در اطراف کلنی های تولید کننده لیپاز در زیر تابش نور لامپ UV (۳۵۰ نامتر) غربال سازی شدند. روش ردامین B آگار پلیت برای تعیین میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم لیپاز به کار می رود. بیان شده است که تشکیل هاله فلورسنت در تابش اشعه UV می تواند به علت تشکیل دی مرهای ردامین B با مونو یا دی گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد تولیدی به وسیله آنزیم در محیط باشد [۲۰]. سپس فعالیت لیپاز این مخمر ها با روش اسپکتروفتومتری براساس خاصیت تجزیه پلی نیتروفنیل پالمیتات به عنوان سوبسترا اندازه گیری شد. که در نتیجه در میان مخمرهای جداسازی شده، مخمر K2 بیشترین فعالیت ($19/01 \pm 3 U/ml$) را از خود نشان داد که برای مطالعات بعدی انتخاب شد (شکل ۱). نتایج حاصل از توالی یابی نشان می دهد که جدایه مورد نظر تا حد بسیار زیادیه *Trichosporon asahii* شبیه می باشد. مخمرهای شناسایی شده در کیمچی شامل ساکارومایسس تورولویس، تریکوسپورا دباریومایسس، پیچییا، ردوترولا، اندومایکوپسیس، کلیورومایسس، کریپتوکوکوس و تریکوسپورا است [۲۱]. علی رغم محیط اسیدی شدید کیمچی و ایده آل نبودن این غذایی تخمیری برای این مخمر از نظر اسیدیته این مخمر به بقاء خود ادامه داده

غربال سازی از طریق PB در حالت تخمیر

جامد و غوطه وری

با استفاده از طرح غربال سازی PB، دوازده آزمایش تخمیر حالت جامد که در جدول ۲، نشان داده شده است در شرایط تخمیر در دمای ۳۰ به مدت ۴۸ ساعت و pH اولیه ۶/۱ برای انتخاب متغیرهای موثرتر بر تولید آنزیم لیپاز در میان ۱۱ فاکتور انتخابی موثر بر فرایند در تخمیر حالت غوطه وری با توجه به نتایج بدست آمده از طرح PB (جدول ۲) منحنی تاثیر متغیرها (شکل ۳) تاثیر مثبت و منفی و همچنین موثرترین متغیرها را به ما نشان داد. عصاره سیاه دانه، روغن زیتون، منیزیم کلرید و عصاره مخمر به ترتیب موثرترین متغیرها بودند. متغیرهای اندازه ذرات و پپتون تاثیر منفی داشتند. گلوکز، ملاس، شربت ذرت و سرعت چرخش هم تاثیر مثبت داشتند اما کمتر از متغیرهای دیگر بود. منبع نیتروژن مناسب برای رشد و تولید متابولیت همانطوری که گفته شده بسیار ضروری است. در آزمایش صورت گرفته عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن تاثیر بسیار معنی داری داشته اما پپتون و شربت ذرت تاثیر کمتری نشان داده اند. صالح و همکاران گزارش کردند که منابع نیتروژن آلی، تریپتون و شربت ذرت بر روی تولید لیپاز توسط *رایزوبوس اوریزا* تاثیر ندارند. روغن ها به عنوان القاء گر در تولید آنزیم لیپاز عمل می کنند و حضور آنها در محیط کشت کاملا ضروری است [۲۴]. ویژه گزینی سوبسترا بستگی به ساختار شیمیایی ملکول سوبسترا و خصوصیات فیزیکی امولسیون دارد [۲۵]. چاندر و همکاران گزارش کردند که اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در مورد تولید لیپاز *استریپتوکوکوس فسیالیس* نسبت به اسیدهای چرب بلند زنجیر و غیر اشباع مانند اولئیک اسید تاثیر بازدارندگی دارد [۲۶]. چن و همکاران با اضافه کردن روغن زیتون تولید لیپاز از *اسیتوباکتر رادیوسیسنتس* را تقویت کردند. افزایش فعالیت آنزیم در حضور روغن زیتون که به عنوان القاء کننده در محیط کشت عمل می کند را می توان به مقدار بالای اسیدهای چرب

بلند زنجیر و غیر اشباع مانند اولئیک اسید نسبت داد [۲۷]. فدیولوگلو و ارکمن (۲۰۰۲) بهترین نتایج را در تولید لیپاز از *کاندیدا روگوزا* با استفاده از روغن زیتون به عنوان منبع کربن در حضور منابع نیتروژن بدست آوردند و همچنین غلظت بالای بیومس در حضور روغن زیتون را گزارش کردند. سیاه دانه نیز به دلیل حضور روغن فراوان در ساختار شیمیایی خود و ترکیب اسیدهای چرب آن (لینولئیک اسید و اولئیک) و از طرف دیگر به دلیل حضور ترکیبات معدنی و کربوهیدرات در ساختار آن به عنوان سوبسترای ایدآل برای میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم لیپاز است [۲۸].

پیمنتلو و همکاران در محیط کشت پنی سیلیوم سستریوم از ۱٪ روغن زیتون و ۵٪ عصاره مخمر استفاده کردند، که با استفاده از روغن زیتون به عنوان منبع کربن، عصاره آنزیمی بالاترین فعالیت را نشان داده است و کاهش غلظت عصاره مخمر همچنین موجب کاهش فعالیت آنزیم شده است و هنگامی که آمونیوم سولفات جایگزین عصاره مخمر شده است فعالیتی مشاهده نشده است [۲۹]. دالمیدا و همکاران (۲۰۱۳) از روغن زیتون با غلظت ۱/۵٪ به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن برای تولید لیپاز توسط *کاندیدا ویسواناتی* استفاده کردند که به نتایج خوبتر تولید لیپاز (۱۰/۳۳U/mg) دست یافتند. همچنین گزارش کردند که استفاده از شربت ذرت به عنوان منبع نیتروژن تاثیر منفی بر روی رشد و تولید لیپاز دارد [۳۰].

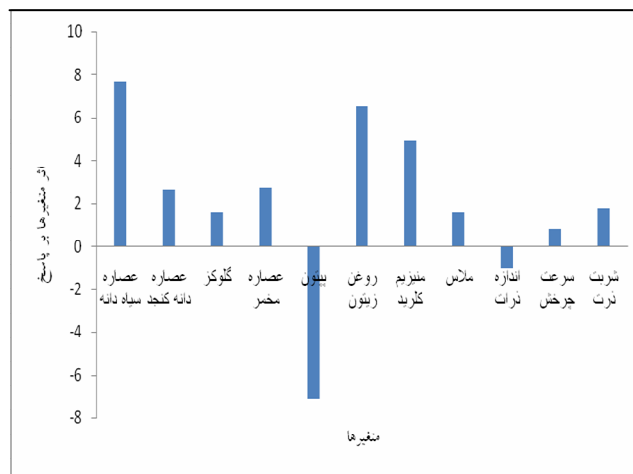
مواد معدنی نقش معنی داری در تولید لیپاز دارد. آنها به عنوان کوفاکتور در مسیرهای بیوسنتز آنزیم می توانند تولید متابولیت های باارزشی را بهبود دهند. حسن و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که یون منیزیم به طور کلی از طریق تشکیل کمپلکس با اسیدهای چرب یونیزه شده، تغییر در حلالیت و رفتار های بین سطحی سبب افزایش فعالیت آنزیم لیپاز می شوند [۳۱].

جدول ۲ دوازده آزمایش مربوط به طرح PB برای یازده متغیر جهت اندازه گیری فعالیت لیپاز در تخمیر غوطه وری

| ردیف | متغیرهای آزمایش (مقادیر واقعی) | | | | | | | | | | | پاسخ (U/ml) |
|------|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------|
| | L | K | J | H | G | F | E | D | C | B | A | |
| ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| ۲ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | -۱ |
| ۳ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ |
| ۴ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ |
| ۵ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ |
| ۶ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | -۱ |
| ۷ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| ۸ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ |
| ۹ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | -۱ |
| ۱۰ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ |
| ۱۱ | -۱ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ |
| ۱۲ | -۱ | ۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | ۱ | -۱ | ۱ | -۱ | -۱ | -۱ |

بهینه سازی با استفاده از روش سطح پاسخ

پس از تعیین مناسبترین منابع و شرایط از بین متغیرهای مورد آزمایش، بهینه سازی غلظت این متغیرها با استفاده از روش سطح پاسخ انجام شد. روش سطح پاسخ معمولاً برای بررسی اثر ترکیبی چندین متغیر به منظور یافتن شرایط بهینه برای یک شرایط چند متغیره به کار می رود. طرح مربع مرکزی برای بهینه سازی سطوح تولید آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار گرفت. در تخمیر غوطه وری (جدول) چهار متغیر نسبت عصاره سیاه دانه (A)، روغن زیتون (B)، منیزیم کلرید (C) و عصاره مخمر (D) به عنوان متغیرهای مستقل و مقدار فعالیت آنزیم متغیر پاسخ (R) وابسته انتخاب شد.



شکل ۳ نمودار میزان اثر یازده متغیر بر پاسخ در طرح PB در

تخمیر حالت غوطه وری

جدول ۳ طرح مربعات مرکزی براساس سه متغیر معنادار و فعالیت لیپاز به عنوان پاسخ در تخمیر مایع

| پاسخ | متغیرهای آزمایش (مقادیر واقعی) | | | | ردیف |
|------------------|--------------------------------|---------------------|------------------|-----------------------|------|
| | عصاره مخمر % (D) | منیزیم کلرید mM (C) | روغن زیتون % (B) | عصاره سیاه دانه % (A) | |
| فعالیت لیپاز (R) | | | | | |
| ۲۳/۱ | ۰/۵ | ۲۰ | ۱/۵ | ۱۰ | ۱ |
| ۲۷/۳ | ۰/۵ | ۲۰ | ۱/۵ | ۲۰ | ۲ |
| ۲۵/۳ | ۰/۵ | ۲۰ | ۳ | ۱۰ | ۳ |
| ۲۶/۴ | ۰/۵ | ۲۰ | ۳ | ۲۰ | ۴ |
| ۲۴/۵ | ۰/۵ | ۳۰ | ۱/۵ | ۱۰ | ۵ |
| ۳۱/۵ | ۰/۵ | ۳۰ | ۱/۵ | ۲۰ | ۶ |
| ۲۷/۴ | ۰/۵ | ۳۰ | ۳ | ۱۰ | ۷ |
| ۴۱/۳ | ۰/۵ | ۳۰ | ۳ | ۲۰ | ۸ |
| ۲۴/۵ | ۱/۵ | ۲۰ | ۱/۵ | ۱۰ | ۹ |
| ۳۹/۲ | ۱/۵ | ۲۰ | ۱/۵ | ۲۰ | ۱۰ |
| ۱۷/۴ | ۱/۵ | ۲۰ | ۳ | ۱۰ | ۱۱ |
| ۴۷/۱ | ۱/۵ | ۲۰ | ۳ | ۲۰ | ۱۲ |
| ۱۷/۳ | ۱/۵ | ۳۰ | ۱/۵ | ۱۰ | ۱۳ |
| ۵۱/۴ | ۱/۵ | ۳۰ | ۱/۵ | ۲۰ | ۱۴ |
| ۲۷/۳ | ۱/۵ | ۳۰ | ۳ | ۱۰ | ۱۵ |
| ۴۷/۱ | ۱/۵ | ۳۰ | ۳ | ۲۰ | ۱۶ |
| ۲۴/۳ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۰/۵ | ۱۷ |
| ۶۵ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۲۵ | ۱۸ |
| ۱۸/۵ | ۱ | ۲۵ | ۰/۷۵ | ۱۵ | ۱۹ |
| ۳۳/۱ | ۱ | ۲۵ | ۳/۷۵ | ۱۵ | ۲۰ |
| ۲۱/۳ | ۱ | ۱۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۱ |
| ۳۴/۳ | ۱ | ۳۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۲ |
| ۲۵/۷ | ۰ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۳ |
| ۳۰/۱ | ۲ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۴ |
| ۳۱/۹ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۵ |
| ۲۹/۹ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۶ |
| ۳۱/۹ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۷ |
| ۳۵/۱ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۸ |
| ۳۰/۳ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۲۹ |
| ۳۲/۵ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۳۰ |
| ۳۶/۲ | ۱ | ۲۵ | ۲/۲۵ | ۱۵ | ۳۱ |

برای حالت غوطه وری بدست آمد. در معادله ها مقادیر به عنوان فعالیت آنزیمی و متغیرهای A, B, C و D متغیرهای مستقل می باشند.

آزمایش های مذکور انجام و پاسخ های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Design Expert تحلیل شدند. از رگرسیون معادله **Error! Reference source not found.** ۱

جدول ۴ جدول واریانس آزمایش های بهینه سازی تخمیر غوطه وری

| مقدار p | مقدار F | منبع |
|---------|---------|-------------------|
| <۰/۰۰۰۱ | ۱۴/۷ | مدل |
| <۰/۰۰۰۱ | ۱۱۹/۹۴ | عصاره سیاه دانه A |
| ۰/۰۱۷۷ | ۶/۹۹ | روغن زیتون B |
| ۰/۰۰۳۸ | ۱۱/۴۱ | منیزیم کلرید C |
| ۰/۰۱۰۲ | ۸/۴۷ | عصاره مخمر D |
| ۰/۷۷۳۲ | ۰/۰۸۶ | AB |
| ۰/۱۲۱۵ | ۲/۶۷ | AC |
| ۰/۰۰۰۲ | ۲۲/۰۶ | AD |
| ۰/۳۰۴۱ | ۱/۱۳ | BC |
| ۰/۶۳۱۸ | ۰/۲۴ | BD |
| ۰/۶۲۲۸ | ۵/۸۷ | CD |
| ۰/۰۰۰۸ | ۱۷/۱۷ | A ² |
| ۰/۰۲۷۶ | ۵/۸۷ | B ² |
| ۰/۱۰۳۶ | ۲/۹۸ | C ² |
| ۰/۰۸۸۶ | ۳/۲۹ | D ² |
| ۰/۰۶۰۹ | ۳/۷۲ | عدم برازش |

نسبت بزرگتر از ۴ مناسب است که در این طرح مقدار این پارامتر ۱۶/۰۷ است که مقدار بسیار خوبی برای نسبت سیگنال به نوفه است [۱۸].

$$\text{معادله ۱} \quad ۳۲/۵۴ + ۸/۵۸ A + ۲/۰۷ B + ۲/۶۵ C + ۲/۲۸ D + ۰/۲۸ A B + ۱/۵۷ A C + ۴/۵۱ A D - ۱/۰۲ B C + ۰/۴۷ B D - ۰/۴۸ C D + ۲/۹۷ - ۱/۷۴ - ۱/۲۴ - ۱/۳$$

اگر مقادیر p برای هر منبع بزرگتر از ۰/۰۵ (در سطح ۵٪) باشد، نشانگر آن است که متغیر مورد نظر در مدل معنادار نیست و اگر کوچکتر از این مقدار باشد نشاندهنده معنادار بودن متغیر می باشد. در تخمیر حالت جامد با توجه به

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس برای برازش مدل های سطح پاسخ در جدول ۴ تخمیر حالت غوطه وری ارائه شده است. مقدار p محاسبه شده برای مدل کمتر از ۰/۰۰۰۱ بود که نشاندهنده معنادار بودن مدل است. ضریب تبیین (۰/۹۲۷) و ضریب تبیین تعیین شده (۰/۸۴) تایید می کند که مدل بسیار معنی دار است. به عبارتی ۹۲/۷٪ تغییرات پاسخ به تغییر متغیرهای مستقل مربوط می شود و تنها ۷/۳٪ از تغییرات پاسخ با مدل قابل توجیه نیست. دقت کافی دامنه مقادیر پیش بینی شده در نقاط طرح با میانگین خطای پیش بینی شده است. این فاکتور نسبت سیگنال به نوفه^۵ را اندازه گیری می کند که

4. adequate precision
5. noise

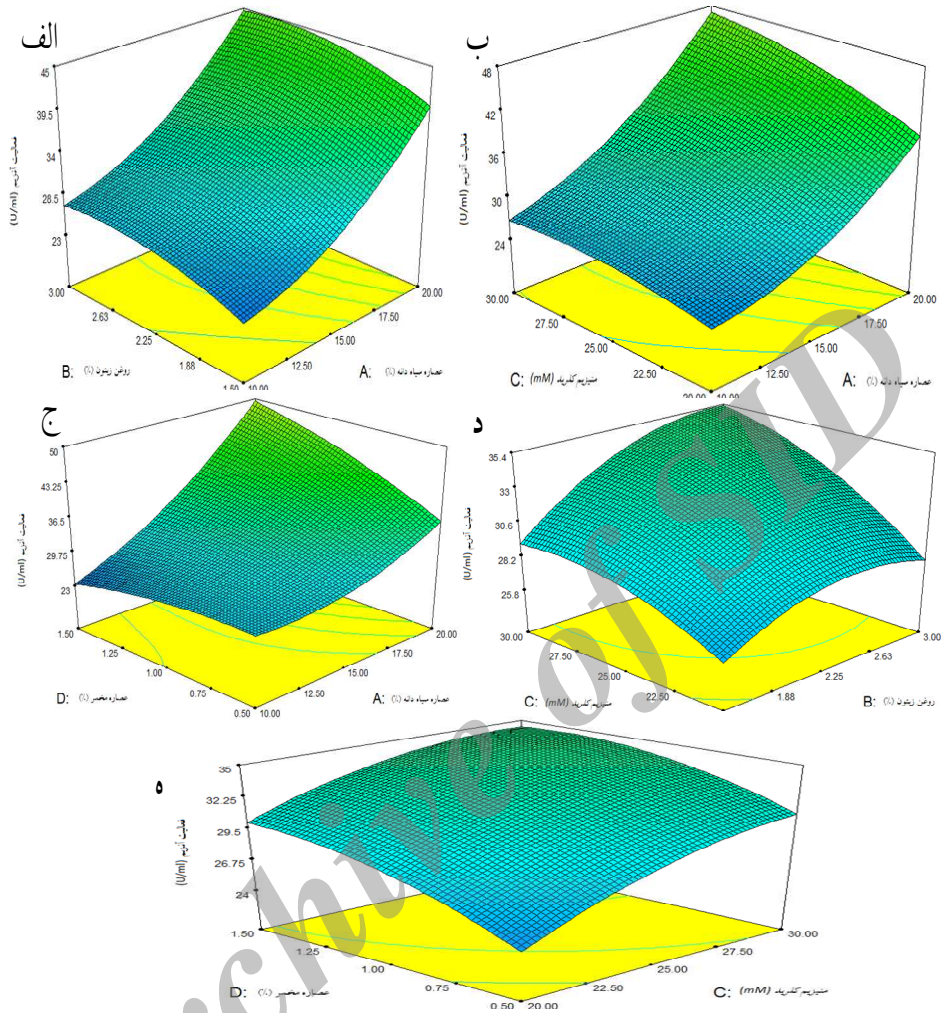
جدول ۴ تجزیه واریانس هر چهار متغیر در حالت خطی و متغیرهای اثر متقابل AC, AD, BC, BDAB و DC دارای اثر معنی داری است و بقیه متغیرها در سطح ۵٪ تاثیر معنی داری ندارند. متغیر عصاره سیاه دانه بیشترین تاثیر را نشان می دهد.

نمودارهای تاثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت آنزیم لیپاز در حالت غوطه وری در شکل ۴، آورده شده است. شکل ۴الف نمودار تاثیر متقابل غلظت روغن زیتون و عصاره سیاه دانه بر روی فعالیت آنزیم را مورد بررسی قرار می دهد. در مقدار ثابت روغن زیتون با افزایش عصاره سیاه دانه مقدار فعالیت آنزیمی افزایش می یابد، همچنین در مقدار ثابت عصاره سیاه دانه با افزایش مقدار روغن زیتون فعالیت آنزیمی افزایش چشمگیری ندارد و با افزایش هر دو متغیر فعالیت آنزیمی افزایش می یابد. شکل ۴ ب نمودار تاثیر متقابل غلظت منیزیم کلرید (mM) و عصاره سیاه دانه بر روی فعالیت آنزیم را مورد بررسی قرار می دهد. در مقدار ثابت منیزیم کلرید با افزایش مقدار عصاره سیاه دانه مقدار فعالیت آنزیمی افزایش می یابد، همچنین در نسبت ثابت عصاره سیاه دانه با افزایش منیزیم کلرید فعالیت آنزیمی افزایش می یابد و با افزایش هر دو متغیر فعالیت آنزیمی افزایش می یابد. کوک و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند. برای سویه *اسیتوباکتر کالکواستیکوس BD 413* به طور معنی داری یون های منیزیم، کلسیم، مس و مولیبدن باعث تشدید تولید آنزیم لیپاز شده است [۱۶]. افزایش بیوسنتز لیپاز به وسیله *اسپرژیلوس نایجر* و *سودوموناس سودوآکالیثنس F-* در حضور یون منیزیم گزارش شده است (پوکورنی و همکاران، ۱۹۹۴) [۱۵]. بروزلی و همکاران (۲۰۰۹) از ضایعات آبی آسیاب زیتون^۶ برای تولید لیپاز با استفاده از *کاندیدا/ سیلیندراسیا* استفاده کردند. استفاده از این مکمل همراه با ۲/۴g/L آمونیوم کلرید و ۳g/L روغن زیتون منجر به فعالیت آنزیمی در حدود ۱۰ U/ml شده است [۹]. بورکرت^۷ و همکاران (۲۰۰۴) از روش سطح پاسخ برای مطالعه تاثیر منابع کربن (روغن زیتون و گلوکز) و غلظت منابع نیتروژن (شربت ذرت) در تولید لیپاز به وسیله سویه *جئوتریکوم* استفاده

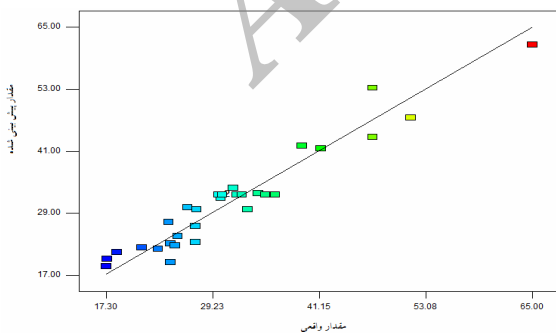
مقداری ترکیب نیتروژنی است که در نتیجه هم به عنوان منبع کربن روغنی، نیتروژن و مواد معدنی عمل می کند. شکل ۴ د تاثیر متقابل غلظت منیزیم کلرید (mM) و غلظت روغن زیتون (g/ml) بر روی فعالیت آنزیم را مورد بررسی قرار می دهد. در مقدار ثابت منیزیم کلرید با افزایش مقدار روغن زیتون مقدار فعالیت آنزیمی افزایش می یابد، همچنین در نسبت ثابت روغن زیتون با افزایش مقدار منیزیم کلرید فعالیت آنزیمی افزایش می یابد و با افزایش هر دو متغیر فعالیت آنزیمی افزایش می یابد. اما واضح است که فعالیت آنزیم لیپاز با افزایش همزمان هر دو متغیر فعالیت آنزیمی افزایش قابل توجهی دارد. شکل ۴ه تاثیر متقابل غلظت منیزیم کلرید (mM) و عصاره مخمر (%) بر روی فعالیت آنزیم را مورد بررسی قرار می دهد. در مقدار ثابت منیزیم کلرید با افزایش مقدار عصاره مخمر مقدار فعالیت آنزیمی افزایش می یابد، همچنین در نسبت ثابت عصاره مخمر با افزایش مقدار منیزیم کلرید فعالیت آنزیمی افزایش می یابد و با افزایش هر دو متغیر فعالیت آنزیمی افزایش می یابد. کوک و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند. برای سویه *اسیتوباکتر کالکواستیکوس BD 413* به طور معنی داری یون های منیزیم، کلسیم، مس و مولیبدن باعث تشدید تولید آنزیم لیپاز شده است [۱۶]. افزایش بیوسنتز لیپاز به وسیله *اسپرژیلوس نایجر* و *سودوموناس سودوآکالیثنس F-* در حضور یون منیزیم گزارش شده است (پوکورنی و همکاران، ۱۹۹۴) [۱۵]. بروزلی و همکاران (۲۰۰۹) از ضایعات آبی آسیاب زیتون^۶ برای تولید لیپاز با استفاده از *کاندیدا/ سیلیندراسیا* استفاده کردند. استفاده از این مکمل همراه با ۲/۴g/L آمونیوم کلرید و ۳g/L روغن زیتون منجر به فعالیت آنزیمی در حدود ۱۰ U/ml شده است [۹]. بورکرت^۷ و همکاران (۲۰۰۴) از روش سطح پاسخ برای مطالعه تاثیر منابع کربن (روغن زیتون و گلوکز) و غلظت منابع نیتروژن (شربت ذرت) در تولید لیپاز به وسیله سویه *جئوتریکوم* استفاده

6. Olive- mill wastewater
7. Burkert

کردند [۳۲].



شکل ۲ نمودارهای سطحی سه بعدی مربوط به تاثیر متقابل متغیرهای مستقل بر روی فعالیت آنزیم در تخمیر حالت غوطه وری



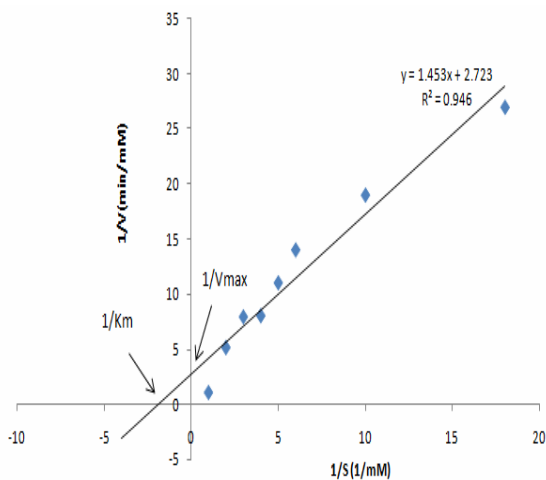
شکل ۵ نمودار قیاس همبستگی داده های واقعی در برابر مقدار پیش

بینی شده مدل

نمودار قیاس^۸ همبستگی میان داده های تجربی و مقادیر پیش بینی شده فعالیت آنزیم لیباز را آشکار می کند (شکل ۵ Error! Reference source not found. خط شیبدار نشان دهنده برازش مناسب با مدل و اختلاف قابل قبول بین داده های تجربی و مقادیر پیش بینی شده در دامنه بررسی شده متغیرها می باشد.

8. Parity plot

بهینه سازی



شکل ۶ نمودار معادله میکائلیس متن برای تعیین پارامترهای کینتیکی

۴- نتیجه گیری

آنزیم لیپاز به دلیل کاربردهای متنوعی که امروزه در دنیای صنعت دارد به عنوان آنزیمی پر تقاضا در بازار مصرف است، از طرف دیگر قیمت بالای این آنزیم نیاز به روش هایی که بتواند ضمن هزینه پایینتر تولید و بازده بیشتر را افزایش می دهد. با توجه به نتایج این پژوهش ملاحظه می شود که تخمیر حالت جامد ضمن کاهش هزینه آنزیم بیشتری را نسبت به تخمیر حالت مایع تولید کرده است. لیپاز سنتز شده توسط مخمرها پتانسیل بالقوه برای انجام واکنش های استریفیکاسیون و ترنس استریفیکاسیون در حلال های آلی، سنتز برخی استرهای صنعتی و فرایند زیستی پساب های صنعتی غنی از چربی را دارا است. سویه تولید کننده آنزیم لیپاز، تریکوسپورون آساهی از نمونه کیمچی جداسازی شد ($19/01 \pm 3 U/ml$). در جهت افزایش تولید آنزیم لیپاز ترکیبات موثر بر رشد و عوامل کشت در غوطه وری با استفاده از نرم افزار Design Expert بهینه سازی شد. در تخمیر حالت غوطه وری در دمای ۳۰ به مدت ۴۸ ساعت و pH اولیه ۶/۱ برای انتخاب متغیرهای موثرتر بر تولید آنزیم لیپاز انجام شد. با توجه به نتایج بدست آمده عصاره سیاه دانه، روغن زیتون، منیزیم کلرید و عصاره مخمر به ترتیب موثرترین متغیرها انتخاب شده و بهینه سازی انجام شد. با انجام بهینه سازی با محیط کشتی با مشخصات ۱۵٪ عصاره سیاه دانه، ۱۰ g/l عصاره مخمر، ۲۲/۵ g/l روغن زیتون و

هدف از بهینه سازی سطح پاسخ یافتن نقطه مطلوب در فضای طرح است. این نقطه بسته به هدف فرایند می تواند یک نقطه پیشینه، کمینه یا ناحیه ای که در آن پاسخ در سراسر دامنه متغیرها ثابت باشد. در تولید هر فرآورده ای در مقیاس بزرگ، هزینه اجراء محیط کشت به اندازه بهره وری بالا از اهمیت فراوانی برخوردار است. به عبارت دیگر همیشه نقطه تولید حداکثر بهترین انتخاب نیست. در تخمیر حالت جامد با استفاده از محیط کشت حاوی ۱۵٪ عصاره سیاه دانه، ۱۰ g/l عصاره مخمر، ۲۲/۵ g/l روغن زیتون و ۲۵ mM/l منیزیم کلرید در شرایط سرعت چرخش ۱۵۰ فعالیت آنزیمی $35 \pm 0/5 U/ml$ بدست آمد، که با پروزلی و همکاران (۲۰۰۹) از ضایعات آبی آسیاب زیتون^۹ برای تولید لیپاز با استفاده از *کاندیدا سیلیندراسیا* استفاده کردند. استفاده از این مکمل همراه با ۲/۴ g/L آمونیوم کلرید و ۳ g/L روغن زیتون منجر به فعالیت آنزیمی در حدود ۱۰ U/ml^{۱۰} شده است [۹]. سالیهو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند استفاده از بهینه سازی آماری ترکیبات مغذی برای تشدید تولید لیپاز *کاندیدا کای لیندراسیا* و به حداکثر فعالیت $20/26 U/ml$ دست یافتند [۷]. پاپاگورا^{۱۱} و همکاران (۲۰۱۳) بهینه سازی تولید لیپاز از سویه جدا شده *دباریومایسس هانسینی*^{۱۱} از زیتون های نمکی خشک گزارش کردند. بهینه سازی ترکیبات محیط کشت را با هدف تشدید تولید لیپاز به وسیله این سویه از طریق RSM بررسی کردند. ترکیبات بهینه محیط شامل (g/l)، عصاره مخمر ۵، پیتون ۱۰، پتاسیم فسفات ۴، منیزیم سولفات ۷ به ۱، گلوکز ۱۳/۱، روغن زیتون ۱۹، توین ۸۰، ۳/۸ و pH ۶/۴ است [۳۳]. پارامترهای کینتیکی K_m, V_{max} لیپاز خام به ترتیب برابر با $mm/min.ml$ و $0/367$ و $0/53$ از طریق نمودار معادله میکائلیس - منتن محاسبه شد (نمودار ۴). هر چه مقدار کمتر باشد نشان دهنده *affinity* بالاتر بین آنزیم و سوبسترا است و هرچه بیشتر نشان دهنده کارایی کاتالیتیکی بالاتر آنزیم است.

9. Olive- mill wastewater
10. Papagora
11. *Debaryomyces hansenii*

- acetate. *Process Biochemistry* 43(10): 1054-1060.
- [6] Liu, Z., Z. Chi, L. Wang and J. Li (2008). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2. 3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. *Biochemical Engineering Journal* 40(3): 445-451.
- [7] Salihu, A., M. Z. Alam, M. I. AbdulKarim and H. M. Salleh (2011). Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69(1): 66-73
- [8] Kim, B. S. and C. T. Hou (2006). Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. *Bioprocess and biosystems engineering* 29(1): 59-64.
- [9] Santis-Navarro, A., T. Gea, R. Barrena and A. Sánchez (2011). Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. *Bioresource technology* 102(21): 10080-10084.
- [10] Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi SA, Ghaitaranpour A. 2013. Effect of temperature on microbial changes during kimchi fermentation. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(1):9-14.
- [11] Bouaziz, A., H. Horchani, N. Ben Salem, Y. Gargouri and A. Sayari (2011). Expression, purification of a novel alkaline *Staphylococcus xylosus* lipase acting at high temperature. *Biochemical Engineering Journal* 54(2): 93-102.
- [12] Ramakrishnan, C. and B. Banerjee (1952). Studies on mold lipase. Comparative study of lipases obtained from molds grown on *Sesamum indicum*. *Archives of biochemistry and biophysics* 37(1): 131-135.
- [13] Gombert, A. K., A. L. Pinto, L. R. Castilho and D. M. Freire (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* 35(1): 85-90.
- [14] Pokorny, D., J. Friedrich and A. Cimerman (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters* 16(4): 363-366.
- [15] Kok, R. G., J. J. Thor, I. M. 25mM/l منیزیم کلرید در شرایط سرعت چرخش ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ °C فعالیت آنزیمی 35 ± 0.5 U/ml بدست آمد که فعالیت آنزیم بعد از حالت بهینه ۱/۸۴ برابر حالت قبل از بهینه سازی است. این نتایج نشاندهنده این مطلب است که روش به کار برده شده در جهت افزایش فعالیت آنزیمی موثر واقع شده است و افزایش چشمگیری در فعالیت آنزیمی مشاهده گردید.
- ### ۵- تشکر و قدردانی
- مقاله علمی - پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۲۰۱۸۹ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.
- ### ۶- منابع
- [1] Kempka, A. P., N. L. Lipke, T. d. L. F. Pinheiro, S. Menoncin, H. Treichel, D. M. Freire, M. Di Luccio and D. de Oliveira (2008). Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(2): 119-125.
- [2] Vakhlu, J. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning." *Electronic Journal of Biotechnology* 9(1): 0-0.
- [3] Dominguez, A., M. Costas, M. Longo and A. Sanromán (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 25(15): 1225-1229.
- [4] Ciafardini, G., B. Zullo and A. Iride (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil *Food microbiology* 23(1): 60-67.
- [5] Kumar, S. S. and R. Gupta (2008). An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl

- enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry* 43(10): 1054-1060.
- [23] Bussamara, R., A. M. Fuentesfria, E. S. d. Oliveira, L. Broetto, M. Simcikova, P. Valente, A. Schrank and M. H. Vainstein (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource technology* 101(1): 268-275.
- [24] Salleh, A. B., R. Musani, M. Basri, K. Ampon, W. Yunus and C. Razak (1993). Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Canadian journal of microbiology* 39(10): 978-981.
- [25] Esposito, S., M. Semeriva and P. Desnuelle (1973). Effect of surface pressure on the hydrolysis of ester monolayers by pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 302(2): 293-304.
- [26] Chander, H., B. Ranganathan and J. Singh (1979). Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *Journal of Food Science* 44(6): 1747-1751.
- [27] Chen, S.-J., C.-Y. Cheng and T.-L. Chen (1998). Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *Journal of fermentation and bioengineering* 86(3): 308-312.
- [28] Fadiloglu, S. and O. Erkmen (2002). Inactivation of lipase by carbon dioxide under atmospheric pressure. *Journal of food engineering* 52(4): 331-335.
- [29] Pimentel, M., N. Krieger, L. Coelho, J. Fontana, E. Melo, W. Ledingham and J. Lima Filho (1994). Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. *Applied biochemistry and biotechnology* 49(1): 59-74.
- [30] De Almeida, A.F., S.M. Taulk-Tornisielo, and E.C. Carmona (2013). *Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated Candida viswanathii strain*. *Annals of Microbiology*. 63(4): p. 1225-1234.
- [31] Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology advances* 27(6): 782-798.
- Nugteren Roodzant, M. B. Brouwer, M. R. Egmond, C. B. Nudel, B. Vosman and K. J. Hellingwerf (1995). Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular microbiology* 15(5): 803-818.
- [16] Winkler, U. K. and M. Stuckmann (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 138(3): 663-670.
- [17] Gharibzahedi, S. M. T., S. M. Mousavi, M. Hamed and F. Khodaiyan (2013). Application of response surface modeling to optimize critical structural components of walnut-beverage emulsion with respect to analysis of the physicochemical aspects. *Food and Bioprocess Technology* 6(2): 456-469.
- [18] Ribeiro, M. A., Alastruey-Izquierdo, A., Gomez-Lopez, A., Rodriguez-Tudela, J. L. and Cuenca-Estrella, M. (2008). "Molecular identification and susceptibility testing of *Trichosporon* isolates from a Brazilian hospital." *Revista Iberoamericana de Micología* 25(4): 221-225.
- [19] Rockenbach, I.I., et al., *Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (Vitis vinifera and Vitis labrusca) pomace from Brazilian winemaking*. *Food Research International*, 2011. 44(4): p. 897-901.
- [20] Hou, C. and T. Johnston (1992). Screening of lipase activities with cultures from the agricultural research service culture collection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(11): 1088-1097.
- [21] Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Ghaitaranpour A, Jouki M. 2012. Isolation, identification and comparison of lactic acid bacteria from fermented be produced in Iran Kimchi with Korean commercial samples: introduction of a probiotic product. *Scientific Journal of Biological Sciences*. 1(6): 120-125.
- [22] Kumar, S. S. and R. Gupta (2008). An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and

extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology* 91(4): 413-420.

[32] Burkert, J., F. Maugeri and M. Rodrigues (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. *Bioresource technology* 91(1): 77-84.

[33] Papagora, C., T. Roukas and P. Kotzekidou (2013). "Optimization of

Archive of SID

Isolation and identification of *Trichosporon asahii* from Kimchi and medium optimization in submerge fermentation

Tabatabaei Yazdi, F. ^{1*}, Moradi, S. ², Alizadeh Behbahani, B. ³, Vasiee, A. R. ³,
Mortazavi, S. A. ⁴

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. M.Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tehran
3. Ph.D studentt, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/11/20 Accepted: 93/9/18)

Kimchi is a fermented herbal supplement, and appetizer that according to a raw material, process and geographical location are classified more than 161 types. In this study, after kimchi production, isolation and identification of microorganisms was performed by molecular method. Lipase producing strain, *Trichosporon asahii* was isolated from kimchi sample (19.01 ± 3 U/ml). The various medium components and culture parameters to achieve a more cost effective and economically viable bioprocess were screened and optimized using Design Expert software. PBdesigns are used to screen the most effective variables on lipase production that fermentation temperature and initial pH for 48 hours 30. According to the results, extract of nigella sativa, olive oil, yeast extract, magnesium chloride, respectively, were the most variable. Variable particle size and pepton have negative effect. The variable selection and optimization on was performed more efficiently. Finally, lipase activity was 35 ± 0.5 U/ml in the optimal conditions using a medium containing 15% sativa extract, 10 g/l yeast extract, 22.5 g/l olive oil and 25 mM/l magnesium chloride in the rotation speed of 150 rpm, respectively, as well as enzyme activity after 84/1 times the optimal state before optimization. The kinetic parameters V_{max} and K_m was 0.367 mM / min and 0.53 mM through Michaelis–Menten Chart, respectively. Low K_m indicates high affinity between enzyme and substrate and high V_{max} demonstrates high catalytic performance of the enzyme

Key words: Kimchi, lipase activity, *Trichosporon asahii*, Optimization

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